


Ciudad Obregón, Sonora, a 15 de febrero de 2019.

Instituto Tecnológico de Sonora
P r e s e n t e.

El que suscribe Bernardo Baldenea Vega, por medio del presente manifiesto bajo protesta de decir verdad, que soy autor y titular de los derechos de propiedad intelectual tanto morales como patrimoniales, sobre la obra titulada Distribución cuantitativa de *Naegleria fowleri* en medios acuáticos del valle del Yaqui, durante mayo a octubre de 2017, en lo sucesivo "LA OBRA", misma que constituye el trabajo de tesis que desarrolle para obtener el grado de Ingeniero Biotecnólogo en ésta casa de estudios, y en tal carácter autorizo al Instituto Tecnológico de Sonora, en adelante "EL INSTITUTO", para que efectúe la divulgación, publicación, comunicación pública, distribución y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines académicos o propios del objeto del Instituto, es decir, sin fines de lucro, por lo que la presente autorización la extiendo de forma gratuita.

Para efectos de lo anterior, EL INSTITUTO deberá reconocer en todo momento mi autoría y otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente de LA OBRA.

De igual forma, libero de toda responsabilidad a EL INSTITUTO por cualquier demanda o reclamación que se llegase a formular por cualquier persona, física o moral, que se considere con derechos sobre los resultados derivados de la presente autorización, o por cualquier violación a los derechos de autor y propiedad intelectual que cometa el suscrito frente a terceros con motivo de la presente autorización y del contenido mismo de la obra.


Bernardo Baldenea Vega
(Nombre y firma del autor)



"Distribución cuantitativa de *Naegleria fowleri*
en medios acuáticos del Valle del Yaqui,
durante mayo a octubre de 2017"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA
BERNARDO BALDENEVA VEGA

AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por estar presente en esta etapa tan importante de mi vida y darme salud, alegrías y desdichas que me han hecho forjarme como persona.

Especialmente a mis padres, **Honorio** y **Silvia**, por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a ellos por cada día confiar, creer en mí y en mis expectativas, gracias por siempre estar ahí cuando los necesite, siempre se esforzaron por darme todo aunque ustedes se quedaran sin nada.

A mis hermanos **Willian**, **Bastián** y mi hermana **Magali**, por todo lo que nos ha tocado vivir juntos y por siempre apoyarme.

A toda mi gran familia, por siempre estar dispuestos a ayudarnos unos a otros.

A los Doctores Luis Fernando Lares, Fernando Lares Villa y al Maestro Manuel Borquez por ser mis asesores. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio, por su amistad y por los momentos de trabajo y diversión que compartimos.

A mis amigos y personas que de una u otra manera me ayudaron a concluir esta etapa.

A mis maestros que durante cuatro años compartieron parte de sus conocimientos conmigo.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Antecedentes.....	3
1.2 Planteamiento del problema	3
1.3 Justificación	4
1.4 Objetivo.....	4
1.4 Hipótesis	5
II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN	6
2.1 Clasificación taxonómica	6
2.2 Morfología.....	7
2.3 Tolerancia a la temperatura.....	8
2.4 Patogenicidad.....	11
2.5 Pruebas de identificación.....	14
2.6 Distribución del género <i>Naegleria</i>	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
3.1 Selección de los sitios de muestreo	18
3.2 Preparación de medios de cultivo y soluciones	20
3.3 Aislamiento por filtración	21
3.4 Prueba de transformación ameboflagelar.....	21
3.5 Axenización	22
3.6 Cosecha de placa de Petri.....	22
3.7 Técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction).....	23
3.8 Electroforesis	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	25
4.1 Aislamiento, prueba de flagelación y condiciones del muestreo	25
4.2 Técnica de PCR (<i>Naegleria fowleri</i>).....	27
4.3 Técnica de PCR (<i>Naegleria</i> spp.)	29
V. CONCLUSIÓN	31
REFERENCIAS.....	32

RESUMEN

Las amibas de vida libre han cobrado importancia médica desde 1960 debido al descubrimiento de su patogenicidad en animales y humanos. El género *Naegleria* se ha destacado por poseer a la especie *N. fowleri*, que causa en humanos meningoencefalitis amebiana primaria, enfermedad de evolución rápida y fatal que afecta al sistema nervioso central; además de otras especies que han resultado ser patógenas en animales de laboratorio. Mediante la ayuda de técnicas moleculares, se han identificado 47 especies. El objetivo de este estudio fue aislar e identificar amibas del género *Naegleria* y la búsqueda intencionada de la especie *N. fowleri* en sitios recreativos del Valle del Yaqui, para lo cual se seleccionaron a La isleta, Las Palmas, Agua Caliente y la Laguna del Náinari. El muestreo se realizó de mayo a octubre de 2017. Para la identificación de las cepas se utilizaron criterios de morfología del trofozoito y del quiste, prueba de transformación flagelar, pruebas de temperatura y pruebas genéticas. Se obtuvieron 172 cepas con prueba de flagelación positiva, todas crecieron a temperatura de 45°C; al total de las cepas se les realizó PCR punto final. De estas, 22 resultaron positivas a *N. fowleri*; 131 a *Naegleria* spp. 19 cepas resultaron negativas a *Naegleria* spp. y a *N. fowleri*. De los cuatro sitios muestreados fue la primera vez que se determinó la presencia de *N. fowleri* en los sitios Agua Caliente y la Laguna del Náinari, ya habiéndose reportado antes, en los otros dos sitios.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación taxonómica	6
Tabla 2. Especies del género <i>Naegleria</i> y temperaturas máximas de crecimiento. 9	
Tabla 3. Casos de sobrevivientes de MAP.....	1313
Tabla 4. Presencia de <i>Naegleria</i> spp. en diferentes continentes.....	177

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Número de aislamientos positivos por sitio de muestreo.....	266
Cuadro 2. Rangos: temperatura ambiente, oxígeno disuelto y pH.	266
Cuadro 3. Resultado de cepas positivas a <i>N. fowleri</i>	277
Cuadro 4. Resultado de cepas negativas a <i>Naegleria</i> spp.....	300

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de <i>Naegleria</i>	8
Figura 2. Ruta de infección de <i>Naegleria fowleri</i>	11
Figura 3. ADNr de <i>Naegleria fowleri</i>	16
Figura 4. Mapa con la zona de estudio.....	19
Figura 5. Ubicación de la Laguna del Náinari.....	19
Figura 6. Resultados de PCR a <i>N. fowleri</i>	29

I. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos distribuidos por casi todo el mundo que se desarrollan en el medio ambiente, principalmente en aguas templadas que se mantienen relativamente inmóviles (piscinas, lagunas, estanques) (Muñoz *et al.*, 2003). Eventualmente, estos organismos pueden infectar a humanos y animales, actuando como parásitos oportunistas, ocasionándoles diversas patologías, además se define como organismos anfitriónicos (DATABIO, 2015).

Actualmente, se han descrito gran cantidad de géneros y especies de AVL, pero hasta hoy, algunas especies del género *Acanthamoeba*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata* han sido reportadas como causantes de patologías en humanos y otros animales (Trabelsi *et al.*, 2012; Trabelsi *et al.*, 2016); causando graves enfermedades como encefalitis que pueden ser fatales, queratitis y úlceras cutáneas. Los casos más notificados debido a AVL a nivel mundial son causados por *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris* (Marciano-Cabral *et al.*, 2003).

Los protozoos del género *Naegleria* destacan por presentar un tercer estadio en su ciclo biológico que es una fase transitoria flagelada, aparte de las de trofozoito ameboide y quiste. Existen más de 40 especies, pero solo *N. fowleri* ha sido reportada como patógena para el ser humano. *N. australiensis* y *N. itálica* para animales de experimentación (De Jonckheere, 2011; De Jonckheere, 2014).

N. fowleri, causa una infección aguda, fulminante y rápidamente fatal en el sistema nervioso central (SNC), llamada meningoencefalitis amebiana primaria (MAP). Se le conoce en medios de difusión como la "amiba come cerebros" (Heekyoung *et al.* 2015). La forma patógena es el trofozoito ameboide y el periodo de incubación puede ser de uno a siete días. El ciclo de vida puede ocurrir en un hospedero humano, libremente en un medio acuático o en el suelo en forma de quiste. A esta capacidad se le denomina anfitriónico. Las víctimas generalmente son individuos sanos y jóvenes que presentan historial reciente de natación u otras actividades relacionadas con el agua (Goswick y Brenner, 2003).

Las enfermedades amebianas son difíciles de diagnosticar clínicamente conduciendo a un retraso en el tratamiento y resultando en una alta tasa de mortalidad que se estima en más de un 95% (DATABIO, 2015). El diagnóstico exitoso de las infecciones por AVL y la terapia apropiada dependen de la identificación precisa en el laboratorio. En la mayoría de los casos, el aislamiento del medio ambiente puede lograrse, pero la identificación y diferenciación de las cepas no es tarea fácil. Mediante el uso de técnicas moleculares como PCR punto final, es posible analizar muestras del medio ambiente a efecto de detectar la presencia de éstas amibas patógenas y en su caso tomar las medidas de seguridad convenientes para evitar que entren en contacto con humanos.

1.1 Antecedentes

Durante la primera mitad del siglo XX las amibas de vida libre eran conocidas como amibas de suelos y se consideraban protozoos no patógenos. Dujardin, en 1841 fue el primero en describir y nombrar “amiba limax” a un microorganismo unicelular. En 1911, Alexeieff describió la mitosis de la “amiba Limax” y estableció los géneros *Hartmanella* y *Naegleria*, en honor a Harmann y Nagler (Martínez, 1985; Rondanelli, 1987). El término “limax” se aplicó a todas las amibas pequeñas que se desplazaban con movimientos lentos (Hinestroza, 2010). En 1912, Alexeieff propuso el nombre genérico de *Naegleria* para las amibas limax que poseían la habilidad de transformarse en una fase temporaria flagelada y por tener división nuclear caracterizada por “promitosis” (Martínez, 1985).

Las enfermedades producidas por amibas de vida libre sólo se reconocen, aparentemente partir de 1948, cuando se comunicó el caso de un soldado japonés de 22 años, que fue capturado como prisionero de guerra en enero de 1943, cerca de Buna, Nueva Guinea y falleció siete días después (Visvesvara, 2010). En 1965, Fowler y Carter reportaron el primer caso de MAP en Australia (Oddó, 2006). En 1968, en E.U.A. se estableció que eran amibas del género *Naegleria* spp. las que producían meningoencefalitis, en base a la identificación de un estado ameboflagelado del protozoo (Oddó, 2006).

1.2 Planteamiento del problema

Hasta la fecha, a nivel mundial se han notificado cerca de 440 casos de MAP (Abdul Majid *et al.*, 2017). En la región ya se registró un caso de MAP (Vargas-Zepeda *et al.*, 2004). Se trató de un niño, el cual inmergió en aguas de un canal de riego, durante el verano, que es cuando se registran temperaturas óptimas para el desarrollo de *Naegleria fowleri*. Las aguas naturales superficiales con uso recreativo podrían ser un problema de salud para los que se inmergen en estos sitios, por lo que es de interés conocer la presencia de la amiba.

¿Se encontrará *Naegleria fowleri* en los distintos sitios de muestreo? Y de encontrarse, ¿su presencia estará relacionada con la temperatura?

1.3 Justificación

Naegleria fowleri es termofílica, distribuida en casi todo el mundo excepto en la Antártida (Jonckheere 2014). La proliferación sigue en aumento debido al calentamiento global y a la contaminación ambiental, además, aún no existe un tratamiento eficaz para la enfermedad que esta provoca. En la región del Valle de Yaqui se presentan altas temperaturas en la mayor parte del año favoreciendo la proliferación de amibas termófilas, y a raíz de los casos de MAP detectados en el Valle de Mexicali, B.C y el Valle del Yaqui, Son. (Guzmán-Fierros *et al.*, 2008), resulta de gran importancia el conocer si se encuentra presente *N. fowleri* en las aguas naturales superficiales con uso recreativo de nuestra región.

1.4 Objetivo

Aislar e Identificar a *N. fowleri* en diversos cuerpos de agua naturales superficiales de uso recreativo, mediante el uso de técnicas moleculares, con el fin de conocer su presencia en los diferentes sitios de muestreo.

1.4.1 Objetivos específicos

- Aislar AVL con morfología y fisiología sospechosa de pertenecer al género *Naegleria*, a partir de muestras obtenidas en los meses de mayo a octubre del 2017, utilizando placas de Petri con NNE con el fin de tener cultivos puros.

- Extraer el ADN de las cepas de amibas aisladas mediante el uso del DNeasy Blood & Tissue Kit, con el fin de ser utilizado en la técnica de PCR.
- Identificar los aislamientos mediante PCR punto final utilizando primers específicos con el fin de conocer la especie de las amibas.

1.4 Hipótesis

La amiba *Naegleria fowleri* se encontrará en los cuatro cuerpos de agua superficial de uso recreativo seleccionados, con mayor prevalencia en los meses con temperaturas más altas.

II. MARCO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Clasificación taxonómica

Uribarren (2017), define al género *Naegleria* como protista de la familia Vahlkampfiidae, en la clase Heterolobosea. Actualmente se conocen 8 genotipos de *N. fowleri*, para su identificación se realizan pruebas de secuenciación de ADN (De Jonckheere, 2011).

Tabla 1. Clasificación taxonómica

Reino	Protista
Subreino	Protozoa
Phylum	Sarcomastigophora
Subphylum	Sarcodina
Superclase	Rhizopodia
Clase	Acarpomyxea
Orden	Schizopyrenida
Familia	Vahlkampfiidae
Género	<i>Naegleria</i>

Fuente: Fero (2010).

Esta clasificación no toma en cuenta la patogenicidad como característica de distinción; sin embargo son consideradas todas las amibas que son potencialmente patógenas para humanos y animales (Tabla 1).

2.2 Morfología

N. fowleri presenta tres estadios durante su ciclo biológico: Una forma vegetativa (trofozoito ameboide), una forma de resistencia (quiste) y una forma transicional (flagelado). El trofozoito mide de 10 a 25 μm , presenta una forma elongada, digitiforme, al generar uno o dos pseudópodos, eruptivos, hialinos, redondeados, de tipo lobopodios durante su movimiento, el cual suele ser rápido. Posee un único núcleo con un nucléolo central prominente. El citoplasma es granular, con numerosas mitocondrias, ribosomas, con vacuolas de alimentos y varias vacuolas contráctiles (Figura 1A). El extremo posterior o polo uroide es adherente. Sirve para acumular los productos de desechos, separándose periódicamente del resto de la célula (Visvesvara, 2010; De Jonckheere, 2011; Pérez de Galindo *et al.*, 2012). Los trofozoitos exhiben amebostomas, los cuales son extensiones citoplasmáticas de la superficie. Son usados para ingerir bacterias, levaduras y residuos celulares (Visvesvara, 2010). El cuerpo flagelado, es temporal y reversible a la forma ameboide (Pérez de Galindo *et al.*, 2012). Los flagelados de este género tienen forma redondeada u ovalada, con una longitud de 10 a 16 μm , con un nucléolo grande, ubicado siempre hacia el extremo anterior respecto a la dirección del movimiento y generalmente tiene dos flagelos posteriores, pero en ocasiones también pueden verse tres o cuatro flagelos (Figura 1C). No se pueden alimentar. El flagelado se considera un estado transitorio, que se genera al encontrar el trofozoito ameboide en un estado de hipotonía del medio acuático donde se encuentra. A partir de este estado se revierte a la forma ameboide, en un tiempo de una hora o menos (Visvesvara, 2010; De Jonckheere, 2011, Pérez de Galindo *et al.*, 2012).

El proceso de enquistamiento implica la formación de la pared del quiste, la expulsión de agua por las vacuolas contráctiles y la reorganización del citoplasma. Los quistes son esféricos, entre 8 a 12 μm de diámetro, aunque pueden alcanzar hasta 20 μm , tienen un contorno liso y una pared refringente densa, con uno o dos poros aplanados (Figura 1B). Los quistes de *N. fowleri* no se observan en los tejidos infectados, solo se aprecian en el medio ambiente (Visvesvara, 2010; De Jonckheere, 2011). Este proporciona protección hacia la desecación y a la falta de alimento.

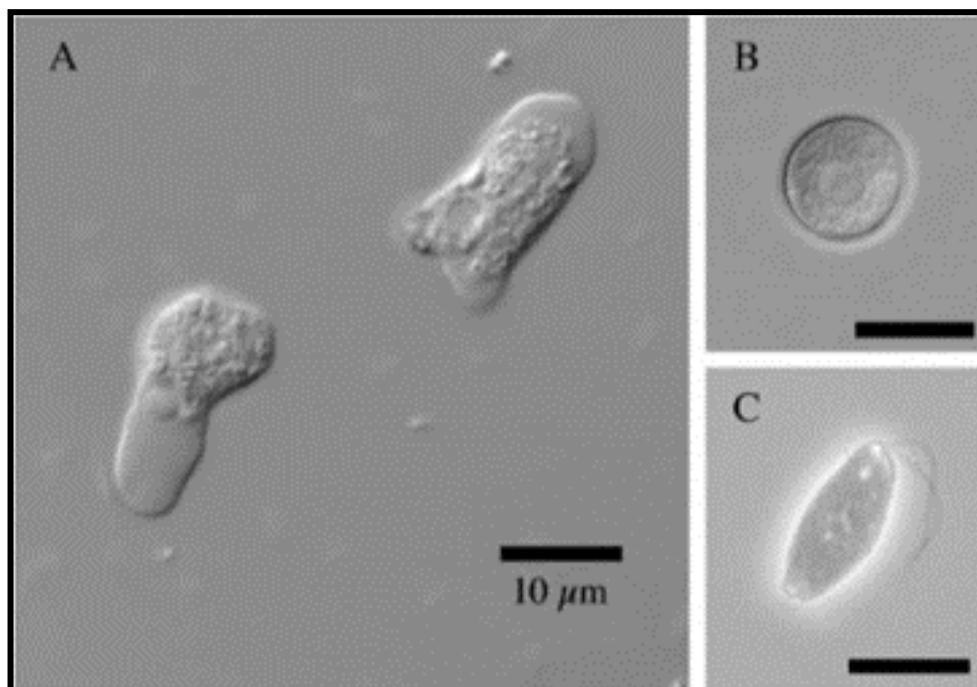


Figura 1. Morfología de *Naegleria* (A) trofozoito amebicoide; (B) quiste; (C) trofozoito flagelado. Barra 10 μm . Fuente: Hara-Fukama, (2005).

2.3 Tolerancia a la temperatura

El género *Naegleria* comprende especies patógenas y no patógenas. Hasta el momento, se han descrito 47 especies diferentes en el género *Naegleria* (De Jonckheere, 2014). Todas las especies patógenas son termófilas pero no todas las

termófilas son patógenas, como *N. lovaniensis*. Termófila se define como la característica de que la temperatura óptima de crecimiento sea de 40 °C o a mayor temperatura. *N. fowleri* es termófila, con una temperatura óptima de crecimiento de 45 °C, proliferando durante los meses más cálidos del año, justo en coincidencia con diversas actividades acuáticas recreativas de las personas (De Jonckheere, 2002; Visvesvara *et al.*, 2007; Visvesvara, 2010; De Jonckheere, 2011). Se ha demostrado que el origen del agua, los materiales de tuberías, los iones, los metales, el pH, las temperaturas ambientales, la materia orgánica, el nivel de nutrientes, la comunidad microbiana de biofilm y residuos de desinfectantes influyen en su crecimiento (Morgan *et al.*, 2016).

Según Schuster (2010), los quistes de *N. fowleri* pueden sobrevivir a 4 °C con retención de virulencia de hasta 12 meses para trofozoitos enquistados. En estudios más recientes, De Jonckheere (2014) resume las temperaturas máximas de crecimiento para las especies que fueron identificadas en base a la secuencia genética. Se muestran las especies del género *Naegleria*, el año que fue descubierta cada especie, el autor, la capacidad de flagelación y de división durante el estado de flagelación (Tabla 2).

Tabla 2. Especies del género *Naegleria* y temperaturas máximas de crecimiento.

Especies	Autor, año	T.°C	Flagelación
<i>N. gruberi</i>	Schardinger (1899), De Jonckheere (2002)	39	+
<i>N. fowleri</i>	Carter (1970)	45	+
<i>N. jadini</i>	Willaert y Le Ray (1973)	35	+
<i>N. lovaniensis</i>	Stevens et al. (1980)	45	+
<i>N. australiensis</i>	De Jonckheere (1981)	42	+
<i>N. itálica</i>	De Jonckheere <i>et al.</i> (1984)	42	+
<i>N. andersoni</i>	De Jonckheere (1988)	40	+
<i>N. jamiesoni</i>	De Jonckheere (1988)	42	+
<i>N. clarki</i>	De Jonckheere (1994)	37	+
<i>N. galeacystis</i>	De Jonckheere (1994)	35	+
<i>N. minor</i>	De Jonckheere y Brown (1995)	38	Se divide

<i>N. pussardi</i>	Pernin y De Jonckheere (1996)	41	+
<i>N. carteri</i>	Dobson, Robinson y Rowan-Kelly (1997)	45	+
<i>N. morganensis</i>	Dobson, Robinson y Rowan-Kelly (1997)	44	+
<i>N. niuginensis</i>	Dobson, Robinson y Rowan-Kelly (1997)	45	+
<i>N. sturt</i>	Dobson, Robinson y Rowan-Kelly (1997)	44	+
<i>N. robinsoni</i>	De Jonckheere y Brown (1999)	38	Se divide
<i>N. fultoni</i>	De Jonckheere <i>et al.</i> (2001)	35	+
<i>N. chilensis</i>	De Jonckheere <i>et al.</i> (2001)	30	-
<i>N. indonesiense</i>	De Jonckheere <i>et al.</i> (2001)	38	-
<i>N. tihangensis</i>	De Jonckheere (2002)	42	+
<i>N. pringsheimi</i>	De Jonckheere (2002)	37	+
<i>N. pagei</i>	De Jonckheere (2002)	37	+
<i>N. philippinensis</i>	De Jonckheere (2002)	40	+
<i>N. gallica</i>	De Jonckheere (2002)	33	+
<i>N. americana</i>	De Jonckheere (2002)	35	+
<i>N. mexicana</i>	De Jonckheere (2002)		+
<i>N. schusteri</i>	De Jonckheere (2002)	37	+
<i>N. dobsoni</i>	De Jonckheere (2002)	<35	+
<i>N. byersi</i>	De Jonckheere (2002)	42	+
<i>N. endoi</i>	De Jonckheere (2002)	45	+
<i>N. laresi</i>	De Jonckheere (2002)	42	+
<i>N. martinezi</i>	De Jonckheere (2002)	45	+
<i>N. johanseni</i>	De Jonckheere (2002)	45	+
<i>N. antártica</i>	De Jonckheere (2002)	28	+
<i>N. dunnebackei</i>	Visvesvara <i>et al.</i> (2005)	37	+
<i>N. angularis</i>	De Jonckheere y Brown (2005)	40	+
<i>N. tenerifensis</i>	De Jonckheere, (2006)	42	+
<i>N. canariensis</i>	De Jonckheere, (2006)	37	+
<i>N. polaris</i>	De Jonckheere, (2006)	<30	+
<i>N. neopolaris</i>	De Jonckheere, (2006)	<30	+
<i>N. arctica</i>	De Jonckheere, (2006)	<30	-
<i>N. spitzbergenensis</i>	De Jonckheere, (2006)	<30	+
<i>N. neodobsoni</i>	De Jonckheere, (2006)	<30	+
<i>N. neoantarctica</i>	De Jonckheere, (2006)	<30	+
<i>N. neochilensis</i>	De Jonckheere, (2006)	<30	-
<i>N. paradobsoni</i>	De Jonckheere, (2006)	<30	-

Fuente: De Jonckheere, 2014

2.4 Patogenicidad

N. fowleri es el agente causal de una infección cerebral fulminante, la meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), que típicamente resulta en muerte (Visvesvara, 2010). Los casos de *N. fowleri* han sido reportados en individuos sanos, que con antecedentes de nadar en agua dulce, lagos, piscinas; bañarse en aguas termales y realizar irrigación nasal durante rituales religiosos (Siddiqui *et al.*, 2006). Cuando el agua contaminada se inhala profundamente por la nariz, ocurre una invasión de *N. fowleri*. Los trofozoitos penetran en el neuroepitelio olfatorio y atraviesan los bulbos olfatorios, ascendiendo al cerebro provocando una hemorragia e inflamación severa (Yoder *et al.*, 2012). En las lesiones, los trofozoitos suelen ubicarse en el área perivascular, sin descripción hasta la fecha, de la presencia de formas quísticas (Marciano-Cabral y Cabral, 2007). El estado de mortalidad debido a MAP es angustiante ya que se mantiene por encima de 95% (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009). En la figura 2. Se hace una representación esquemática de la ruta de acceso de la ameba patógena.

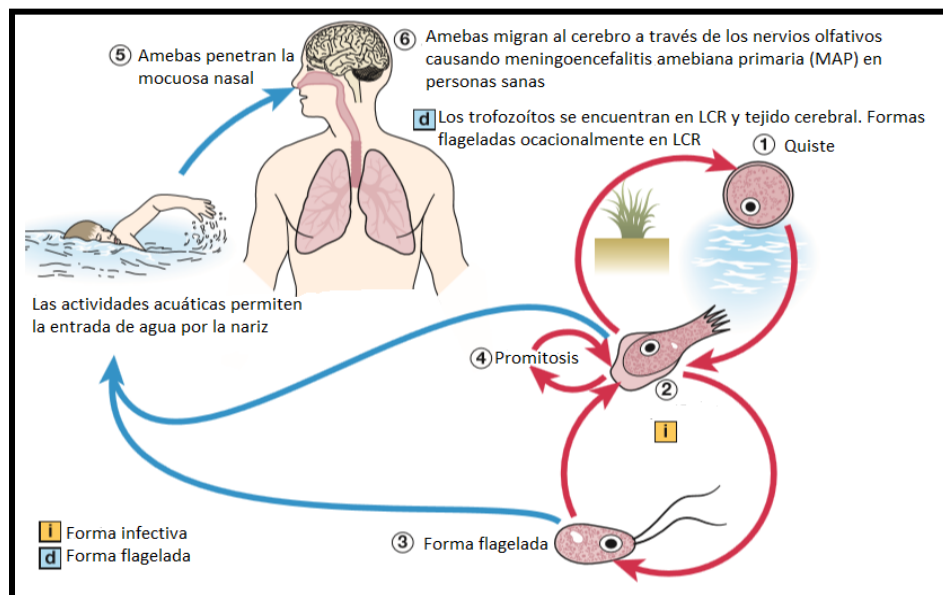


Figura 2. Ruta de infección de *Naegleria fowleri*. Fuente: Disease Control and Prevention (2017).

El periodo de incubación desde la exposición al parasito oportunista hasta el desarrollo de la enfermedad en la mayoría de los casos es de cuatro a siete días, donde se comienzan a presentar los primeros síntomas (Peralta y Ayala, 2009). Los afectados generalmente son jóvenes, con buena salud, que de manera súbita presentan cefalea frontal bitemporal intensa, fiebre alta de 38.2 a 40 °C asociada a rinitis, síntomas respiratorios, vomito en proyectil, rigidez de nuca, cambio en el comportamiento, somnolencia, letargia, irritabilidad y obnubilaciones. El deterioro progresivo continúa hasta llegar al coma. La gran mayoría termina fatalmente a una semana de la aparición de los primeros síntomas (Visvesvara, 2010).

Es difícil diferenciar la meningoencefalitis bacteriana de la MAP, lo que provoca retrasos en el diagnóstico correcto. Mediante el análisis de líquido cefalorraquídeo (LCR) se indica que tipo de agente fue quien provocó la meningitis, bacterias o amibas (da Rocha-Azevedo *et al.*, 2009). La mayoría de los pacientes tienen un aumento de la presión intracraneal y en estas circunstancias, extraer el LCR mediante punción lumbar tiene sus propias complicaciones, como la herniación del tronco encefálico. En este caso, el objetivo principal es disminuir la presión intracraneal utilizando medicamentos como el manitol, este complica el manejo del paciente en presencia de una hemorragia intracraneal (Tilak *et al.*, 2008).

Debido a la rareza de la infección, hasta la fecha no existen ensayos clínicos que evalúen la eficacia de un régimen de tratamientos sobre otro. Quizás el medicamento más efectivo para el padecimiento es la anfotericina B, que se ha estudiado *in vitro* y también se ha utilizado en varios informes de casos. Otros anti infecciosos que se han utilizados en los informes de casos incluyen fosina, aritromicina, miconazol y rifampina (Grace *et al.*, 2017).

En cuanto a los sucesos de MAP, se han registrado 143 casos en los Estados Unidos. De 1962 a 2016 (Centers for Disease Control and Prevention, 2018) y cerca de 440 casos en todo el mundo (Abdul Majid *et al.*, 2017). En la tabla 3 se presentan

los casos de sobrevivientes a MAP; los casos de tratamientos exitosos en Norteamérica que incluyen dos en Estados Unidos y uno en México. El primer caso de sobrevivencia a *N. fowleri* en Norteamérica fue en Estados Unidos en 1978 (publicado en 1982), la cual fue en una niña de nueve años que había nadado en Deep Creek Hot Springs en el San Bernardino National Forest en dos ocasiones distintas. Fue tratada por vía intravenosa con anfotericina B y miconazol convencionales, además de rifampina oral, dexametasona intravenosa y fenitoína oral (Solarte *et al.*, 2006).

En México, se reportó un caso de tratamiento exitoso de MAP en abril de 2003. El paciente, un niño de diez años, fue admitido en Hospital 1 de Especialidades del Centro Médico Nacional del Noroeste del Instituto Mexicano de Seguridad Social. Fue diagnosticado mediante la preparación en fresco del LCR. La muestra se cultivó en placas de agar no nutritivo con *Escherichia coli* (NNE). Se realizó la prueba de flagelación y de tolerancia a temperatura. En el LCR fueron observados trofozoitos móviles y las pruebas de flagelación y crecimiento en NNE a 45 °C fueron positivas, así como las características morfológicas del trofozoito y quistes que señalaban pertenecer al género *Naegleria*. El tratamiento consistió de anfotericina B, fluconazol y rifampicina (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005).

Tabla 3. Casos de sobrevivientes de MAP.

Edad (Años)	Sexo	Lugar
6	F	Reino Unido
4	F	Reino Unido
14	M	Australia
9	F	California (USA) Pennsylvania
	M	(USA)
18	F	Tailandia
61	M	Tailandia
30	M	Italia
38	M	Hong Kong
26	F	India

10	M	México
0.8	M	India
0.5	M	Irán
73	M	India
0.1	M	India

Fuente: De Jonckheere, 2014

2.5 Pruebas de identificación

2.5.1 Pruebas de flagelación

Los miembros del género *Naegleria* tienen la capacidad de transformarse de una ameba que se divide y alimenta a un flagelado que no se divide y que no se alimenta (a excepción de *N. robinsoni* y *N. minor* que sí se dividen). El estado flagelar es transitorio y reversible a la forma ameboide. Los factores para este proceso de transformación incluyen la limitación de nutrientes, temperatura de incubación y condiciones de cultivo axénico (De Jonckheere, 2002; De Jonckheere 2014).

Estudios morfológicos indican que el proceso de transformación involucra la formación coordinada de nuevas estructuras celulares, requiriendo la nueva síntesis de proteínas, degradación de material almacenado y la modificación de los componentes celulares tales como el citoesqueleto (De Jonckheere, 2011). Sin embargo esta prueba no es confiable para detectar a todas las especies, debido a que existen por lo menos dos especies de *Naegleria* (*N. chilensis* y *N. indonesiensis*) a las que no se les ha podido inducir la flagelación. Para las especies patógenas y de interés sí ha sido posible (De Jonckheere, 2014).

2.5.2 Pruebas genéticas

El desarrollo de técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por sus siglas en inglés, permite obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular partiendo de una cantidad mínima (Hinestroza, 2010).

Las especies de *Naegleria* son fenotípicamente parecidas y por lo tanto, la identificación morfológica específica de *N. fowleri* es difícil. Se han desarrollado técnicas moleculares, como PCR y ensayos de PCR anidado, para la identificación de nuevas especies de amibas en pacientes y en el medio ambiente (Visvesvara, 2010). El ADNr en el género *Naegleria*, es un plásmido circular del cual hay aproximadamente 4,000 copias en cada célula. Esto está en contraste con la situación en la mayoría de los otros eucariotas, donde el ADNr se repite en un número variable de repeticiones en tándem (secuencia de dos o más pares de bases de ADN), dentro de los cromosomas (De Jonckheere, 2014).

Kilvington y Beeching (1995) desarrollaron la técnica de PCR para identificar a *N. fowleri* de muestras ambientales, mientras que Réveiller *et al.* (2002), desarrollaron una técnica de PCR anidado muy sensible y específica para detectar *N. fowleri* en muestras de agua. Sin embargo, los estudios para delinear especies se ha basado recientemente en su secuencia de ADNr de la sub unidad pequeña del ribosoma (SSU rDNA por sus siglas en inglés), porque no sólo son las diferencias más fáciles de cuantificar, sino porque también permite comparar organismos más distantemente relacionados (De Jonckheere, 2014).

El análisis de PCR de polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, RFLP (restriction fragment length polymorphism), amplifica ADN ribosomal o “riboprinting”, produciendo arboles filogenéticos similares a los del SSU rDNA y constituye menos trabajo. Sin embargo, es preferible el “riboprinting” del ADN de la sub unidad grande de la ribosoma (LSU rDNA por sus siglas en inglés), ya que en el género *Naegleria*, no son tan frecuentemente encontrados en el LSU rDNA comparado con SSU rDNA.

El análisis de la secuencia de los espaciadores internos del transcrito (ITS1 e ITS2 por sus siglas en inglés); los espaciadores externos del transcrito (5´ETS y 3´ETS por sus siglas en inglés), han confirmado las especies. En la figura 3, los cuadros

negros muestran las longitudes relativas de los amplicones e indican la posición elegida para el PCR (Bellini, *et al.*, 2018).

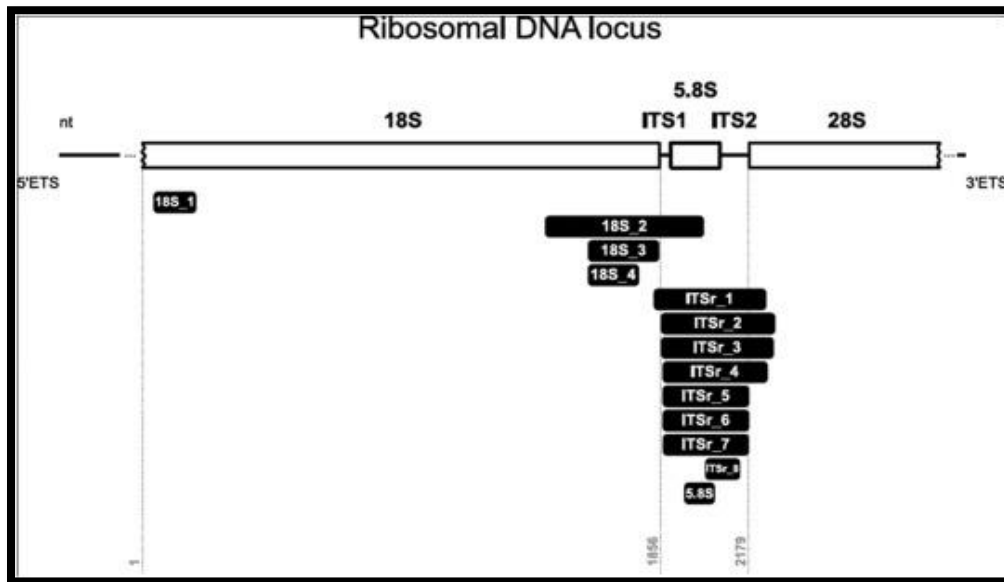


Figura 3. ADNr de *Naegleria fowleri*. Fuente: Bellini *et al.*, 2018

2.6 Distribución del género *Naegleria*

El género *Naegleria* ha llegado a ser el más estudiado genéticamente. Al ser parásitos oportunistas y facultativos, se ha vuelto posible estudiar su distribución geográfica. La tabla 4 se presenta la distribución de este género al rededor del mundo. Las especies *N. fowleri* y *N. lovaniensis*, son de las especies más similares dentro del género *Naegleria*.

Además existen otras especies que solamente se han encontrado en un solo continente, como lo son: *N. martinezi*, *N. johanseni*, *N. philippinensis*, *N. pringsheimi*, *N. jadini* en Bélgica; *N. minor* del norte de Australia; *N. robinsoni*, en el sur de Australia y *N. indonesiensis* en Indonesia (De Jonckheere, 2004).

Tabla 4. Presencia de *Naegleria* spp. en diferentes continentes.

Especies	Cobertura geográfica
<i>N. fowleri</i>	Europa, América, África, Asia, Oceanía
<i>N. lovaniensis</i>	Europa, Norteamérica, África, Asia, Oceanía
<i>N. martinezi</i>	Oceanía
<i>N. johanseni</i>	Oceanía
<i>N. itálica</i>	Europa, Suramérica, Asia, Oceanía
<i>N. australiensis</i>	Europa, Norteamérica, Asia, Oceanía
<i>N. tihangensis</i>	Europa, Norteamérica, Asia, Oceanía
<i>N. philippinensis</i>	Asia
<i>N. gruberi</i>	Europa, Norteamérica, Asia
<i>N. pagei</i>	Europa, Norteamérica, Asia
<i>N. pringsheimi</i>	Suramérica
<i>N. clarki</i>	Europa, Norteamérica, Asia, Oceanía
<i>N. jadini</i>	Europa
<i>N. galeacystis</i>	Suramérica
<i>N. minor</i>	Oceanía
<i>N. robinsoni</i>	Oceanía
<i>N. indonesiensis</i>	Asia
<i>N. andersoni</i>	Europa, Suramérica, África, Asia, Oceanía

Fuente: De Jonckheere, 2014

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Selección de los sitios de muestreo

Se seleccionaron cuatro sitios de interés recreativo dentro de la región sur de Sonora. Las muestras se tomaron una vez al mes durante los meses de mayo a octubre de 2017. Se puede localizar estos puntos de muestreo en la figura 4 y 5.

Las muestras se tomaron de la orilla, removiendo primeramente los sedimentos y dejando asentar un poco éstos, con el fin de despegar las amibas adheridas a rocas y plantas. Se utilizaron recipientes de 1 L con tapa de rosca y se midió temperatura ambiental, temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto (OD) y salinidad. Las muestras fueron etiquetadas y transportadas al laboratorio de Biología Molecular del ITSON (5 de Febrero 818 Sur, Cd. Obregón, Sonora) a temperatura ambiente para su procesamiento en un tiempo no mayor de 24 horas.



Figura 4. Mapa con la zona de estudio.

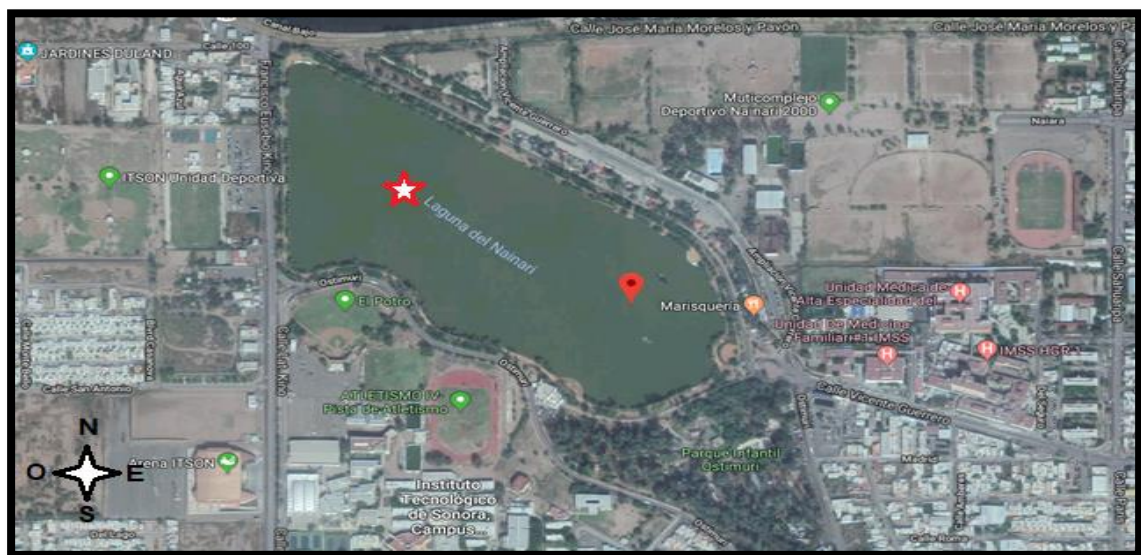


Figura 5. Ubicación de la Laguna del Nainari.

3.2 Preparación de medios de cultivo y soluciones

Agar tripticasa de soya (TSA). Se preparó agar TSA para el cultivo de bacterias entéricas. Se calentó hasta disolución completa y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 psi, durante 15 minutos. Se vació este medio en placas Petri desechables.

Suspensión de *Escherichia coli*. Se tomó una cepa pura de *E. coli*, se cultivó en cajas de Petri con TSA, por estría masiva y se incubó a 37 °C por 24 horas. Después, se pasó a hacer la cosecha de las placas mediante un hisopo estéril y se revolvió en tubo de centrifuga de 50 mL con agua destilada estéril. Este procedimiento se repitió con cada una de las placas.

Agar no nutritivo con *E. coli* (NNE). Se preparó agar bacteriológico, calentándolo hasta disolución completa y se esterilizó en autoclave a 121 °C, 15 psi, durante 15 minutos. Se vació este medio en placas Petri desechables y después de solidificarse el agar, se aplicó suspensión de *E. coli* por toda la placa con una varilla acodada.

Buffer de Solución de Fosfatos (PBS)

PB 10X. Para su preparación se pesaron 2.62 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 11.5 g de fosfato de disódico (Na_2HPO_4). Se disolvieron los fosfatos en 800 mL de agua destilada y se aforó a 1000 mL.

PBS. En un recipiente de 1000 mL, se agregaron 800 mL de agua destilada, 100 mL de PB (10X) y 8.75 g de cloruro de sodio (NaCl). Se disolvieron las sales y se ajustó el pH a 7.2 y se aforo a 1000 mL con agua destilada. Se conservó a 4 °C.

3.3 Aislamiento por filtración

Cada muestra se homogenizó mediante sacudidas manuales durante 30 segundos y se filtraron cinco volúmenes de 100 y 10 mL a través de filtros de acetato de celulosa de 1,2 μm (Millipore); cada filtro se cortó por la mitad y se sembraron en placas con NNE.

Asimismo, se hizo siembra directa de los volúmenes de 1 y 0.1 mL de cada muestra de agua por quintuplicado. Todas las placas se incubaron a 45 °C durante 3 días, dando suficiente tiempo para que las amibas unidas a los filtros se liberaran y/o los quistes cambiaran a trofozoitos y presentaran crecimiento. Las placas se examinaron diariamente para determinar el crecimiento de amibas usando el microscopio de luz invertida (Axiolab), transfiriendo los aislados positivos a amibas a nuevas placas para purificar el cultivo.

3.4 Prueba de transformación ameboflagelar

Para la inducción a la transformación flagelar, se añadieron 2 mL de agua destilada estéril a cada placa con las cepas en su estadio de trofozoito y se incubaron a 37 °C durante 1-4 horas. Cada placa se examinó por hora mediante microscopía invertida. Ante resultados positivos, se observarían ameboflagelados o cuerpos flagelados moviéndose de un lado a otro. En los resultados negativos, los trofozoitos no presentarían movimiento propio a través del líquido e incluso presentando enquistamiento. Después de 4 horas sin transformación, la prueba se tomó como negativa y se descartaron las cepas.

3.5 Axenización

Se tomó todo el sobrenadante de las pruebas de transformación positiva y se inocularon en nuevas placas de NNE. Se incubaron a 45 °C durante una semana con observaciones diarias para detectar contaminación.

3.6 Cosecha de placa de Petri

A cada placa se le añadieron 2 mL de una alícuota de PBS. Se inclinó la placa levemente, se raspó (cosechó) con raspadores celulares y se giró poco a poco la placa, hasta que se cosechó por toda la placa Petri. De cada placa, se obtuvieron cuatro tubos a los cuales se les aplicaron 0.5 mL de PBS con amibas. Los tubos se centrifugaron en una microcentrífuga a 8,000 rpm por 1 minuto. Se descartó el PBS de cada tubo, mientras el pellet o botón celular se mantenía en la parte inferior. El procedimiento se repitió para los cuatro tubos restantes. Se aplicaron 0.25 mL de PBS en el primer tubo, se talló y se mezcló sobre el pellet. Se tomó todo y se aplicó al segundo tubo y se mezcló y así consecutivamente con los demás tubos. Para que finalmente fueran dos tubos por placa. Cuando se tuvieron los dos tubos por muestra, a estos se les realizó el pasó. Quedándose con un tubo por muestra. Se repitió el pasó y se les quitaron los 0.5 mL de PBS de los tubos.

Después de los anteriores pasos, se obtuvo una biomasa de amibas.

3.6.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó utilizando el DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Se resuspendió el pellet en 200 µL de PBS. Se aplicaron 20 µL de proteinasa K y 200 µL del Buffer AL a la muestra y se mezclaron completamente con vortex se incubaron a 56 °C por 24 horas. Se aplicaron 200 µL de etanol (96-100%) y se mezclaron completamente con vortex. Se pipeteó la muestra y el precipitado en el DNeasy mini Spin Column colocado en un tubo colector de 2 mL. Se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante y el tubo de colección. Se

colocó el DNeasy Mini Spin Column en un nuevo tubo de colección de 2 mL, se adicionaron 500 µL del buffer AW1 y se centrifugó 1 minuto a 8,000 rpm. Se descartó el sobrenadante y el tubo de colección. Se colocó el DNeasy Mini Spin Column en un nuevo tubo de colección de 2 mL, se adicionaron 500 µL del buffer AW2, y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos, para secar la membrana DNeasy. Se descartó el sobrenadante y el tubo de colección. Se colocó el DNeasy Mini Spin Column en un tubo de microcentrífuga de 2 mL y se pipetearon 100 µL de buffer AE directamente sobre la membrana DNeasy. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y después se centrifugó a 8,000 rpm por 1 minuto para eluir.

3.6.2 Medición de la concentración de ADN

Se midió la concentración de ADN de las muestras procesadas mediante el espectrofotómetro NanoDrop 2000c en el laboratorio de microbiología del ITSON (Según las especificaciones del fabricante Thermo Scientific, AccesoLab).

3.7 Técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction)

3.7.1 PCR *N. fowleri*

A las muestras de ADN, se les realizó la técnica de PCR con el kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), para amplificar la región del ADN que identifica a *Naegleria fowleri*, y se utilizaron los primers específicos (Lares-Jiménez y Lares-Villa, 2009). Primer 1: NFFW 5'-TGAAAACCTTTTTTCCATTTACA-3' y Primer 2: NFRV 5'-AATAAAAGATTGACCATTTGAAA-3'. Escala de 200 nMol.

El programa de temperaturas (De Jonckheere, comunicado personal) en el termociclador para cada uno de 30 ciclos fue: precalentamiento a 94 °C por 5 minutos, desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, alineamiento a 52 °C por 1.5 minutos, extensión a 72 °C por 2 minutos y extensión final 72 °C por 5 minutos.

3.7.2 PCR *Naegleria* spp.

A las muestras de ADN, se les proceso por PCR con el kit GoTaq Flexi DNA Polymerase (Promega), para amplificar la región del ADN que identifica al género *Naegleria* a las resultantes negativas a la especie *N. fowleri*. Se utilizaron los siguientes primers específicos (De Jonckheere, 2011). Primer 1: ITSFW, 5'-AACCTGCGTAGGGATCATTT-3' y Primer 2: ITS RV, 5'-TTTCCTCCCCTTATTAATAT-3'. Las condiciones fueron 94 °C por 3 minutos, seguido por 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 30 s, y la extensión a 72 °C por 5 minutos. (Ithoi *et al*, 2011).

3.8 Electroforesis

Para el corrimiento electroforético de los productos de PCR, se preparó el gel de agarosa a una concentración del 1%. Se utilizó la cantidad de 30 mL de buffer TAE (Tris Acetato-EDTA, pH 8.3, SIGMA) al 0.5%, además de la agarosa grado molecular (0.30 g). En un matraz Erlenmeyer se calentó en un microondas aproximadamente 60-90 segundos hasta que se disolvió completamente la agarosa. Se vació a un vaso precipitado para agregarle el bromuro de etidio (2.5 µL) cuando la mezcla estuviera temperizada. Se vació en base para gel y se colocó el peine, dejando reposar hasta que el gel solidificará (15-20 minutos). Se quitó el peine del gel y el gel se quitó junto con la base y se colocó en la cámara de electroforesis. Para cargar las muestras en el gel, se mezcló primero 1 µL de buffer de carga más 5 µL de producto de PCR. En el primer carril del gel se cargaron 2 µL del marcador de pares de bases. El gel se corrió con buffer TAE (Tris Acetato-EDTA, pH 8.3, SIGMA) al 0.5% a 100 mV, hasta que la muestra hubiera avanzado aproximadamente tres cuartas partes del gel. Al terminar el proceso, el gel se visualizó en el transiluminador UV a 260 nm de longitud de onda.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aislamiento, prueba de flagelación y condiciones del muestreo

Los muestreos se hicieron en los sitios: La Isleta (lat. 27° 43' 57.72"N, long. 109° 52' 29.35"O), paseo Las Palmas (lat. 27 45' 29.89" N, long, 109° 54' 0.435" O), Agua Caliente (lat. 27° 44' 8.769" N, long, 109° 52' 50.46" O) y la Laguna del Náinari (lat 21° 29' 47.376" N, long 109° 58' 5.859" O). Durante los meses de mayo, junio, julio, agosto, septiembre, octubre de 2017.

Se obtuvieron 172 cepas con prueba de flagelación positiva, todas las cepas crecieron a 45 °C. La temperatura del agua al momento de la toma de muestra estuvo dentro de un rango de 26 a 45.1 °C. A continuación, se presentan los sitios de muestreo con el rango de las temperaturas al momento del muestreo y número

de aislamientos positivos por sitio. Todas las temperaturas tomadas durante los 6 muestreos se encuentran dentro de estos rangos.

Cuadro 1. Número de aislamientos positivos por sitio de muestreo.

Sitios	Temperatura (°C)	Núm. de aislamientos positivos
La Isleta	24 - 31.2	13
Las Palmas	27 - 33.6	26
Agua Caliente	42.5 - 45.1	124
Laguna del Naínari	28.9 - 33.5	10
Total		172

En el cuadro 2 se muestran parámetros importantes como la temperatura ambiente, que se mantuvo entre los 24°C a 38° C lo que nos puede indicar que posiblemente haya amibas en el suelo o agua, ya que las temperaturas son idóneas para su desarrollo. El oxígeno disuelto se presentan en diferentes rangos dependiendo del sitio, entre mayor temperatura menor cantidad de oxígeno disuelto. Respecto al pH, el agua se mantuvo en rangos neutros, lo que favorece el crecimiento de este género según De Jonckheere (2014), además se midió la salinidad de agua, cuyo valor en todos los sitios fue de 0. Hasta el momento solamente se ha encontrado a *N. fowleri* en aguas dulces, según lo reporta (Visvesvara, 2010).

Cuadro 2. . Rangos: temperatura ambiente, oxígeno disuelto y pH

Sitios	Temperatura ambiente (°C)	OD (mL/L) *	pH
La Isleta	24 – 35.7	3.13 – 7.92	7.79 - 8.28
Las Palmas	27 – 38	7.31 – 10.1	8.11 – 9.02
Agua Caliente	31.4 – 35.8	1.27 – 4.04	7.34 – 8.7
Laguna del Naínari	35.2 – 38	5.38 – 7.7	7.26 – 8.77

*OD: Oxígeno disuelto

4.2 Técnica de PCR (*Naegleria fowleri*)

Se eligieron las 172 cepas que fueron termofílicas y positivas a flagelación y se les realizó la técnica de PCR para determinar si pertenecían a la especie *N. fowleri*, resultando un total de 22 positivas (cuadro 3).

Cuadro 3. Resultado de cepas positivas a *N. fowleri*.

Cepas	Lugar	Repetición	Volumen	<i>N. fowleri</i>	Tubeo*
1	Las Palmas	3.1	10	+	A7
2	Las Palmas	5.1	100	+	A8
3	Las Palmas	3.1	100	+	A11
4	Las Palmas	3.1.4	100	+	A12
5	Las Palmas	4.1	100	+	A13
6	Laguna del Náinari	5.2	100	+	S7
7	Laguna del Náinari	3.1	100	+	S9
8	Las Palmas	4.1	100	+	S10
9	Laguna del Náinari	2.1	100	+	S11
10	Las Palmas	4.2	100	+	S12
11	La Isleta	4.1	10	+	S16
12	Laguna del Náinari	1	100	+	S19
13	Laguna del Náinari	5.1	100	+	S21
14	Las Palmas	3.3	100	+	S27
15	Las Palmas	5.4	100	+	S28
16	Las Palmas	3.1	100	+	S29
17	Laguna del Náinari	2.1	10	+	S30
18	Laguna del Náinari	4.1	100	+	S31
19	Agua Caliente	5.1	100	+	O15
20	Agua Caliente	1.2	100	+	O17
21	Agua Caliente	1.6	10	+	O18
22	Agua Caliente	5.2	10	+	O19

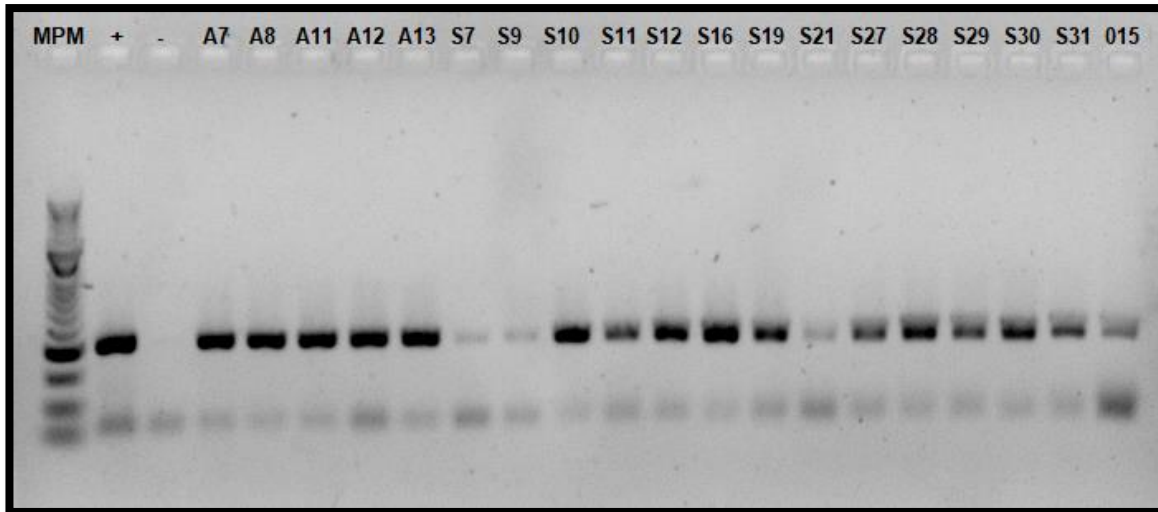
* La letra del tubo indica el mes (A es agosto)

En el cuadro 3 se muestran, el lugar, mes de muestro, repetición, volumen y el nombre de la cepa. En total, se presentó una cepa positiva en La Isleta, diez cepas en Las Palmas, cuatro cepas en Agua Caliente y siete cepas en la laguna del

Náinari. Los meses que presentaron cepas positivas fueron agosto con un total de cinco, septiembre con 13 y octubre con cuatro. Estos tres meses se caracterizan por ser calurosos, factor muy importante para la proliferación de esta especie de amiba. El mes de octubre es donde comienza el descenso de temperatura en la región, sin embargo, se obtuvieron cuatro cepas positivas. El lugar donde se aislaron estas cepas fue en aguas termales (Agua Caliente), donde la temperatura se mantiene por encima de los 40 °C, siendo este un factor determinante para la presencia de esta especie termofílica. *N. fowleri* ya había sido anteriormente identificada en nuestra región por Lares-Villa y Hernández-Peña en 2010 durante los meses de agosto, septiembre, incluso en octubre cuando la temperatura había disminuido considerablemente; se aislaron 19 cepas positivas de un total de 92 cepas, en parques recreativos del sur de Sonora (La Isleta y Las Palmas).

En la figura 6, se muestra el resultado de los productos de PCR positivos a *N. fowleri* mediante la electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se observa en extremo izquierdo el marcador de peso molecular (MPM); el siguiente pozo corresponde al control positivo de *N. fowleri* proveniente de un cultivo axénico del Laboratorio de Biología Molecular y el siguiente representa el control negativo en el siguiente pozo.

Todas pertenecen a la especie *N. fowleri*, ya que en el gel se visualizan 19 bandas con una longitud similar de entre 300 a 350 pb (pares de bases). Tres bandas (S7, S9, S21) se ven de manera más tenue esto se puede deber a la baja concentración de ADN, según Herráez (2014) es una posible causa.

Figura 6. Resultados de PCR a *N. fowleri*.

4.3 Técnica de PCR (*Naegleria* spp.)

Las 150 cepas termofílicas y positivas a flagelación fueron sometidas a la técnica de PCR para determinar si pertenecían a el género *Naegleria* spp, resultando un total de 19 negativas y 131 positivas. Las negativas posiblemente sean de la clase Heterolobosea, ha sido establecida para amibas que muestran transformación a una etapa de flagelación temporal según reporta De Jonckheere (2008). La descripción de los datos se pueden observar en el cuadro 4.

Fueron un total de 19 cepas negativas a *Naegleria* spp., seis de La Isleta, una de Las Palmas, seis de Agua Caliente, seis de la laguna del Náinari. Los aislamientos fueron de los meses, julio con diez cepas, agosto con cinco cepas, septiembre con una cepa y octubre con tres cepas. Al ser negativa, son amibas son similares a el género *Naegleria* spp. en su morfología y temperatura de crecimiento, para saber a qué género pertenecen estas cepas, se deberán ser secuenciadas.

En estudios realizados por Lares-Jiménez y Lares-Villa (2009), no se encontró la presencia de *N. fowleri*, anteriormente se había realizado otro estudio por Guzmán-

Fierros *et al.*, (2008) que también resulto negativo para *N. fowleri* pero al momento de secuenciar las cepas se encontró que se trataba de la especie *N. lovaniensis* (no patógena), que requieren la misma temperatura para su crecimiento y en la mayoría de los casos se encuentran juntas en el medio ambiente, siendo considerada como indicador de la presencia de *N. fowleri* (De Jonckheere, 2011).

Cuadro 4.Resultado de cepas negativas a *Naegleria* spp.

Cepas	Lugar	Repetición	Volumen	<i>Naegleria</i> spp.	Tubeo*
1	Agua Caliente	4.1	100	-	J16
2	Las Palmas	3.1	100	-	J17
3	Agua Caliente	5.2	100	-	J18
4	Las Palmas	1.1	100	-	J110
5	La Isleta	1.2	100	-	J123
6	La Isleta	3.1	100	-	J128
7	La Isleta	4.1	100	-	J129
8	Agua Caliente	3.2	100	-	J130
9	Agua Caliente	4.1	10	-	J131
10	Agua Caliente	5.2	10	-	J132
11	La Isleta	4.3	100	-	A2
12	La Isleta	2.3	100	-	A6
13	Las Palmas	1.1	100	-	A10
14	Las Palmas	1.1	10	-	A14
15	Las Palmas	1.1	10	-	A16
16	Laguna del Náinari	4	1	-	S32
17	La Isleta	3.2	10	-	O8
18	Agua Caliente	1.3	10	-	O21
19	Las Palmas	2.2	100	-	O36

* La letra del tubo indica el mes (A es agosto)

V. CONCLUSIÓN

Se cumplió parcialmente la hipótesis planteada, debido a que en todos los sitios de muestreo se encontró la especie *N. fowleri*, pero no hubo relación con la temperatura del agua. Estos resultados que señalan que los sitios muestreados no son seguros para su uso recreativo; habría que poner atención debido al riesgo que representa al ser en los meses de verano cuando más personas recurren a estos lugares por el calor de la región.

Es la primera vez que se reporta *N. fowleri* en la Laguna del Náinari, que es uno de las principales zonas turísticas de la ciudad y en Agua Caliente, por cuya aparente propiedades curativas del agua, es visitado todo el año por las personas de la región y además de turistas que se dan cita en el lugar. Al ser aguas termales la temperatura siempre es óptima para la amiba patógena por lo que sería importante seguir monitoreando este sitio.

Debido a que cerca del 13% de las muestras analizadas fueron positivas a *N. fowleri*, se debe extremar precauciones con las personas que visitan estos sitios; es recomendable que no se sumerjan en las aguas, por lo que implementar avisos físicos en los lugares y además dar aviso a través de los medios de comunicación puede prevenir a la población de contraer la infección.

REFERENCIAS

1. Abdul Majid, M., Mahboob, T., Mong, B., Jaturas, N., Richard, R., Tian-Chye, T. ... Nissapatorn, V. (2017). Pathogenic waterborne free-living amoebae: an update from selected Southeast countries. *PLoS one*, 12(2), 1-6.
2. Bellini, N.K., Santos, T.M., Alves da Silva, M.T., y Thiemann, O. (2018). The therapeutic strategies against *Naegleria fowleri*. *Experimental Parasitology*, 187, 1-11.
3. Centers for Disease Control and Prevention (CDC), (2018). Case Report Data y Graphs. Retrieve August 28, 2018, from <https://www.cdc.gov/parasites/naegleria/graphs.html>.
4. da Rocha-Azevedo, B. Tanowitz, H., y Marciano-Cabral, F. (2009). Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2009, 1-14.
5. DATABIO. (2015). *Naegleria fowleri*, Fichas de agentes biológicos, DB-P-N.f-15. Recuperado el 28 de Agosto, 2018, de <http://www.insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Naegleria%20fowleri%202016.pdf>.
6. De Jonckheere J.F. (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Protozool*, 41(1), 309-342.
7. De Jonckheere, J.F. (2004). Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protis*, 155(1), 89-103.
8. De Jonckheere, J.F. (2008). Heterolobosea Page y Blanton 1985. Versión 21 september, 2008. Retrieve August 31, 2018, from <http://tolweb.org/heterolobosea796360/2008.09.21>.
9. De Jonckheere, J.F. (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11 (7), 1520-1528.
10. De Jonckheere, J.F. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*?. *Experimental Parasitology*, 145, 2-9.

11. Fero, K. (2010). *Naegleria fowleri*. Stanford University. Retrieve August 28, 2018, from https://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2010/Katherine_Fero/FeroNaegleriafowleri.htm.
12. Goswik, C., y Brenner, G. (2003). Activities of therapeutic agents against *Naegleria fowleri* in vitro and in a murine model of primary amebic meningoencephalitis. *Journal of Parasitology*, 89(4), 837-842..
13. Grace, E., Asbill, S., y Virga, K. (2017). *Naegleria fowleri*: Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment Options. *Antimicrob Agents Chemother*, 59, 6677–6681.
14. Guzmán-Fierros, E., De Jonckheere, J.F., y Lares-Villa, F. (2008). Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos en Hornos, Sonora. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 79(1), 1-5.
15. Heekyoung, K., Gi-Sang, S., Hae-Jin, S., Jong-Hyun, K., Sang-Eun, L., Mi Yeoun, P., Won-Ja, L., y Ho-Joon, S. (2015). Effective PCR-based detection of *Naegleria fowleri* from cultured sample and PAM-developed mouse. *European Journal of Protistology*, 51(5), 401-408.
16. Herráez, A. (2014). Plásmidos en electroforesis. Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, España. Recuperado el 3 de septiembre, 2018, de <http://biomodel.uah.es/an/plasmido/inicio.htm>.
17. Hinestroza, B. (2010). Acercamiento al estado actual de meningoencefalitis amebiana primaria en Colombia producida por *Naegleria fowleri* (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
18. Ithoi, I., Ahmad, A. F., Nissapatorn, V., Lau, Y. L., Mahmud, R., y Mak, J. W. (2011). Detection of *Naegleria* species in environmental samples from Peninsular Malaysia. *PLoS One*, 6(9), e24327.
19. Kilvington, S., y Beeching, J. (1995). Developmet of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(10), 3764-3767.

20. Lares-Jiménez L.F. y Lares-Villa F. (2009). Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora, *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 5(2), 161-167.
 21. Lares-Villa, F., y Hernández-Peña. (2010). Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007- October 2008). *Experimental Parasitology*. 126(1), 33–36.
 22. Marciano-Cabral, F. y Cabral G. (2007). The immune response to *Naegleria fowleri* amebae and pathogenesis of infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 51, 243–259.
 23. Marciano-Cabral, M., MacLean, R., Menseh, A., y LaPat-Polasko, L. (2003). Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 5864-5869.
 24. Martinez, A.J. (1985). Free-living amebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology, and treatment of disease. CRC press, Florida, E.U.A
 25. Morgan, J., Halstrom, S., Wylie, J., Walsh, T., Kaksonen, A., Sutton, D., Braun K y Puzon G. 2016. Characterization of drinking water distribution pipeline terminally colonized by *Naegleria fowleri*. *Environmental Science and Technology*, 50(6), 2890-2898.
 26. Muñoz, V., Reyes, H., Toche, P., Cárcamo, C., y Gottlieb, B. (2003). Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitología latinoamericana*, 58(3-4), 106-111.
 27. Oddó, D. (2006). Infecciones por amebas de vida libre.: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. *Revista chilena de infectología*, 23 (3), 200-214.
 28. Peralta, M., y Ayala, J. (2009). Amibas de vida libre en seres humanos. Docentes del área de Morfofisiología. *Salud Uninorte*. 25 (2), 280-292. Recuperado el 29 de agosto, 2018, de <http://rcientificas.uninorte.edu.co/index.php/salud/article/viewArticle/219/578>
- 4.

29. Pérez de Galindo, M., Galindo, M., Dorta, A., Guzmán, C., Wagner, C., Vethencourt, M., Nessi, A., Bermúdez, A., y Pérez de Suárez, E. (2012). Hallazgos de Amibas de Vida Libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. *Academia Digital Biomédica*, 51, 1.
30. Réveiller, F.L., Cabanes, P.A., y Marciano-Cabral, F. (2002). Development of a nested PCR to detect the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Res*, 88, 443-450.
31. Rondanelli, E.G. (1987). Infectious diseases color atlas monographs 1. Amphizoic amoeba human pathology. PICCIN, Italy.
32. Schuster, F. (2010). Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* asociated with a case of Amebic Encephalitis. *J.Clin. Journal of Clinical Microbiology*, 41(7), 3175-3180.
33. Schuster, F., De Jonckheere, J., Moura, H., Sriram, R., Garner, M., y Visvesvara, G. (2003). Isolation of thermotolerant *Paravahlkampfia* sp. from lizard intestine: biology and molecular identification. *Journal of Eukaryotic*. 50, 373–378.
34. Siddiqui, R., Karim, I., Cope, J., y Ahmed K. (2016). Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*, *Acta tropica*, 164, 375-394.
35. Solarte, Y., Peña, M., y Madera, C. (2006). Transmisión de protozoarios patógenos a través del agua para consumo humano. *Redalyc.org*, 37(1), 1-7.
36. Tilak, R., Tilak, V., Singh, D., Rai, M., Agarwal, S., y Gulati, A., (2008). Primary amoebic meningoencephalitis relatively undiagnosed public health problem. *Indian J. Prev. Soc. Med.* 39(3), 178-180.
37. Trabelsi, H., Dendana, F., Neji, S., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Makni F y Ayadi, A. (2016). Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. *Parasitology Research*, 115(1): 431-5.

38. Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. y Ayadi, A. (2012). Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*, 60(6): 399-405.
39. Uribarren, T. (2017). *NAEGLERIA, ACANTHAMOEBA, BALAMUTHIA*. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Recuperado el 31 de agosto, 2018, de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html>.
40. Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A., Licea-Amaya, L., Lara-Castro, F., Holguín-Soto, R. y Lares-Villa, F. (2005). Successful treatment of Naegleria fowleri meningoencephalitis by using intravenous amphoteric B, fluconazole and rifampicin. *Archives of Medical Research official journal of the Instituto Mexicano del Seguro Social*, 36(1), 83-86.
41. Visvesvara, G., (2010). Amebic meningoencephalitis and Keratitis: Challenges in diagnosis and treatment. *Wolters Kluwer Health*, 23, 590-5.
42. Visvesvara, G., Moura, H. y Schuster, F. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 50(1), 1-26.
43. Yoder, J., Straif-Bourgeois, S., Roy, S., Moore, T., Visvesvara, G., Ratard, R.,... Beach, M. (2012). Primary amebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clinical Infectious Diseases*, 55(9), 79-85.