Naegleria lovaniensis: la especie termofílica más abundante del género *Naegleria* en el noroeste de México

L. N. Espinoza-Gerardo[1], L.F. Lares-Jiménez[2], L.Z. Rodríguez-Anaya[3], J.R. González-Galaviz[3], F. González-Peraza[4], F. Lares-Villa[2 *]

[1]*Departamento de Ciencias de la Salud, UNISON Campus Cajeme.*
[2]*Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias.*
[3]*CONACYT-ITSON.*
[4]*Laboratorio de Diagnóstico Integral de Patología Animal. Instituto Tecnológico de Sonora, 5 de Febrero 818 Sur, Colonia Centro CP 85000, Ciudad Obregón Sonora México*

Naegleria lovaniensis*: the most abundant thermophilic species of the genus* Naegleria *in northwestern Mexico.*

Abstract

We performed two searches for the presence of the *Naegleria fowleri* in 14 irrigation canals of the Yaqui Valley and a hot spring in March 2015 and July 2016. The incubation temperature was set at 45 °C. We obtained 13 *Naegleria* isolates, 8 PCR products were sequenced for final identification and all of them were *Naegleria lovaniensis*. This result, combined with the previous and subsequent ones, shows us that this species of *Naegleria* is the most abundant in the region.

Key words: Free-living amoebae, environmental distribution, biodiversity.

Resumen

Realizamos dos búsquedas de la presencia de *Naegleria fowler*i en 14 canales de riego del Valle del Yaqui y una fuente termal en marzo de 2015 y julio de 2016. La temperatura de incubación se fijó a 45 °C. Se obtuvieron 13 aislamientos de *Naegleria*, se secuenciaron 8 productos de PCR para la identificación final y todos ellos fueron *Naegleria lovaniensis*. Este resultado, combinado con los anteriores y los posteriores, nos muestra que esta especie de *Naegleria* es la más abundante en la región.

Palabras claves: Amibas de vida libre, distribución ambiental, biodiversidad.

*Autores de correspondencia
Email: fernando.lares@itson.edu.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)

Introducción

El género *Naegleria* consta de al menos 47 especies publicadas. De éstas, se ha encontrado que las especies *N. fowleri*, *N. australiensis,* y *N. itálica*, son patógenas para animales de laboratorio, y hasta ahora sólo *N. fowleri* es la única capaz de infectar a los humanos (De Jonckheere, 2011). *N. fowleri* causa una infección hemorrágica aguda y fulminante, llamada meningoencefalitis amebiana primaria (PAM), en niños inmunocompetentes y adultos jóvenes con antecedentes recientes de natación (Siddiqui *et al*., 2016).

Las tres especies patógenas mencionadas anteriormente son termofílicas, pero no todas las especies termofílicas del género *Naegleria* son patógenas. Existen 12 especies consideradas como termofílicas, debido a que cumplen la característica de crecer a temperaturas mayores de 40 °C y hasta 45 °C, como lo hace *N. fowleri*, aunque otros investigadores consideran que el término debería aplicarse a especies que crecen a temperaturas por arriba de 42 °C (De Jonckheere, 2002). Fue Griffin en 1972 quien observó que *N. fowleri* podía crecer a temperaturas hasta 45 °C, mientras que las especies no patógenas no lo hacían, por lo que muchos investigadores comenzaron a utilizar dicha temperatura para favorecer el aislamiento de *N. fowleri* y evitar el crecimiento de otras especies no patógenas.

N lovaniensis, identificada principalmente como 'una variante no patógena' de *N fowleri* debido a que cepas aisladas del medio ambiente, reaccionaron positivamente a anticuerpos contra *N. fowleri*, pero no fueron patógenas para animales de experimentación. *N lovaniensis* comparte con *N. fowleri* varias características biológicas: la termofilia debido a que crece a 45 °C, la capacidad de axenización aunque no tan rápido como lo hace *N. fowleri*, y reactividad cruzada antigénica. Pero en contraste, parece estar genéticamente bien diferenciada, y sin embargo, estas dos especies están estrechamente relacionadas filogenéticamente (De Jonckheere, 2002), y también se ha estudiado como modelo para comprender la patogenicidad de su pariente muy cercano *N. fowleri* (De Jonckheere, 2014).

En marzo de 2015 y julio y de 2016, se tomaron muestras de 14 canales de riego del Valle del Yaqui y de una fuente termal, para la búsqueda de *Naegleria fowleri* en sitios noexplorados y en meses del año cuyas temeraturas son muy diferentes.

Materiales y métodos

Muestreo

Se tomaron muestras de agua de canales y la fuente termal, que cubrieran todo el Distrito de Riego del Valle del Yaqui y que incluían sitios no estudiados previamente. Se utilizaron botellas de plástico estériles de un litro de volumen, y previa remoción del sedimento de las paredes de los reservorios, se tomaron las muestras. Se registró la temperatura del agua y la ambiental y se llevaron al laboratorio resguardadas del sol y a temperatura ambiente para su procesamiento.

Procesamiento de muestras

Las muestras se homogenizaron por agitación vigorosa manual entre 30 y 60 segundos para asegurarse el desprendimiento de las amibas en las paredes de recipientes. Se pasaron aproximadamente 50 ml a un tubo estéril de fondo cónico y se centrifugó a 1700 r.p.m. durante 10 minutos en una centrífuga Labnet Hermle Z383K refrigerada (Woodbridge, Nueva Jersey). El sedimento se vertió en placas de Petri con agar no nutritivo cubierto con una capa de Escherichia coli (NNE), y la temperatura de incubación se fijó a 45 °C, para la búsqueda de *N. fowleri* y otras amebas termofílicas.

Aislamiento de amibas

Los cultivos se observaron antes de las 24 horas y las amibas que crecieron se resembraron las veces necesarias hasta obtener cultivos puros, utlizando un microscopio invetrido marca Zeiss. Posteriormente a todos los aislamientos sospechosos de pertenecer al género *Naegleria* se les realizó la prueba de transformación ameboflagelar, agregando directamente a los cultivos monoxénicos agua destilada e incubando a 37 °C durante 1 a 4 horas para la búsqueda de formas flageladas en el microscopio. A las cepas que flagelaron se les extrajo el DNA para su identificación por PCR en punto final.

Extracción de ADN

El ADN se extrajo de las amibas que crecen en cultivos monoxénicos, utilizando el kit de extracción DNeasy (Qiagen, Inc., Valencia, CA, EE. UU.), seguido de la medición de la

concentración de ADN con un NanoDrop Espectrofotómetro 2000c (Thermo Scientific, EE. UU.).

Identificación

Los conjuntos de cebadores específicos para género y especie utilizados para las amibas aisladas fueron: NFITSFW 5′-TGAAAACCTTTTTTCCATTTACA-3′ y NFITSRV 5′-AATAAAAGATTGACCATTTGAAA-3' para *N. fowleri* (De Jonckheere, 2011), y ITS1 5′-GAACCTGCGTAGGGATCATTT-3′ / ITS2 5′-TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA-3′ (Pelandakis *et al*., 2000) para *Naegleria* spp. Para el primer muestreo sólo se usaron los cebadores para *N. fowler*i y para el segundo se utilizaron ambos pares de cebadores.

Secuenciación

Las cepas positivas a *Naegleria* spp. y negativas a *N. fowleri*, se prepararon para su identificación por secuenciación genética.

Los productos de PCR se purificaron utilizando el kit de purificación de PCR QIAquick (QIAGEN, Alemania), siguiendo el protocolo del fabricante y secuenciado en ambas direcciones. Cuando se obtuvo la secuenciación cíclica, fue Purificado utilizando columnas Centri-Sep ™ (Life Technologies, EE. UU.). Una vez el La muestra estaba limpia, comenzó el proceso de secuenciación. La secuenciación fue realizada en un analizador genético ABI PRISM® 310 (Foster City, CA, ESTADOS UNIDOS). Las secuencias fueron editadas y alineadas usando Mega 5.0 (Tamura *et al*., 2011). Se realizaron análisis filogenéticos utilizando la metodología. descrito por Reyes-Batlle *et al*. (2014), con Mega 5.0.

Resultados y discusión

Se realizaron 2 muestreos de agua de canales y sitios recreativos del Distrito de riego del Valle del Yaqui, en diferentes temporadas de años diferentes (invierno y verano), y los nombres de los sitios seleccionados, así como las temperaturas ambiental y del agua, el número de aislamientos a 45 °C y las cepas que dieron positivas a la prueba de transformación flagelar, aparecen en la tabla 1. Las temperaturas registradas en primavera y verano

Tabla 1. Lugares de muestreo, temperaturas tomadas, aislamientos y número de ameboflagelados.

Muestra	Lugar de muestreo	Temperatura ambiental (°C)		Temperatura del agua (°C)		Número de aislamientos		Transformación flagelar (+)	
		Marzo 2015	Julio 2016	Marzo 2015	Julio 2016	Marzo 2015	Julio 2016	Marzo 2015	Julio 2016
1	Bacame	25	36.5	23	31.2	2	4	-	-
2	Buaysiacobe	25	36.6	23	35.2	1	5	-	1+
3	Villa Juárez	25	36.5	21	32	1	6	-	1+
4	Col. Jecopaco	25	37	23	33.2	1	2	-	-
5	Quetchehueca	20	35	21	31.6	1	3	-	-
6	Tobarito	26	36.4	23	34.9	2	2	1+	-
7	Pueblo Yaqui	19	37.2	22	33	2	9	-	1+
8	S. Ignacio R.M.	27	38.2	24	31.8	2	2	1+	-
9	S. José de Bácum	26	40	23	29.1	1	2	-	-
10	Bácum	26	38	23	31.3	1	6	-	1+
11	Providencia	25	37	24	28.1	3	5	-	1+
12	Cócorit	25	38	22	28.5	1	2	-	-
13	Paseo Isleta	23	35.5	20	36.4	4	2	2+	-
14	Paseo Las Palmas	23	35	21	31.2	3	6	-	1+
15	Agua Caliente	24	34	46	46	5	29	+	2+

alcanzan diferencias mayores a 10 °C tanto en las temperaturas ambientales, como en las alcanzadas en el agua muestreada. Se observa también que el número de aislamientos obtenidos a la temperatura de primocultivo fue de 30 aislamientos y la prueba de transformación flagelar dió como resultado cinco aislamientos positivos. Los cinco aislamientos fueron de los lugares: Tobarito, San Ignacio Río Muerto, Paseo la Isleta y la fuente termal "Agua Caliente".

En el muestreo dos, se obtuvieron 85 aislamientos que crecieron a 45°C, en la prueba de transformación flagelar dieron positivos ocho cepas de los lugares de: Buaysiacobe, Villa Juárez, Pueblo Yaqui, Bácum, Providencia, Paseo Las Palmas y de nuevo Agua Caliente.

En el primer muestreo se obtuvieron 5 muestras de positivas a transformación flagelar, a las que se realizó PCR, para determinar si las muestras correspondían a *Naegleria fowleri*, resultando todas ellas negativas. En el segundo muestreo se obtuvieron 8 muestras de transformación flagelar positiva, igualmente con resultado negativo a *Naegleria fowleri* por PCR.

Para el segundo estudio, se realizó un PCR para *Naegleria* spp., corroborando la identificación de las cepas a nivel de género, por lo se mandaron a secuenciar para determinar de a qué especie o especies correspondían, dando como resultado que todas las cepas aisladas se identificaron como *Naegleria lovaniensis* (Figura 1). Este resultado apoya la sospecha que aún se puede encontrar *Naegleria fowleri* en estos lugares, pues estas dos amibas tiene en común, la forma, el crecimiento a 45°C y que flagelan, inclusive ambas especies han sido encontradas en los mismos sitios y tienen distribución global (De Jonckheere, 2002, 2014). Agua caliente resultó ser el único sitio de donde se aislaron naeglerias termofílicas, debido seguramente a la temperatura del agua que alcanza hasta los 40 °C, y de ese mismo lugar se aislaron otras 23 cepas identificadas como *N. lovaniensis* en un estudio

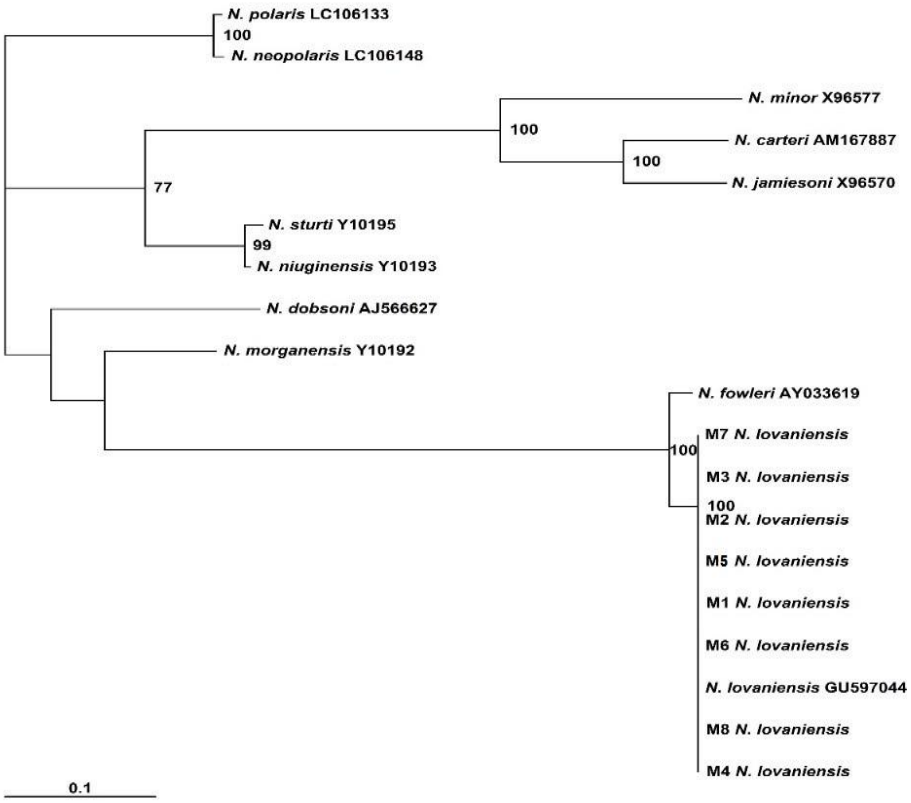


Figura 1. Identificación filogenética de muestras (1 a 8) positivas a *Naegleria* spp.

realizado en febrero de 2017 (Lares-Jiménez *et al*., 2018). En un estudio genético comparativo realizado para complementar este trabajo, se compararon las secuencias de las ocho cepas identificadas como *N. lovaniensis*, además de las 23 obtenidas en agua caliente, y todas exhibieron una coincidencia del 100% de identidad con la cepa X96598.1 del Genbank, lo cual nos habla de su tremenda homogeneidad genética. En Guzmán *et al*. (2008), se reporta la diferencia de un par de bases, una deleción de T en el pb 80 de la secuencia ITS2, de una cepa de *N. lovaniensis* de las 9 aisladas en aisladas en La Isleta, Las Palmas y Agua Caliente, tres de los sitos muestreados en este estudio y el reporte de *N. tihangensis* cepa termofílica que crece a 42 °C. Como hemos podido notar la frecuencia de aislamientos de *N lovaniensis* en nuestra región es muy alta, y sólo cuando la temperatura de primo aislamiento se baja, es posible aislar a otras cepas termofílicas que también existen.

Conclusiones

La importancia de determinar *Naegleria fowleri* en la región del Valle del Yaqui es aportar datos epidemiológicos y ecológicos, ya que sirven como prevención para aquellos lugares donde se puede proliferar esta amiba, pues es termófila y patógena para el ser humano, además que puede resistir cambios ambientales, por lo que los sitios recreativos y canales de riego son hábitats ideales para *Naegleria fowleri*.

La presencia de *Naegleria lovaniensis* nos indica, por su abundancia en aislamientos, que se debería de seguir estudiando estos lugares, para que personas de zonas tanto rurales y urbanas, tengan un cuidado al momento de entrar a las aguas de estos sitios, pero enfatizar a las personas de ubicación rural ya que por falta de agua en los lugares donde viven, acuden a estos canales y sitios recreativos para bañarse o bien realizar actividades domésticas, por lo que son los más vulnerables para poderse infectarse con *Naegleria fowleri*.

Referencias

De Jonckheere JF. 2014. What do we know by now about the genus *Naegleria*? Exp Parasitol., 145:S2–9.

De Jonckheere, 2011. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. Infect. Genet. Evol. 11, 1520–1528. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.023.

De Jonckheere, J.F. 2002. A Century of Research on the Amoeboflagellate Genus *Naegleria.* Acta Protozool., 41: 309 – 342.

Guzmán-Fierros, E., De Jonckheere, J.F., Lares-Villa, F., 2008. Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos en Hornos, Sonora. Rev. Mexic. Biodivers. 79, 1–5.

Lares-Jiménez, L.F., Borquez-Román, M.A., Lares-García, C., Otero-Ruiz, A., Gonzalez-Galaviz, J.R., Ibarra-Gámez, J.C., Lares-Villa, F. Potentially pathogenic genera of free-living amoebae coexisting in a thermal spring. Experimental Parasitology 195: 54-58, 2018. doi.org/10.1016/j.exppara.2018.10.006

Pelandakis, M., Serre, S., Pernin, P., 2000. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in *Naegleria* spp. and in *N. fowleri*. J. Eukaryot. Microbiol. 47, 116–121. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00020.x.

Reyes-Batlle, M., Todd, C.D., Martín-Navarro, C.M., López-Arencibia, A., Cabello-Vilchez, A.M., González, A.C., Córdoba-Lanús, E., Lindo, J.F., Valladares, B., Piñero, J.E., Lorenzo-Morales, J., 2014. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. Parasitol. Res. 113 (4), 1383–1388. https://doi.org/10.1007/s00436-014-3778-z.

Siddiqui R., Ali, I.K.M., Cope, J.R., Khan, N.A., 2016. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. Acta Trop. 164, 375-394. https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.09.009

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol. Biol. Evol. 28 (10), 2731–2739.https://doi.org/10.1093/molbev/msr121