



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

BO 1328/97
g:3

**ESTUDIO COMPARATIVO DE LA PRESENCIA
DE ANTICUERPOS CONTRA *Naegleria fowleri*
EN SUEROS Y SALIVAS DE TRES POBLACIONES**

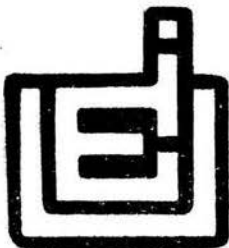
TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

SAUL ROJAS HERNANDEZ



LOS REYES IZTACALA

1997



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (cama) de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Rivera Aguilar; con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), proyecto # IN207994

Agradecimientos:

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Víctor Rivera por su apoyo, dedicación, y paciencia para realizar este trabajo.

Le agradezco a la Bióloga Gabriela Oliver por su invaluable ayuda durante el desarrollo de este trabajo.

Le agradezco al Biólogo David Pantaleon su disposición para expresar comentarios y sugerencias durante la elaboración de este trabajo.

Y al Laboratorio de Microbiología Ambiental del Proyecto CyMA por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo.

Dedicatoria:

A mis padres por su comprensión, esfuerzo y apoyo durante todos estos años

A Ursulita por ser la alegría de todos mis días

A mis hermanos por toda su ayuda y por creer en mí

Y gracias a todas aquellas personas que de alguna manera u otra participaron en este trabajo.

**Dedico este trabajo a mi esposa Ursula
por todo su amor y por estar siempre conmigo.**

Yo vine creciendo y me forme
Cual mi generación distinta a la de ayer
Soy intimidad de mi niñez
Que es hija del sudor de los brazos que ame

Soy como quisiera ser
Pero tratando de ser yo
ni menos mal
pero en verdad ni menos bien

No ha sido fácil tener una opinión
que haga valer mi vocación
Mi libertad para escoger

Vamos a ver lo que en un futuro tenga que acontecer
Tengo al sentir el más puro florecer
Amame sin temor alguno que yo he de prometer
Fidelidad a mi modo de ser

Yo sólo tengo la razón de quien quisiera ser
Mejor que lo de ayer
Yo pongo en tu corazón
Con toda mi virtud mi egoísmo también

Sufre el error que cometeré
Goza también lo que de bien se ha de lograr sin pretender
Sube conmigo a encontrar el escalón que evocaré
Para llegar a ese lugar que un día soñé

Vamos a ver lo que en un futuro tenga que acontecer
Tengo al sentir el más puro florecer
Amame sin temor alguno que yo he de prometer
Fidelidad a mi modo de ser

A LA MEMORIA DE FERNANDO ROJAS HERNANDEZ

1 JUNIO 1969-18 MARZO 1990

Mi unicornio azul ayer se me perdió
Pastando lo deje y desapareció
Cualquier información bien la voy a pagar
Las flores que dejó no me han querido hablar

Mi unicornio azul ayer se me perdió
No se si se me fue, no se si se extravió
Y yo no tengo más que un unicornio azul
Si alguien sabe de el le ruego información
Cien mil o un millón yo pagaré

Mi unicornio azul se me ha perdido ayer
Se fue

Mi unicornio y yo hicimos amistad
Un poco con amor, un poco con verdad
Con su cuerno de añil pescaba una canción
Saberla compartir era su vocación

Mi unicornio azul ayer se me perdió
Y puede parecer acaso una obsesión
Pero no tengo más que un unicornio azul
Pero aunque tuviera dos yo solo quiero aquel
Cualquier información la pagaré

Mi unicornio azul se me ha perdido ayer
Se fue

INDICE

	Página
Resumen	1
Introducción	2
1. Generalidades	2
2. Ubicación taxonómica	2
3. Morfología y ciclo de vida	3
4. Relación huésped parásito	4
Antecedentes	6
Objetivos	10
Material y métodos	11
a. Poblaciones de estudio	12
b. Obtención de las muestras	12
c. Preparación del antígeno amebiano	12
d. Cuantificación de los niveles de anticuerpos (Técnica de ELISA)	13
e. Detección de proteínas (Técnica de inmunoblots)	13
f. Estadística	15
Resultados	16
Análisis de resultados	31
Conclusiones	35
Bibliografía	36
Apéndice I	40
Apéndice II	43

RESUMEN

Naegleria fowleri es una ameba anfitriónica causante de una enfermedad del sistema nervioso central, fatal y fulminante, conocida como meningoencefalitis amebiana primaria. Esta ameba ha sido aislada de diferentes cuerpos de agua, en San Luis Potosí, Michoacán, Morelos, Hidalgo, Estado de México, Querétaro, Ciudad de México y Baja California Norte. Hasta 1993 se han reportado 40 casos de esta enfermedad, en Mexicali, en la zona fronteriza del Río Bravo y probablemente en la Huasteca Potosina. Debido a esto, fueron analizadas muestras de suero y de saliva de tres poblaciones de la Ciudad de México, San Luis Potosí y Ciudad Valles S.L.P. (Control, Donadores y enfermos), a través de la técnica de ELISA e Inmunoblots, para determinar la presencia de anticuerpos (IgA, IgG e IgM) en estas muestras contra antígenos de *Naegleria fowleri*. La existencia de diferencias significativas entre las tres poblaciones, y la presencia de un posible patrón de reconocimiento de las proteínas de *N. Fowleri* por los anticuerpos presentes en las muestras de suero y saliva, mostró que el grupo de enfermos fue el que presentó el mayor porcentaje de muestras positivas, luego el de donadores y por último el grupo control. Las proteínas más frecuentemente reconocidas por los diferentes anticuerpos presentes en las muestras de suero y saliva de las tres poblaciones, fueron las de aproximadamente: 10, 14, 23, 33, 42, 46, 50, 57, 67, 75, 85, 90, 95, 107, y 125 Kd. Las diferencias encontradas entre los tres grupos pueden ser debidas al grado de exposición de las poblaciones a *N. fowleri*, o bien, pueden representar reacciones cruzadas de anticuerpos con otros antígenos.

INTRODUCCION

1. GENERALIDADES:

Los protozoarios pertenecen al Reino Protista, son organismos unicelulares que no forman órganos ni tejidos, con formas sumamente variadas y tamaños que oscilan entre los 10 μm y 3 mm, pueden ser solitarios o coloniales. Los protozoarios se han adaptado a prácticamente todos los hábitats posibles y abundan principalmente donde hay una película de agua o humedad. Muchas especies presentan diversos grados de asociación con otros organismos de la escala filogenética (Elias y Martínez, 1985; Kudo, 1969).

Un grupo importante dentro de los protozoarios es el de las amebas, las cuáles pueden ser de vida libre o parásitas. *Entamoeba histolytica* es un buen representante de las amebas parásitas, ésta ameba es parásito obligado del hombre y tiene una distribución prácticamente universal, se ha calculado que la amebiasis producida por este protozoario, afecta más o menos al 20% de la población mundial (Camacho, 1986).

Las amebas de vida libre de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* son capaces de causar enfermedades en los humanos y otros animales. Estas amebas normalmente no causan enfermedades porque viven como fagótrofos en estanques, ríos, arroyos, y lagos, donde se alimentan de bacterias. Sin embargo, como oportunistas pueden producir serias infecciones en los ojos y en el sistema nervioso central (SNC). Se ha propuesto el término anfizoico para describir la habilidad de estas amebas para vivir en dos tipos de ambientes, como organismos de vida libre y como endoparásitos (Page, 1974).

Naegleria fowleri es capaz de producir una infección fatal en el SNC, llamada meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP). La infección ocurre frecuentemente en gente joven con una reciente historia de natación en aguas dulces. Otra especie de *Naegleria*, *N. australiensis*, es patógena en ratones, pero no ha estado asociada a infecciones humanas (John, 1993).

Algunas especies de *Acanthamoeba* pueden producir una infección crónica en el SNC llamada encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) o infección en el ojo, conocida como queratitis amebiana (John, 1993).

2. UBICACION TAXONOMICA:

La siguiente clasificación no incluye todos los grupos de amebas, sólo los géneros que son patógenos para el hombre y fue promulgada por la Sociedad de Protozoología en 1985 (Lee *et al.*, 1985).

Reino: Protista Haeckel, 1866
Subreino: Protozoa Goldfuss, 1818; emd, von Siebold, 1846
Phylum: Sarcomastigophora honigberg y Balamuth, 1963
Subphylum: Sarcodina Schmarda, 1871

Superclase: Rhizopodea Von Siebold, 1845
Clase: Lobosea Carpenter, 1861
Subclase: Gymnamoebia Haeckel 1862
Orden: Amoebida Kent, 1880
Suborden: Tubulina Bovee y Jahn, 1966
Familia: Entamoebidae Chatton, 1925
Género: *Entamoeba* Casagrandi y Barbagallo, 1895
Familia: Acanthamoebidae Sawyer and Griffin, 1975
Género: *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931; emd Page, 1967
Orden: Schizopyrenida Singh, 1952
Familia: Vahlkampfiidae Jollos, 1971; Zulueta, 1917
Género: *Naegleria*

3. MORFOLOGIA Y CICLO DE VIDA:

a. Trofozoito o ameba

Los trofozoitos de las diferentes especies de *Naegleria* son similares en apariencia y son conocidos como amebas limax. Estas amebas se elongan y se mueven de una manera direccional. Susseudópodos son conocidos como lobópodos.

En movimiento activo la ameba de *N. fowleri* mide en promedio 22 μm de largo, e inactiva mide de 9 a 15 μm de diámetro (Carter, 1970).

Los trofozoitos de *N. fowleri* tienen una estructura de fagocito distintiva llamada amebostoma (John *et al.*, 1984; John y De Jonckheere, 1985). El amebostoma es utilizado para fagocitar y varía en número de 1 a 12 por ameba, dependiendo de la cepa (Jonh y De Jonckheere, 1985). A la microscopía electrónica de transmisión, el amebostoma aparece densamente granular en contraste con la gran vacuola de la ameba.

Las especies no patógenas del género *Naegleria*, tienen modificada la estructura del amebostoma, no está claramente definido y no es tan numeroso como el de *N. Fowleri*. (Jonh y De Jonckheere, 1985; Marciano-Cabral y Fulford, 1986). No parece existir una correlación entre el grado de virulencia y el número de amebostomas presentes. Sin embargo, la patogenicidad puede estar correlacionada con respecto al tamaño del amebostoma de sólo dos especies patógenas de *Naegleria*.

La reproducción en *Naegleria* es por simple fisión binaria de los trofozoitos. La división nuclear es promitótica, lo cual significa que el nucleolo y la membrana nuclear persisten durante la división nuclear (carioquinesis). El nucleolo elongado, forma una estructura en forma de pesa, y se divide en dos masas polares, durante este proceso la membrana nuclear permanece intacta (Page, 1988).

b. Flagelado

Cuando *Naegleria* se suspende en agua destilada o en buffer no nutritivo, se transforma en flagelado temporalmente (Cable and John, 1986; Fulton, 1977). El flagelado típico de *Naegleria* es rombo en forma de cigarro o de pera, con dos flagelos que emergen por debajo del rostro anterior.

De las diferentes especies de *Naegleria*, los flagelados de *N. fowleri* son los más uniformes, con dos flagelos cada uno. Los de *N. australiensis* son los más diversos, teniendo ocho flagelos (John *et al.*, 1991). Y *N. gruberi* presenta de uno a cinco flagelos (Fulton, 1970).

c. Quiste

Los quistes de *N. fowleri* son esféricos de 7 a 5 μm de diámetro (Carter, 1970; Page, 1988). El examen del quiste por microscopía electrónica, muestra en promedio menos de dos poros mucosos, u ostiolas por quiste y una pared delgada (Shuster, 1975), ésta característica del quiste de *N. fowleri* la hace susceptible a la desecación.

Los quistes de *N. australiensis* tienen una pared lisa, y contienen múltiples poros, de tres a ocho por quiste (De Jonckheere, 1981). Los poros pueden tener un collar como en *N. gruberi*, o pueden carecer de ésta característica, esto los hace como los de *N. fowleri* (John y De Jonckheere, 1985).

d. Ciclo de vida

Según las condiciones del ambiente, el trofozoito de *N. fowleri* puede pasar al estado flagelado o al quístico. Cuando el trofozoito se encuentra en agua destilada o en buffer revierte al estado flagelado, en estas condiciones no se alimenta, no se divide y después de un tiempo puede pasar al estado de trofozoito. El trofozoito también puede enquistarse cuando las condiciones ambientales son desfavorables y después exquistar en un ambiente favorable.

El estado invasivo de *N. fowleri* es el trofozoito. Es probable que los flagelados y los quistes de *N. fowleri* puedan entrar en la nariz de un nadador con la misma facilidad que el trofozoito. Cuando esto ocurre, el trofozoito puede escapar del quiste o el flagelado puede revertir rápidamente en trofozoito y ambos invadir. Los flagelados o quistes de *N. fowleri* nunca han sido encontrados en los tejidos o en el líquido cefalorraquídeo, solamente el trofozoito (John, 1993)

4. RELACION HUESPED PARASITO:

a. Enfermedad producida:

La meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) típicamente ocurre en niños sanos y adultos jóvenes con una reciente historia de natación en aguas dulces contaminadas con la ameba. La enfermedad es rápidamente fatal, produce la muerte en 72 horas después

de presentarse los síntomas. La infección es por inhalación de agua que contiene a los trofozoitos o los flagelados (John, 1993).

El trofozoito penetra la mucosa nasal y la placa cribosa alcanzando los nervios olfatorios hacia el cerebro. El trofozoito primero invade los bulbos olfatorios y entonces se propaga a la región más posterior del cerebro, dentro de él provoca inflamación y causa una destrucción extensiva del tejido. Los síntomas más importantes en orden de ocurrencia incluyen cefalea, anorexia, náuseas, vómito, fiebre y rigidez del cuello (Carter, 1970; Martínez, 1985).

b. Patología

La patología encontrada en los casos de MEAP es ordinariamente constante: los hemisferios cerebrales usualmente presentan edema, las meninges se encuentran con escaso exudado purulento, la corteza exhibe en la superficie muchas hemorragias focales y los bulbos olfatorios muestran severas hemorragias, necrosis y exudado purulento (Carter, 1970; Martínez, 1985).

c. Diagnóstico

El diagnóstico de MEAP se realiza por identificación microscópica del trofozoito vivo del líquido cefalorraquídeo de pacientes. La movilidad amebiana es observada rápidamente en preparaciones frescas del líquido cefalorraquídeo, además el trofozoito se distingue de otras células por su forma limax y su progresivo movimiento (Carter, 1970; Martínez, 1985).

El líquido cefalorraquídeo puede ser teñido con tinción Giemsa o Wright, observándose el citoplasma azul cielo y de gran tamaño; el núcleo se tiñe de color rosa y es pequeño (dos Santos, 1970).

d. Tratamiento

Actualmente no existe un tratamiento satisfactorio para MEAP y los antibióticos usados para tratar la meningitis amebiana no son efectivos para la infección por *Naegleria*. La anfotericina B, una droga de considerable toxicidad, es el agente antiniglerial del cual existen evidencias clínicas efectivas. Cuatro sobrevivientes de MEAP fueron tratados con anfotericina B, administrada intravenosa e intracranalmente; dichos sobrevivientes fueron niños de Australia (Anderson y Jamieson, 1972), Gran Bretaña (Apley *et al.*, 1970), India (Pan y Ghost, 1971), y los Estados Unidos (Seidel *et al.*, 1982). Al paciente de los Estados Unidos se le administró por vía parenteral miconazol y rifampicina oral (Seidel *et al.*, 1982).

ANTECEDENTES

Los primeros casos de MEAP fueron reportados en Australia (Fowler y Carter, 1965), en donde se describieron cuatro casos, tres niños y un adulto. Todos murieron de 4 a 5 días después de presentar los síntomas. La ruta de infección propuesta fue la ruta nasal, porque la ameba preponderó con más frecuencia en los bulbos olfatorios, cerebro anterior y mucosa nasal.

Un año después del primer reporte, tres infecciones fatales fueron descritas en Florida por Butt (1966). La sintomatología de estos casos fueron similares a los reportados en Australia. Algo notable fue que la infección se adquirió por inhalación intranasal durante la natación, tres de las víctimas de Florida habían sido nadadores activos. Butt (1966) reconoció el descubrimiento de una nueva enfermedad en Australia y Florida, nombrándola meningoencefalitis amebiana primaria.

La ameba no fue cultivada en los primeros casos; sin embargo, en base a su morfología observada en secciones histológicas y su similitud a las amebas descritas por Culberston *et al.* (1959) fueron identificadas tentativamente como *Acanthamoeba sp.* Tiempo después fueron identificadas positivamente como *Naegleria fowleri* (Carter, 1970). El nombre de *Naegleria fowleri* fue propuesto para las especies patógenas de *Naegleria* por Carter (1970) y fue así llamada, en honor de Malcom Fowler, quien fue el primero en reconocer la enfermedad causada.

Otro caso de MEAP fue reportado en 1966 (Patras y Andujar, 1966), ésta vez en Texas, y fue atribuido a *Acanthamoeba*, se aplicó la técnica de inmunoperoxidasa en secciones de tejido del paciente, revelando que la ameba fue *N. fowleri* (Culberston, 1975).

El primer aislamiento y cultivo de *N. fowleri* del líquido cefalorraquídeo o de tejido del cerebro de un paciente, fue reportado en 1968 por Butt *et al.*, (1968), Callicot (1968), y Carter (1968). Estos reportes fueron en Florida, Virginia, y Australia respectivamente.

Cuatro casos fatales de MEAP en Nueva Zelanda fueron inicialmente atribuidos a un mixomyceto (Mandal *et al.*, 1970), Sin embargo, la reexaminación de las muestras aisladas mostró que se trataba de *N. gruberi* (Curson y Brown, 1975), que ahora es conocida como *N. fowleri*.

En la mayoría de los pacientes infectados con *Naegleria*, presentaron una reciente historia de natación en verano. En Richmond, Virginia, la infección de 14 de 16 casos probables fue adquirida en dos lagos localizados a pocas millas uno del otro (Callicott, 1968; Duma, *et al.*, 1971; dos Santos, 1970), 16 infecciones similares ocurrieron en Checoslovaquia pero en una alberca clorada (Cerva *et al.*, 1969), lo mismo ocurrió en Bélgica, Inglaterra y en un canal de riego en México (Jadin *et al.*, 1971; Cain *et al.*, 1979; Valenzuela *et al.*, 1984)

La infección con *Naegleria* no siempre es a través de la natación. Se reportaron casos en regiones áridas en el sur de Australia y norte de Nigeria, y donde no se practica la natación, en estos casos se ha propuesto que la infección fue al lavarse la cara o al bañarse (Anderson and Jamieson, 1972; Lawande *et al.*, 1980) y por la inhalación de quistes presentes en el polvo (Lawande *et al.*, 1979).

La meningoencefalitis amebiana primaria es una enfermedad relativamente rara, el 75 % de los casos han sido reportados en Australia, Checoslovaquia y los Estados Unidos. En los Estados Unidos el 67% de los casos reportados provienen de los estados de Virginia, Florida y Texas (John, 1993).

Los aspectos sobre la virulencia e inmunidad durante la infección con *Naegleria fowleri* son en gran parte desconocidos. Algo de lo que se conoce se ha obtenido de estudios realizados con cultivos celulares, modelos animales y con sueros humanos (John, 1993).

Los anticuerpos contra las amebas patógenas y no patógenas de vida libre han sido detectados en suero humano normal a través de varias técnicas. Con la técnica de radioinmunoensayo (Tew *et al.*, 1977) se encontró que los títulos de anticuerpos fueron casi nueve veces más grandes contra antígenos intracelulares que contra antígenos de la superficie celular. A través de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (Cursons *et al.*, 1980), en el que se utilizaron 93 muestras de suero, se encontró que todas fueron positivas, con rangos de títulos de 1:5 a 1:20 para *N. fowleri* y para *N. Gruberi*, 1:20 a 1:80, para *A. castellanii* y *A. culbertsoni*. Con la técnica de aglutinación se detectaron anticuerpos contra *N. fowleri*, *N. gruberi*, y *N. lovaniensis* (Marciano-Cabral *et al.*, 1987; Reilly *et al.*, 1982, 1983.), la actividad aglutinante fue específica, indicando que la persona había estado expuesta a cada una de las especies de *Naegleria*. Con el ensayo Avidina-biotina peroxidasa se detectaron anticuerpos contra *N. fowleri* y *N. lovaniensis* en muestras de suero humano (Dubray *et al.*, 1987), los anticuerpos estuvieron presentes en 88% de los sueros de 115 pacientes hospitalizados, los anticuerpos fueron identificados como IgG e IgM, con títulos de IgG de 1:20 a 1:640.

La presencia de anticuerpos contra amebas de vida libre en suero humano, puede reflejar la amplia distribución de estos organismos, o puede representar reacciones cruzadas inespecíficas de los anticuerpos contra los antígenos que fueron identificados o simplemente la exposición de las personas a este antígeno (Cursons *et al.*, 1979, 1980; Reilly *et al.*, 1982, 1983; Marciano-Cabral *et al.*, 1987; and Dubray *et al.*, 1987).

En el suero de una víctima de MEAP en Nueva Zelanda, se reportó que contenía un bajo nivel de IgA, aunque los títulos de IgG e IgM fueron normales (Cursons *et al.*, 1979). En otro reporte, en Inglaterra se describen niveles normales de IgA de un suero de un niño quien murió por una infección de *Naegleria* (Cain *et al.*, 1979). En ambos casos, fue medida la concentración de IgA sérica, mientras que la concentración de IgA de secreción no se midió, los niveles de IgA sérica no indican los niveles de IgA de secreción y ambos pacientes pudieron tener deficientes niveles de IgA secretoria. Como *N. fowleri* invade la mucosa

nasal, es razonable sugerir que la IgA secretoria puede jugar un papel en la protección inmunológica (Jonh, 1993).

Las amebas de vida libre, se empezaron a estudiar desde 1982 por los miembros del Area de Microbiología Ambiental del laboratorio de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) de la UNAM Campus Iztacala, debido a que en México se presentan las condiciones climatológicas adecuadas para la presencia , proliferación y dispersión de estas amebas.

Con el objeto de esclarecer la epidemiología de estas amebas, se han realizado estudios en diferentes cuerpos de agua naturales y termales de importancia turistica, así como de piscinas en San Luis Potosí, Michoacán, Morelos, Hidalgo, Estado de México, Querétaro y Ciudad de México; de canales de riego en Mexicali, Baja California; de sistemas de tratamiento de aguas residuales en el estado de México y en la Ciudad de México; de agua mineral embotellada, de tinas de hidroterapia, y de agua de grifo de la Ciudad de México, encontrando una gran diversidad de amebas de vida libre, en especial algunas pertenecientes a los géneros potencialmente patógenos. Además, se aislaron cepas amebianas (algunas patógenas) del aire de la Ciudad de México y su área metropolitana y de la Ciudad de San Luis Potosí (Ramírez y Bonilla, 1993).

En México se han detectado cerca de 40 casos de MEAP. Entre ellos están los brotes epidémicos que se han presentado en los últimos años en Mexicali, en la zona fronteriza del Río Bravo y probablemente en la Huasteca Potosina. El primer caso reportado en nuestro país lo presentó un joven de 16 años que había nadado en un canal de riego de poca profundidad. El segundo caso merece especial atención ya que es uno de los pocos a nivel mundial en el que el paciente sobrevivió a la enfermedad. Se trató de una niña de 3 años de edad que adquirió la infección al estar jugando con una manguera por la cual el agua salía a presión (Ramírez y Bonilla, 1993).

En México es usual, a nivel médico no asociar a estos microorganismos como agentes de meningoencefalitis, por lo que se sospecha que muchos casos han pasado desapercibidos. Para corroborar esto, se revisaron historias clínicas de pacientes con meningoencefalitis no bacteriana de la Huasteca Potosina, zona de alta incidencia de amebas de vida libre en sus cuerpos de agua recreativos. De un total de 100 expedientes revisados, del período de 1990 a 1993, se encontró que al menos el 15 % de los casos pudieron tener como agente etiológico a las amebas de vida libre (Ramírez y Bonilla, 1993).

En México sólo se han realizado trabajos relacionados al aislamiento de amebas de vida libre, tanto de muestras de agua como de aire en distintos lugares, pero sobre el aspecto epidemiológico e inmunológico de la meningoencefalitis amebiana primaria no se han realizado estudios, por lo cual estos aspectos son en gran medida desconocidos.

El estudio sobre la inmunidad y la epidemiología de *Naegleria fowleri* en poblaciones humanas de la República Mexicana que por su ubicación presentan factores ambientales que promueven la proliferación de estas amebas, aunado a las costumbres de

recreación en cuerpos de agua, servirá para plantear un control de la MEAP, mediante el desarrollo de programas que den información sobre la enfermedad y su prevención, para evitar así, que el número de enfermos y muertes por este patógeno se incremente. La confirmación médica de la MEAP no es fácil, ya que la mayoría de los pacientes con *Naegleria fowleri* mueren en un intervalo de 5 a 10 días, el examen morfológico de muestras se establece como una de las pruebas definitivas, la ausencia del diagnóstico rápido y preciso limita la aplicación de un tratamiento oportuno. El estudio de la respuesta inmune hacia la MEAP permitirá ampliar la posibilidad de generar alguna prueba diagnóstica. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es ampliar el conocimiento con respecto a la respuesta de anticuerpos en muestras de suero y de saliva contra *N. fowleri*, en diversas poblaciones, de donde se han aislado cepas patógenas de *N. fowleri* y donde se creé se han registrado casos de MEAP.

OBJETIVOS

- 1.-Determinar la presencia de anticuerpos contra *N. fowleri* en muestras de suero y saliva de tres poblaciones diferentes por la técnica de ELISA.
- 2.-Determinar si existen diferencias entre los tres grupos de estudio.
- 3.-Determinar las proteínas amebianas más frecuentemente reconocidas en las tres poblaciones de estudio a través de la técnica de Inmunoblots.

MATERIAL Y METODOS



POBLACIONES DE ESTUDIO



CONTROL DONADORES ENFERMOS



OBTENCION DE MUESTRAS DE SUERO Y SALIVA



PREPARACION DEL ANTIGENO AMEBIANO



TECNICA DE ELISA



TECNICA DE INMUNOBLOTS



ESTADISTICA

MATERIAL Y METODOS

a. Poblaciones de estudio:

Población 1 Grupo control de la Ciudad de México. Sujetos aparentemente sanos de cualquier edad y ambos sexos.

Población 2 Grupo de donadores de San Luis Potosí y de Ciudad Valles S.L.P. Sujetos que llegaron a donar sangre a la clínica # 4 del IMSS en San Luis Potosí, al Hospital regional de la S.S.A. y a la clínica del IMSS en Ciudad Valles S.L.P., con las siguientes características: aparentemente sanos de cualquier edad y de ambos sexos. Zona en la que se ha encontrado con una gran frecuencia la presencia de cepas patógenas y no patógenas de *N. fowleri* en muestras de agua y aire.

Población 3 Grupo de enfermos de San Luis Potosí y de Ciudad Valles S.L.P. Pacientes que ingresaron a los hospitales antes mencionados y que presentaron alguna de las siguientes enfermedades:

Rinitis	12
Bronconeumonía	4
Tuberculosis pulmonar activa	3
Encefalopatía por infección	1
Laringomalacia	1
Asma	2
Desconocidos	2
Total	25

b. Obtención de las muestras

La saliva total se obtuvo en frascos estériles después de estimular su producción por masticación de un trozo de parafilm, hasta obtener un volumen aproximado de 5 ml, se le adicionó aproximadamente 0.2 gr de azida de sodio, y se congeló a -70°C .

Se obtuvieron de 3-5 ml de sangre venosa periférica y se centrifugó a 2500 rpm por 10 min para obtener el suero, el cual se congeló a -70°C para su uso posterior.

c. Preparación del antígeno amebiano

i. Obtención del paquete celular

Se realizaron cultivos axénicos de *Naegleria fowleri* (Cepa ATCC 30808) en botellas Corning con 10 ml de medio Chang a 37°C , se cosecharon al tercer día. Después de la cosecha las amebas se centrifugaron durante 5 min a 2500 RPM, se eliminó el sobrenadante y se lavó el paquete celular con solución salina isotónica (SSI) durante tres ciclos. Posteriormente se adicionó al paquete celular el inhibidor de proteasas (ácido P-

hidroxi-mercuriobenzoico 10 mM diluido en Trizma base 150 mM) de 4-5 veces el volumen del paquete, y se almacenó a -70° C.

ii. Ruptura de trofozoitos

La ruptura de los trofozoitos se realizó pasando las muestras de nitrógeno líquido a agua a 37°C (4 ciclos), y se colocó en alícuotas de 200µl a -70° C.

iii. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas se realizó mediante la técnica de Bradford (Bradford, 1976).

Tomando los valores de absorbancia de una muestra con una concentración conocida (albúmina) se realizó una curva patrón, los valores de absorbancia de la muestra problema (ameba) se interpolaron en esta curva, obteniéndose una concentración de proteínas de 4 mg/ml.

d. Cuantificación de los niveles de anticuerpos (técnica de ELISA), (Hudson y Hay, 1989). La prueba se aplicó de la siguiente manera:

NOMBRE DEL GRUPO	NUMERO DE MUESTRA	
	SALIVA	SUERO
Control	65	82
Donadores	100	100
Enfermos	25	25

Los pozos de las placas de ELISA se recubrieron con 100µl de una solución de 0.2 mg/ml del antígeno amebiano disuelto en el amortiguador de carbonato-bicarbonato (NaHCO₃ 0.2M, Na₂CO₃ 0.2M, pH 9.6), y se incubó durante toda la noche a 4° C. Se lavaron las placas 3 veces con PBS Tween al 0.05% (PBS-T). Se añadió el bloqueador (caseína al 1% disuelta en el amortiguador de carbonato-bicarbonato), y se incubó toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas 3 veces con PBS T. Se adicionó el suero diluido 1:100 o saliva diluida 1:2 de las tres poblaciones, y se incubó toda la noche a 4° C. Se lavaron las placas 10 veces con PBS T. Se adicionó el conjugado, anticuerpo de cabra anti-IgA o IgG o IgM humanas marcadas con peroxidasa (anti-cadenas α, γ y μ American Qualex) y diluido 1: 10 000 en PBS T, y con leche Svelty al 5%, se incubó 1 hr a 37°C. Se lavaron las placas 6 veces con PBS T. Se adicionó la solución reveladora (ácido cítrico 0.1M, fosfato de sodio anhídrido dibásico 0.2 M, o-fenilendiamina 0.04% y peróxido de hidrógeno 0.04%) por 30 min y se paró la reacción con ácido sulfúrico 2.5 M. Las placas se leyeron en el lector de ELISA (Biorad Model 550) a 492 nm.

e. Detección de proteínas (Técnica de Inmunoblots), (Hudson y Hay, 1989)

La prueba se aplicó tomando las muestras que resultaron positivas en la prueba de ELISA.

i. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las soluciones para la electroforesis se prepararon de la siguiente manera:

- 1.- Solución de monómeros (acrilamida 30% T, bis-acrilamida 2.7% C)
- 2.- Buffer del gel separador (tris-base 1.5 M, pH 8.8)
- 3.- Buffer del gel concentrador (tris base 0.5 M, pH 6.8)
- 4.- SDS al 10%
- 5.- Persulfato de amonio al 10% (APS)
- 6.- Tetrametiletilenodiamina (TEMED)

Los geles se prepararon como se indica:

Solución Numero.	Gel separador 10%T, 2.7%C	Gel concentrador 4%T, 2.7%C
1	6.66 ml	3.34 ml
2	5.0 ml	
3		2.5 ml
4	200 μ l	100 μ l
5	100 μ l	50 μ l
6	10 μ l	4 μ l
Agua	8.0 ml	6.0 ml
pH	8.8	6.8

Se prepararon primero los geles separadores, a los cuales se les colocó encima 150 μ l de butanol para evitar que los geles estuvieran en contacto con el aire y así gelificaran más rápido, después de 1 hr se lavó el butanol con agua destilada y se realizaron los geles concentradores, se colocaron los peines para geles preparativos, los cuales formaron dos carriles, uno pequeño para colocar el marcador de peso molecular y el otro grande para colocar la muestra que se iba a correr; se dejó gelificar por 1 hr.

Después los geles se colocaron en la cámara para electroforesis (Hoefer modelo SE 250). junto con el amortiguador de electroforesis (Tris 0.025M pH 8.3, glicina 0.192M y SDS 0.1%), en el carril pequeño se colocaron 3 μ l del marcador de peso molecular (Sigma Marker de alto peso molecular de 205,000 a 36,000 Daltons), a una concentración de 2-3.5 mg/ml mezclado con 7 μ l de amortiguador de muestra (Tris-Cl 0.125 M, pH 6.8, SDS 4%, Glicerol 4% y 2-mercaptoetanol 10%); en el carril grande se colocaron 2 mg/ml de extracto de ameba con 100 μ l del amortiguador de muestra (Tris-Cl 0.125 M pH 6.8, SDS 4% , glicerol 4% y 2-mercaptoetanol 10%), que previamente habían sido mezclados y hervidos durante 3 min. La electroforesis se realizó a 20 mA por 1 hr.

ii. Transferencia

Después de la electroforesis los geles se colocaron en el buffer de transferencia (glicina 192.0 mM, tris 25 mM pH 8.3, SDS 0.1%, metanol 20%) para que se equilibraran durante 20 min. Sobre el lado gris de los cassettes se colocó una fibra, luego papel filtro, papel de nitrocelulosa, el gel, otro papel filtro, otra fibra, luego se colocaron en la cámara para transferencia (Hoefer modelo TE 22), el gel quedó orientado hacia el lado del cátodo y el papel de nitrocelulosa hacia el lado del ánodo, la transferencia se realizó a 400 mA durante 90 min.

Después de la transferencia los geles se tiñeron con azul de Coomassie (Azul de Coomassie R-250 0.025%, metanol 40%), los papeles de nitrocelulosa se tiñeron con rojo de Ponceau para verificar si las proteínas se habían transferido, el colorante se lavó con PBS, luego el papel se cortó en tiras de aproximadamente 4 mm y se colocaron en tubos de ensayo de 7.5 mm por 1 mm para la inmunodetección. Se utilizó un volumen de 1 ml para todas las soluciones que se añadieron durante la inmunodetección a los tubos, excepto cuando se colocaron las muestras, en estas se utilizó un volumen de 0.85 ml.

iii. Inmunodetección

Se añadió a los tubos el bloqueador (leche Svelty al 5%) diluido en agua destilada y se incubó toda la noche a 4° C. Se lavó durante 5 min con PBS-T (0.05 %). Se adicionó el suero en una dilución 1:100 o saliva dilución 1:2 y se incubó 2 hr a temperatura ambiente. Se lavó con PBS-T tres veces durante 10 min. Se adicionó el conjugado dilución 1:1 000 (los mismos que para la técnica de ELISA) y se incubó 1 hr a temperatura ambiente. Se lavó con PBS-T tres veces durante 10 min. Se adicionó la solución reveladora (metanol 17.5%, 4-cloronaftol 0.05%, PBS 82.5%, peróxido de hidrógeno 0.1%), la cual se dejó reaccionar durante 15 min aproximadamente. Se lavó 2 veces con PBS T. Por último se calcularon los pesos moleculares de las proteínas que fueron detectadas en los papeles de nitrocelulosa.

f. Estadística

Los datos obtenidos con la técnica de ELISA por grupos de estudio, fueron analizados con el método de análisis de varianza (Anova) y la prueba de comparación múltiple de medias (Prueba de Fisher o de LSD).

De los datos obtenidos con la técnica de Inmunoblots se calcularon las frecuencias de las proteínas que más detectaron las diferentes inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM), en los diferentes grupos.

RESULTADOS

A través de la técnica de ELISA se encontró la presencia de anticuerpos (IgA, IgG e IgM) contra *N. fowleri* tanto en suero como en saliva en los tres grupos (Control, Donadores y Enfermos). Los resultados de la Anova y de la prueba de comparación múltiple de medias (prueba de Fisher o de LSD) (Tablas 1 y 2), mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las tres inmunoglobulinas detectadas y entre las muestras de suero y saliva, de los tres grupos de estudio.

Tabla 1: Prueba de anova

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados medios	Fexp.	p
Grupo de estudio suero IgA	2	2.080	61.47	0.0000
Error	189	0.0339		
Grupo de estudio suero IgM	2	3.44	76.25	0.0000
Error	189	0.0451		
Grupo de estudio suero IgG	2	13.80	139.17	0.0000
Error	187	0.0991		
Grupo de estudio saliva IgA	2	5.236	93.15	0.0000
Error	204	0.0562		
Grupo de estudio saliva IgM	2	0.4119	11.82	0.0001
Error	201	0.0379		
Grupo de estudio saliva IgG	1	0.6952	30.22	0.0000
Error	163	0.0230		

Tabla 2: Prueba de comparación múltiple de medias (Prueba de Fisher o de LSD)

SUERO		Grupo control		Grupo donadores		Grupo enfermos
IgA	x	0.1298	a	0.2294	b	0.6068
		0.1061		0.1091		0.4316
IgM	x	0.4129	a	0.5939	b	1.0290
		0.1607		0.2169		0.2968
IgG	x	1.0205	a	0.4322	b	1.4631
		0.3220		0.1653		0.6242
SALIVA						
IgA	x	0.3473	a	0.0955	b	0.7976
		0.2194		0.0692		0.5437
IgM	x	0.1907	a	0.3136	b	0.1746
		0.1259		0.2290		0.1597
IgG	x	0.1441	a	0.2769	b	-
		0.0872		0.1815		-

En las muestras de suero positivas para la IgA, el grupo de enfermos presentó el mayor porcentaje con 80 %, le siguió el grupo de donadores con 14 % y con el porcentaje más bajo el grupo control con 3.6 % (Fig. 1 y Tabla 3). Con respecto a la IgG el grupo de enfermos fue el que presentó el porcentaje más alto con 36 %, luego el grupo control con 3.6% y por último el grupo de donadores con 2% (Fig. 2 y Tabla 3). Para la IgM también el grupo de enfermos fue el más alto con 92 %, le siguió el grupo de donadores con 27 % y el más bajo el grupo control con 3.6% (Fig. 3 y Tabla 3).

En las muestras de saliva para la IgA, el grupo de enfermos presentó un 60% de muestras positiva, luego el grupo control con 4.6% y el grupo de donadores con 0 % (Figura 4 y Tabla 3). Para la IgG el porcentaje de muestras positivas más alto lo presentó el grupo de donadores con 31 % y el más bajo el grupo control con 4.6 % (Figura 5 y Tabla 3), en el grupo de enfermos no se detectó esta inmunoglobulina por falta de muestras. Por último, el grupo de donadores presentó el porcentaje más alto para la IgM con el 21 %, luego el grupo control con 4.6 % y el grupo de enfermos con 8% (Fig. 6 y Tabla 3).

En el grupo de donadores las muestras que presentaron un mayor número de anticuerpos contra los antígenos de *N. fowleri* fueron: D34 que en suero presentó IgA e IgM, en saliva IgG e IgM. En el grupo de enfermos las muestras que más presentaron anticuerpos fueron: P7, P9 y P18, que en suero presentaron IgA, IgG e IgM y en saliva IgA, la muestra P3 presentó en suero IgA, IgG e IgM y en saliva IgA e IgM. Hubo muestras en los tres grupos que presentaron de uno a tres tipos de inmunoglobulinas, pero las muestras descritas arriba fueron las que más anticuerpos presentaron, (Apéndice I).

Tabla 3: Porcentaje de muestras positivas en la técnica de ELISA.

GUPO	SUERO			SALIVA		
	% IgA	% IgG	% IgM	% IgA	% IgG	% IgM
CONTROL	4.6	4.6	0	3.6	3.6	3.6
DONADORES	14	2	26	0	29	21
ENFERMOS	80	36	88	64	-	-

- En el grupo de enfermos no se probaron las inmunoglobulinas IgG e IgM en saliva por falta de muestras.

En los inmunoblot se probaron aquellas muestras que fueron positivas en la técnica de ELISA, tomando el valor de dos veces la desviación estándar sobre la media del grupo control.

En los sueros y las salivas de los tres grupos de estudio se detectaron anticuerpos IgA, IgG e IgM que reconocieron proteínas de diferentes pesos moleculares de los extractos totales de *N. fowleri*. Los pesos de las proteínas amebianas reconocidas fueron de los 230 a los 6 Kd (Apéndice 2)

Las proteínas que más fueron reconocidas por los anticuerpos IgA, IgG e IgM presentes en las muestras de suero del grupo de donadores, fueron las de 10, 14, 23, 33, 42,

46, 50, 57, 67, 75, 85, 90, y 107 Kd, y en saliva del mismo grupo fueron las proteínas de 85 y 125 Kd (Fig. 8-10, Tabla 4).

En las muestras de suero del grupo de enfermos las proteínas que más fueron reconocidas por los tres anticuerpos fueron las de 50, 57, 67 y 125 Kd (Tabla 4). En las muestras de saliva de este grupo no se pudo comparar las frecuencias ya que no se detectaron los anticuerpos IgG e IgM por falta de muestras (Fig. 11-12, Tabla 4).

Las proteínas reconocidas con mayor frecuencia por las diferentes inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM), en las muestras de suero y saliva del grupo de donadores y enfermos fueron las siguientes 10, 33, 42, 50, 67, 75, 85, 95, 104 y 125 (Fig. 8-12, Tabla 4).

En el grupo control fueron muy pocas las proteínas de *N. fowleri* que fueron reconocidas tanto por las muestras de suero como las de saliva, pero algunas proteínas identificadas con mayor frecuencia por lo otros dos grupos, como la de 10, 12, 50 y 104 Kd. fueron detectadas en este grupo, al menos por un tipo de inmunoglobulina (Fig. 7, Apéndice II).

Tabla 4. Porcentaje de proteínas más frecuentemente reconocidas por las diferentes inmunoglobulinas en las muestras de suero y saliva del grupo de donadores y enfermos.

PM Kd	DONADORES						ENFERMOS			
	Suero			Saliva			Suero			Saliva
	% IgA	% IgG	% IgM	% IgA	% IgG	% IgM	% IgA	% IgG	% IgM	% IgA
10	28	50	42	33	5		22	22		9
14	7	38	14	8	5				30	9
23	7	16	17	8	5	11		22	7	9
33	7	27	25	16	20		33	22		36
42	7	11	17		15			11		9
46	14	22	14	25	15		66	44	7	9
50	35	38	42	50	15		22	33	69	36
57	7	50	54	8	43		11	77	53	27
67	14	27	8	16	10		22	11	30	9
75	7	46	20	16	5		11	33		27
85	14	11	17	16	10	11	11	22		27
90	21	16	28	8	10			22		9
95		33	57	16	20		11	33	30	
107	14	22	71	58	10			44	15	90
125	21	33	11	16	10	11	33	22	15	36

Nota: Los porcentajes se calcularon tomando como 100% el total de muestras que se probaron en los inmunoblots.

NUMERO DE NUESTRAS

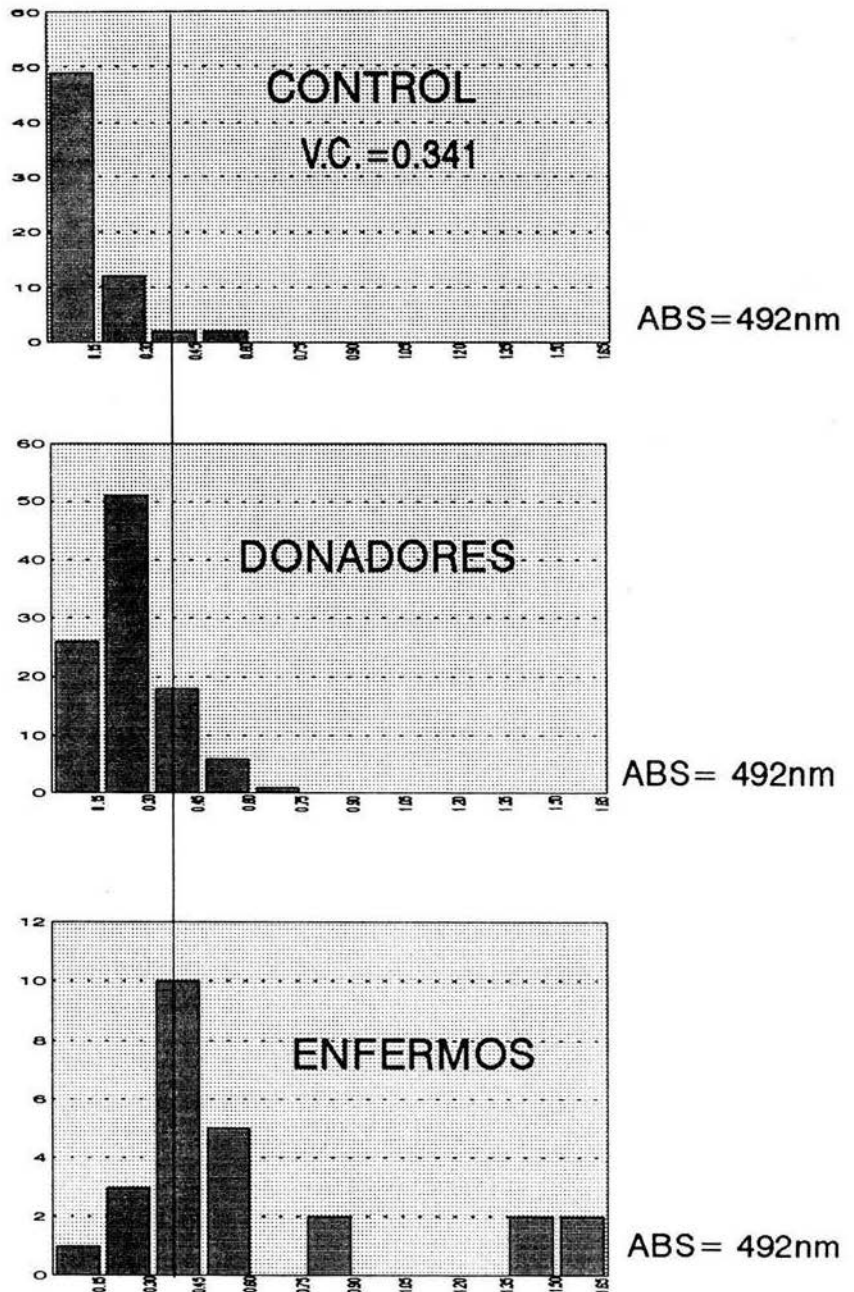


Fig 1. Niveles de anticuerpos IgA en suero contra N. fowleri en los grupos de estudio

NUMERO DE MUESTRAS

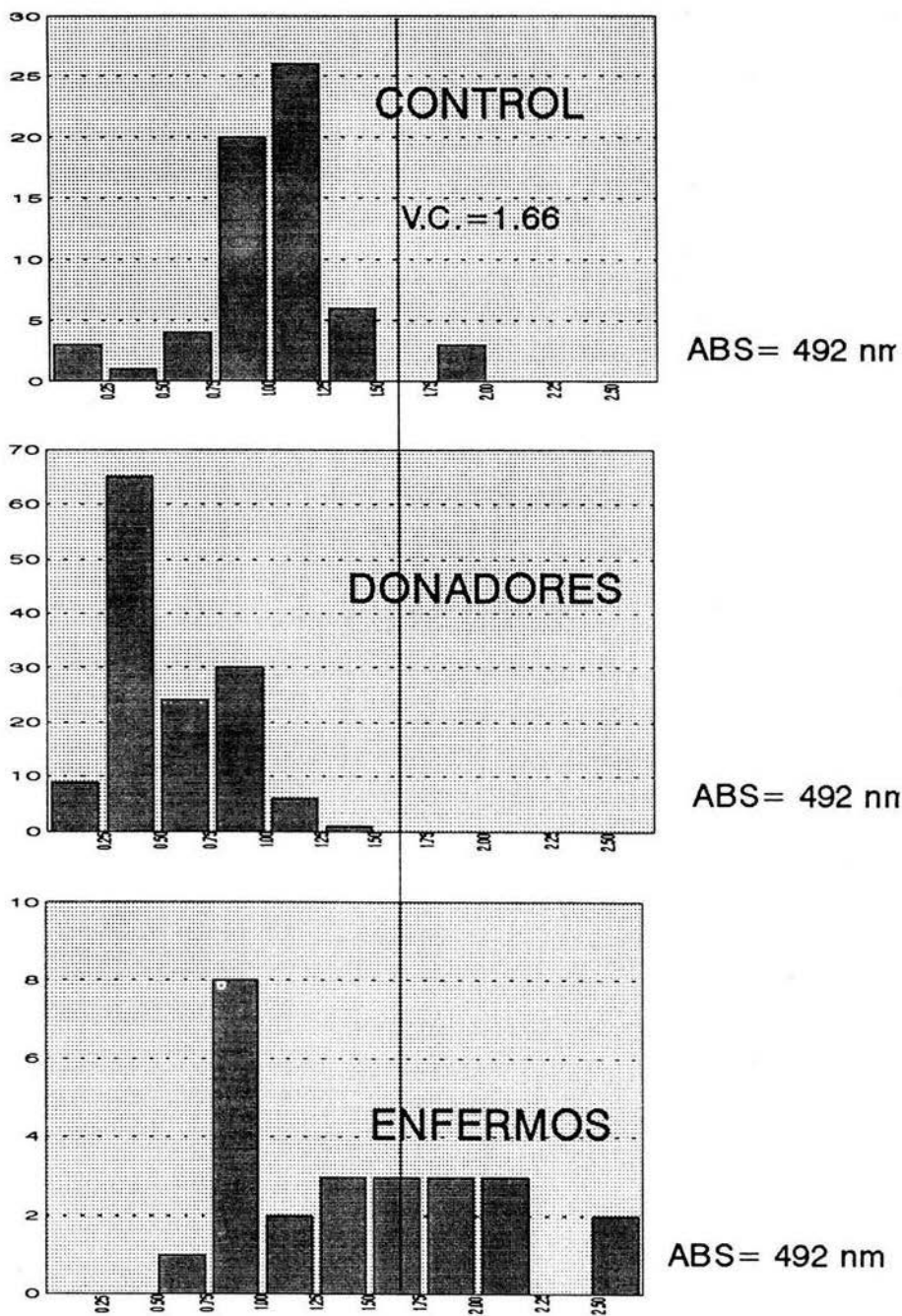
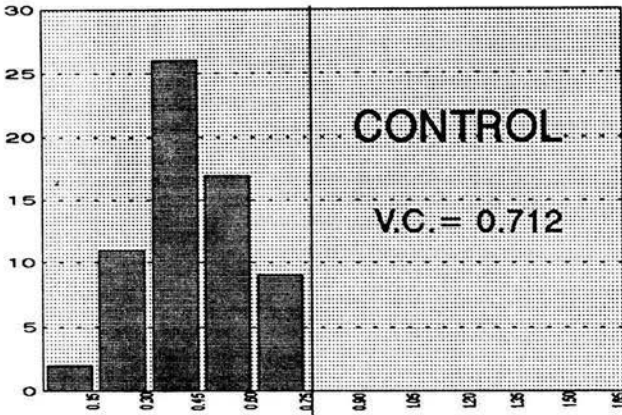
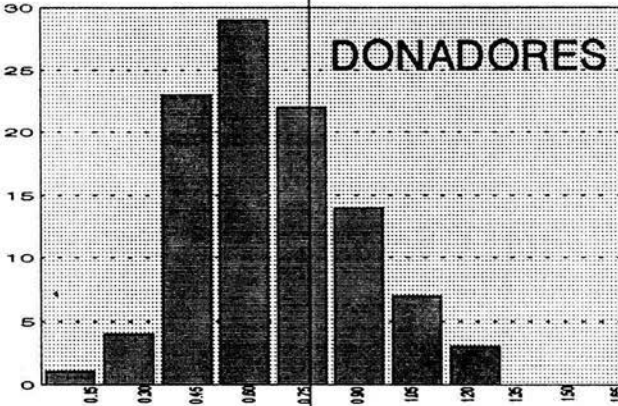


Fig 2. Niveles de anticuerpos IgG en suero contra N.fowleri en los grupos de estudio

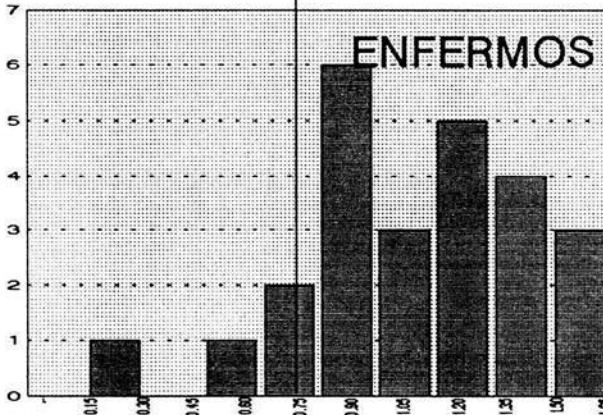
NUMERO DE MUESTRAS



ABS= 492 nm



ABS= 492 nm



ABS= 492 nm

Fig 3. Niveles de anticuerpos IgM en suero contra N. fowleri en los grupos de estudio

NUMERO DE MUESTRAS

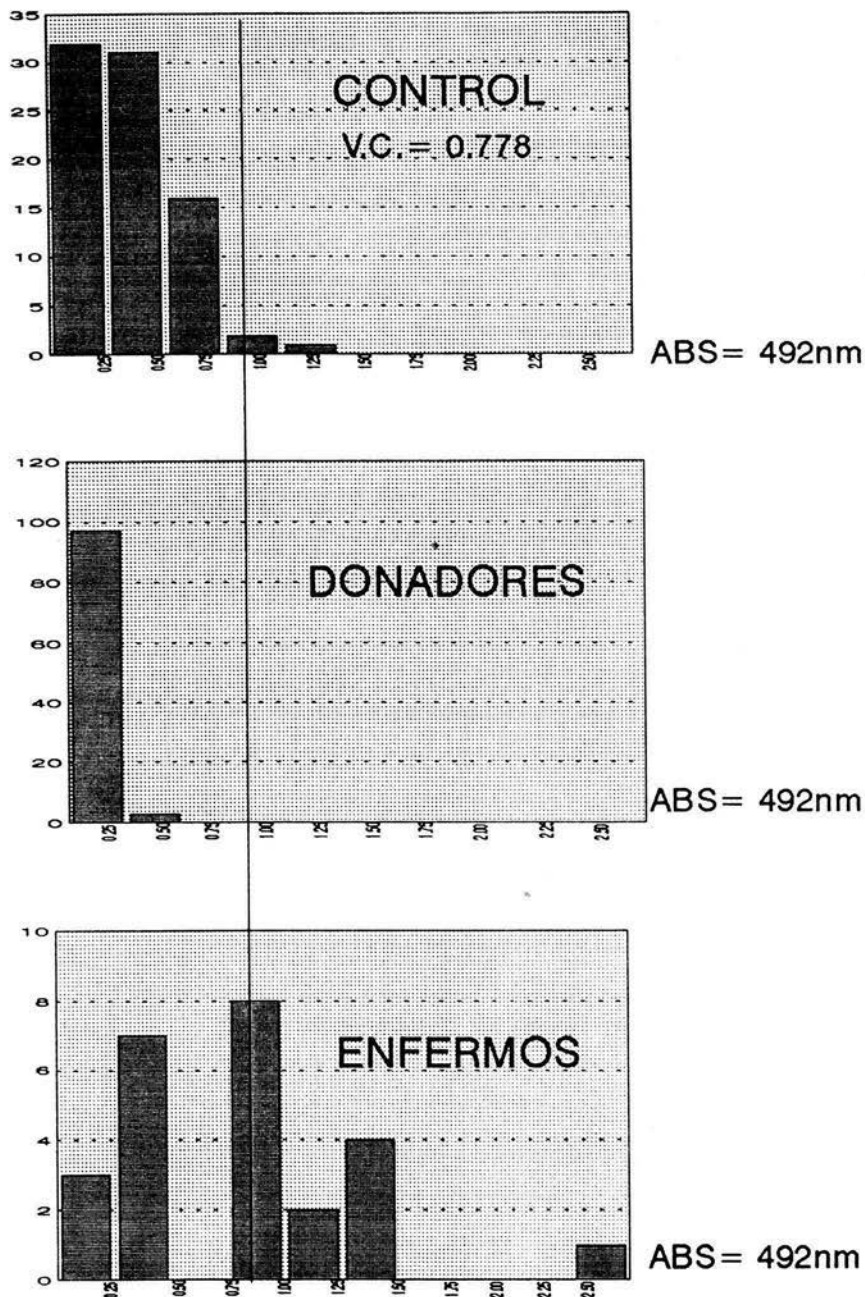


Fig 4. Niveles de anticuerpos IgA en saliva contra N. fowleri en los grupos de estudio

NUMERO DE MUESTRAS

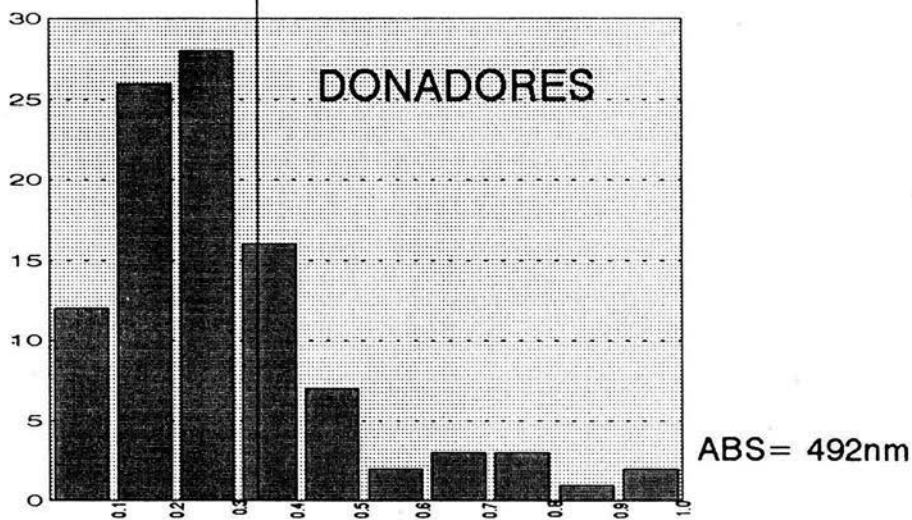
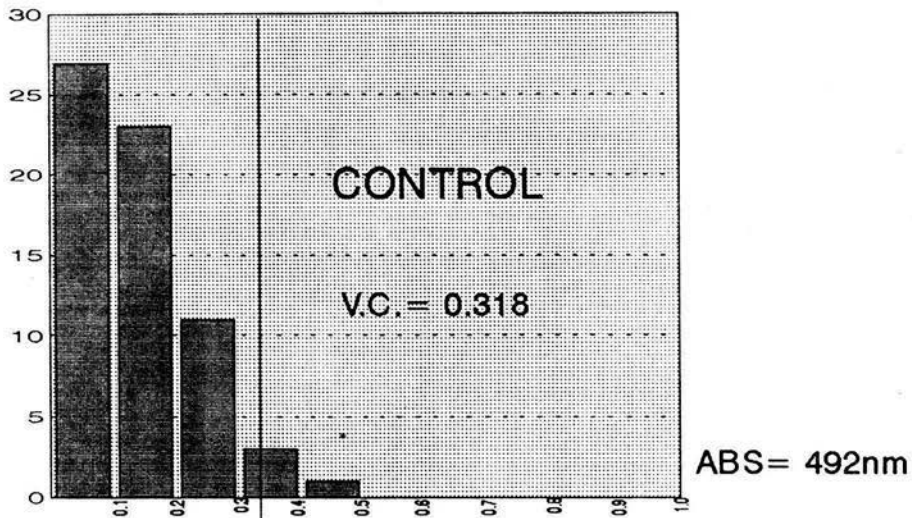
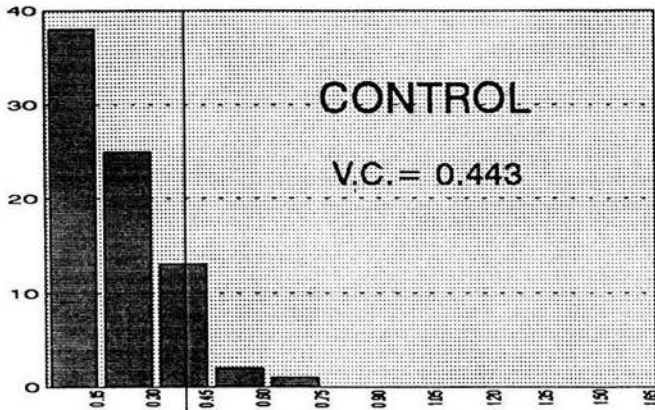
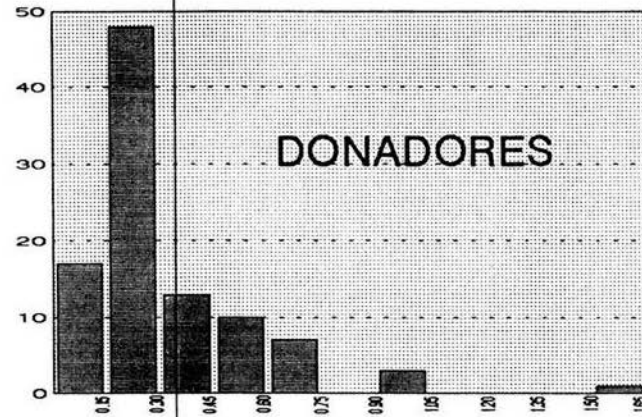


Fig 5. Niveles de anticuerpos IgG en saliva contra N. fowleri en los grupos de estudio

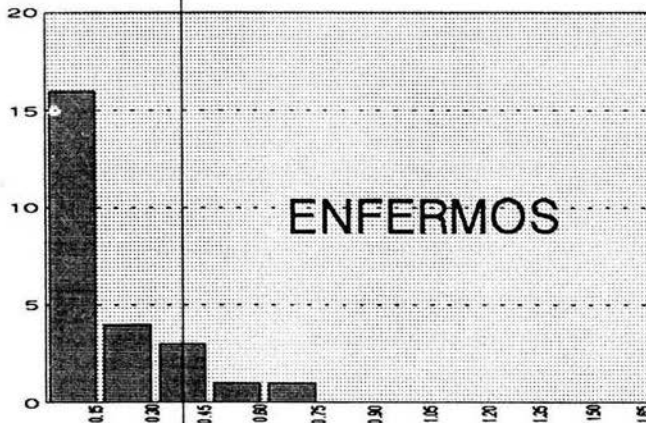
NUMERO DE MUESTRAS



ABS= 492nn



ABS= 492nn



ABS= 492nn

Fig 6. Niveles de anticuerpos IgM en saliva contra N. fowleri en los grupos de estudio

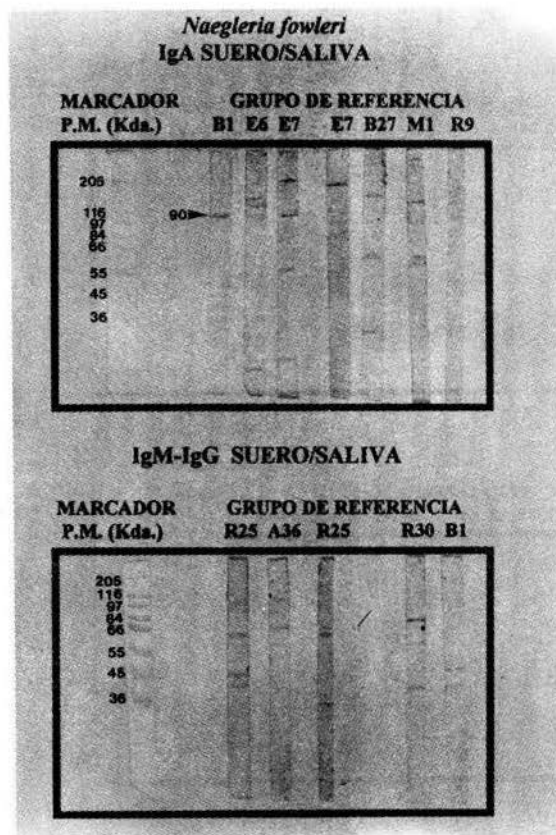


FIGURA 7. Proteínas que fueron reconocidas con mayor frecuencia por los anticuerpos IgA, IgM e IgG presentes en las muestras de suero y saliva en el grupo de referencia a través de la técnica de inmunoblots.

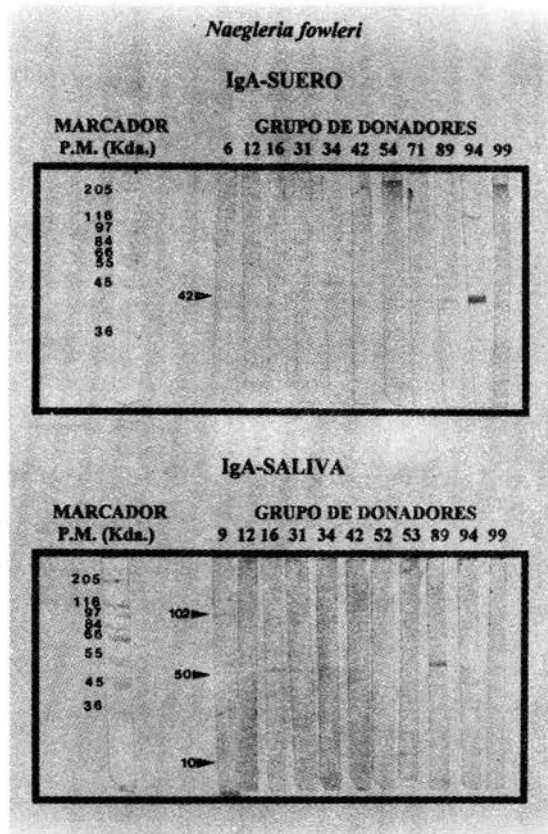


FIGURA 8. Proteínas que fueron reconocidas con mayor frecuencia por los anticuerpos IgA presentes en las muestras de suero y saliva del grupo de donadores, a través de la técnica de inmunoblots.

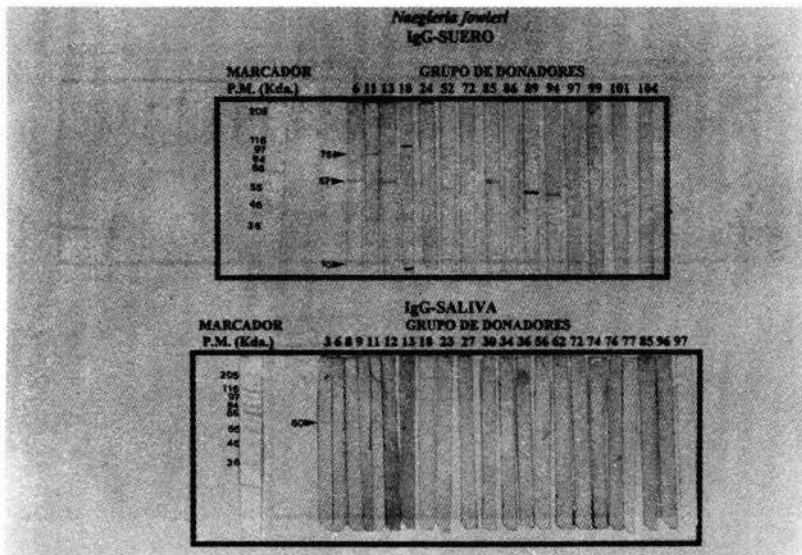


FIGURA 9. Proteínas que fueron reconocidas con mayor frecuencia por los anticuerpos IgG presentes en las muestras de suero y saliva del grupo de donadores, a través de la técnica de inmunoblots.

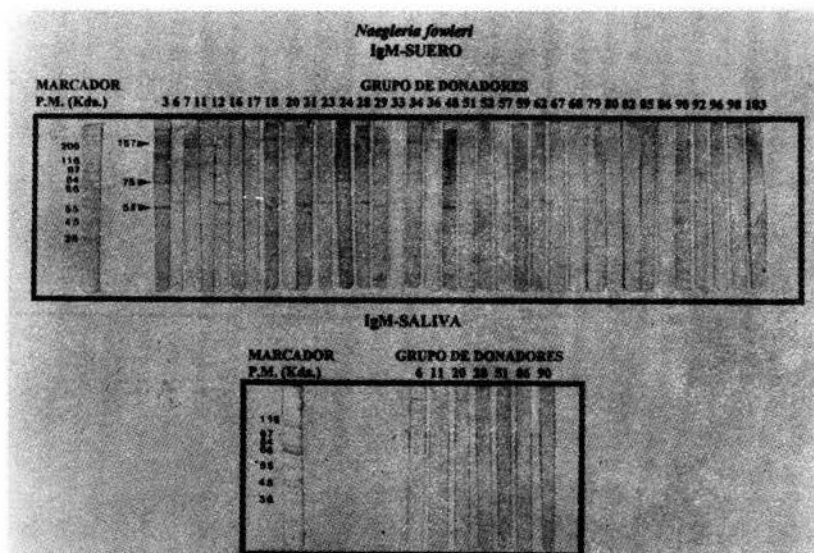


FIGURA 10. Proteínas que fueron reconocidas con mayor frecuencia por los anticuerpos IgM presentes en las muestras de suero y saliva del grupo de donadores, a través de la técnica de inmunoblots.

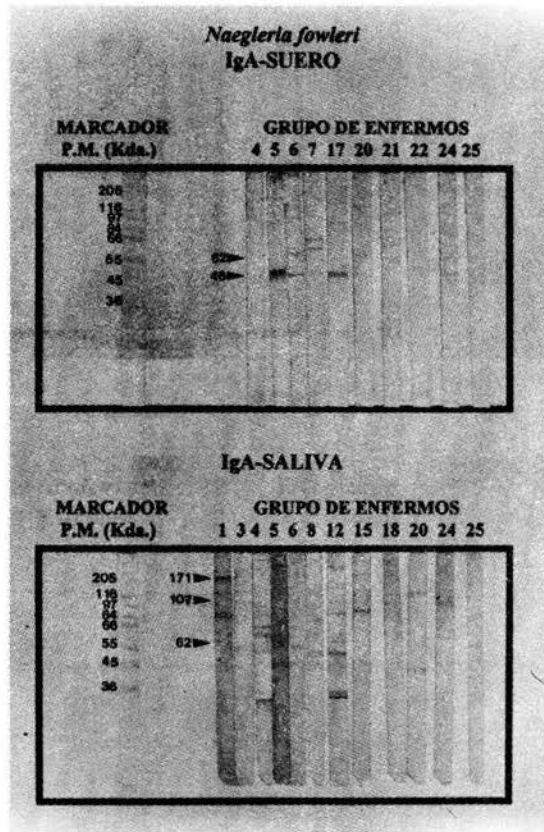


FIGURA 11. Proteínas que fueron reconocidas con mayor frecuencia por los anticuerpos IgA presentes en las muestras de suero y saliva del grupo de enfermos, a través de la técnica de inmunoblots.

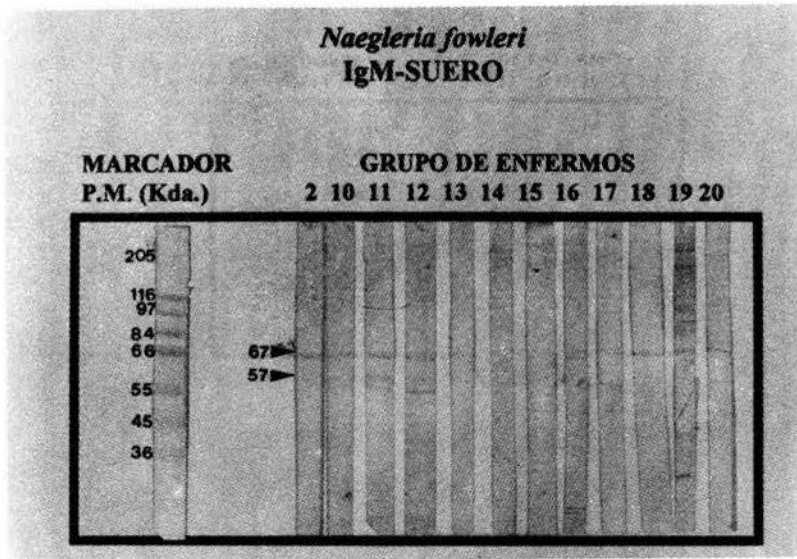
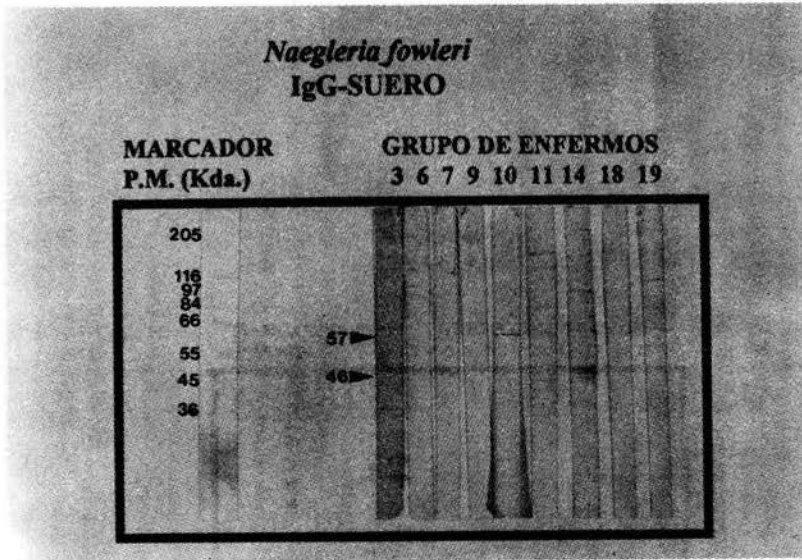


FIGURA 12. Proteínas que fueron reconocidas con mayor frecuencia por los anticuerpos IgG e IgM en las muestras de suero del grupo de enfermos, a través de la técnica de inmunoblots.

ANALISIS DE RESULTADOS

A través de la técnica de ELISA (Fig. 1-6 y Tabla 3) se encontraron anticuerpos contra *N. fowleri* en las muestras de suero y saliva de las tres poblaciones. La presencia de estos anticuerpos puede ser debida a dos factores, primero que se estén presentando reacciones cruzadas de anticuerpos y segundo que sean específicos contra *N. fowleri*. En cuanto al primer punto, en algunos estudios con sueros humanos (Rielly *et al.*, 1982, 1983; Marciano-Cabral *et al.*, 1987 y Dubray *et al.*, 1987), se trabajó con antígenos de superficie de cuatro especies de *Naegleria* (*N. fowleri*, *N. gruberi*, *N. lovaniensis* y *N. australiensis*), y se encontró que los anticuerpos de los sueros presentaban reacciones cruzadas entre *N. gruberi* y *N. australiensis* y entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*. En el presente trabajo, esto puede haber sucedido, ya que en la Ciudad de México y en Ciudad Valles *N. fowleri* y *N. lovaniensis* han sido aisladas de diversas muestras de agua (Rivera *et al.*, 1983, 1987, 1993 y Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 1993). En otros trabajos se encontró que *N. fowleri* no comparte determinantes antigénicos con otras especies de *Naegleria* como *N. gruberi*, ni con otros géneros de amebas como *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Hartmanella* o *Enthamoeba* (Reilly *et al.*, 1983, Dubray *et al.*, 1987, Powell *et al.*, 1992 y Sparago *et al.*, 1992). En el presente estudio, algunas muestras que fueron positivas en los Inmunoblots, se probaron contra *E. histolytica*, observando que varias muestras de suero y saliva de los tres grupos, presentaron anticuerpos que reconocieron al menos cuatro proteínas de aproximadamente 46, 57, 95 y 105 Kd tanto de *N. fowleri* como de *E. histolytica*, lo que puede indicar que estas especies están compartiendo determinantes antigénicos y presentando reacciones cruzadas de anticuerpos, pero como en los inmunoblots se utilizaron extractos crudos de los antígenos, estas reacciones cruzadas podrían no serlo ya que los anticuerpos pueden estar reconociendo moléculas internas comunes no solo para estas amebas sino para otros microorganismos. Además la inmunoglobulina IgM tiene la facultad de reconocer antígenos como polisacáridos o glicolípidos, que podrían ser comunes a varios microorganismos (Cursons *et al.*, 1980). Junto con lo anterior Tew *et al.*, (1976) encontró en un trabajo con sueros humanos, que estos presentan una mayor cantidad de anticuerpos contra antígenos internos que contra antígenos de superficie de *N. fowleri*. Cursons *et al.*, (1980) y Marciano-Cabral *et al.*, (1987), trabajando con extractos crudos de las cuatro especies de *Naegleria* mencionadas anteriormente, encontraron que *N. fowleri* compartía determinantes antigénicos con *N. gruberi*, pero al trabajar sólo con antígenos de superficie estas reacciones cruzadas ya no se presentaban, y esto se puede presentar entre *N. fowleri* y *E. histolytica*. Con respecto al segundo punto, los anticuerpos presentes en las muestras pueden ser específicos, si las personas han estado en contacto directo con la ameba, *Naegleria* puede vivir como flora normal de garganta y nariz de individuos sanos (Martínez, 1987, Martínez *et al.*, 1992, y Campbell, 1993), otra causa puede ser el padecimiento de enfermedades subclínicas producidas por estas amebas y los tipos de exposición traducirse en la producción de anticuerpos específicos contra *N. fowleri*.

Para demostrar si los anticuerpos presentes en las muestras de suero y saliva de las tres poblaciones son específicos o representan reacciones cruzadas de anticuerpos, en futuros estudios se deberá comparar el patrón de reconocimiento obtenido en este trabajo con uno donde se utilicen muestras de individuos enfermos de MEAP, para así determinar

del total de proteínas reconocidas, cuales estan siendo especificas y cuales estarian representando reacciones cruzadas.

Las diferencias entre los tres grupos con respecto al número de muestras positivas (Fig. 1-6 y Tabla 3), pueden ser debidas a la alta o baja exposición de las personas a los antígenos de *Naegleria spp* (Rielly *et al.*, 1982, 1983; Marciano-Cabral *et al.*, 1987; y Dubray *et al.*, 1987). Tanto en las Ciudades de México y San Luis Potosí y en los centros recreativos (principalmente albercas) de Ciudad Valles S.L.P. se han aislado cepas patógenas y no patógenas de *Naegleria* (*N. fowleri*, *N. lovaniensis*, *N. gruberi.*, Rivera *et al.*, 1983, 1987, 1993 y Rodríguez-Zaragoza *et al.*, 1993), por lo que la presencia de las amebas no es la causa de estas diferencias. Más bien, parece ser la tendencia de las poblaciones de S.L.P. y de Ciudad Valles a realizar actividades acuáticas como la natación, el baño, el lavado de ropa en cuerpos de agua donde la ameba está presente, y por lo tanto, estas poblaciones al tener una mayor exposición a *Naegleria spp*, tienen la capacidad de desarrollar anticuerpos contra *Naegleria* y en algunos casos padecer la enfermedad. Además, la región de la Huasteca Potosina presenta las condiciones climatológicas adecuadas para la presencia, proliferación y dispersión de estas amebas. Mientras que en la Ciudad de México, disminuye de forma considerable el contacto de las personas con esta ameba, debido a que no se encuentran las condiciones para el óptimo desarrollo de estas amebas, y esto puede explicar el bajo número de muestras positivas en el grupo control.

En un estudio de Marciano-Cabral *et al.*, (1987) también se encontraron diferencias entre dos poblaciones, (en ambas poblaciones se aisló *N. fowleri* de cuerpos de agua como lagos), en una se registraron 18 casos de MEAP (Virginia) y otra donde no se registró ningún caso (Pennsylvania). La población de Virginia mostró un mayor título de anticuerpos contra especies de *Naegleria* que la población de Pennsylvania, y esto es justificado por que la población de Pennsylvania tiene una menor tendencia a los deportes acuáticos que los pobladores de Virginia, lo que hace menos susceptible a la población de Pennsylvania al contacto con estas amebas. Estos resultados son similares a los encontrados en el presente estudio, lo que sugiere, que la presencia de un alto nivel de anticuerpos en una población va a ser debida principalmente a una extensa y continua exposición a las especies de *Naegleria*.

El grupo de enfermos presentó el mayor número de muestras positivas (Tabla 3), lo que indica el padecimiento de enfermedades crónicas y por lo tanto la tendencia a una mayor producción de anticuerpos. Reilly *et al.*, (1982 y 1983), encontraron un mayor título de anticuerpos en muestras de suero de niños con diversos padecimientos, que en niños sanos de la misma edad. En las muestras de enfermos del presente trabajo, la mayoría padecían infecciones en las vías respiratorias y todos ellos provenientes de los Hospitales de Ciudad Valles. Lo que podría indicar una mayor susceptibilidad de las vías respiratorias de estos pacientes al contacto con *Naegleria spp*. Doce pacientes mostraron rinitis y algunos casos de esta pueden ser considerados como uno de los síntomas de la meningoencefalitis amebiana primaria. Reilly *et al.*, (1982) encontró que los pacientes con asma presentan un mayor título de anticuerpos que los pacientes sin asma de la misma edad, lo que concuerda con los casos de asma reportados en este estudio. Por otra parte, la presencia de una mayor

cantidad de muestras positivas en el grupo de enfermos, también puede ser debida a que los síntomas relacionados con las vías respiratorias, pueden ser el resultado de hipersensibilidad, reacciones alérgicas o el resultado de infecciones subclínicas provocadas por amebas de vida libre (Martínez, 1987).

En las muestras de suero de las tres poblaciones de estudio se detectaron anticuerpos de los tipos IgA, IgM e IgG. (Fig. 1-6). La presencia de IgM en las muestras de suero puede ser debido a una reciente o persistente exposición a los antígenos de *Naegleria spp*, o que estos antígenos sean polisacáridos o glicolípidos, otra razón es que se ha demostrado que *N. fowleri* tiene la capacidad de captar e internalizar anticuerpos unidos a su superficie y esto puede inducir también la respuesta de la IgM (Cursons *et al.*, 1980, Reilly *et al.*, 1983 and Dubray *et al.*, 1987). Tanto la IgG como la IgA tienden a sustituir a la IgM en una exposición crónica a los antígenos de *Naegleria spp*, ya que tienen una vida media mayor que la IgM y son mucho más afines (Cursons *et al.*, 1980, Reilly *et al.*, 1983, y Dubray *et al.*, 1987). Lo cual puede indicar una alta y continua exposición de las poblaciones de San Luis Potosí y de Ciudad Valles a los antígenos de *Naegleria*.

En las muestras de saliva también se detectaron los tres tipos de anticuerpos (Fig. 1-6), la presencia de IgA se debe a que se sintetiza localmente (tejido linfóide asociado a las glándulas salivales) y se transporta de manera activa y continua hacia la cavidad oral, esto lo hace la inmunoglobulina de mayor concentración en la saliva (Gómez, 1992), mientras que la IgG se sintetiza en menor grado localmente y su presencia también se debe a que proviene del torrente sanguíneo al igual que la IgM (Acosta, 1992). El grupo control mostró un 4.6% de muestras positivas para la IgA en saliva (Tabla 3), y el grupo de enfermos presentó un 60%. Este aspecto es muy importante ya que en todos los trabajos anteriores solo se había trabajado con muestras de suero (Cursons *et al.*, 1980, Reilly *et al.*, 1982, 1983, Marciano-Cabral *et al.*, 1987 y Dubray *et al.*, 1987), y sólo en un trabajo se menciona que la IgA de secreciones podría jugar un papel importante en la defensa contra *N. fowleri* (Cursons *et al.*, 1979). En el presente trabajo se encontró que al menos en el grupo de enfermos, la IgA presente en saliva, puede estar jugando un papel importante en la defensa del organismo contra *N. fowleri* y esto sería factible ya que la principal vía de infección de este patógeno es la mucosa nasal.

La técnica de inmunoblots fue utilizada en 1987 por Marciano-Cabral *et al.*, para detectar cruces antigénicos entre cuatro especies de *Naegleria* en sueros humanos, encontrado reacciones cruzadas de anticuerpos entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis* y entre *N. gruberi* y *N. australiensis*. También en 1987 Dubray *et al.*, utilizó esta técnica para determinar la similitud antigénica entre *N. fowleri* y *N. lovaniensis*, en muestras de suero humano, encontrando que estas especies de *Naegleria* comparten determinantes antigénicos, además encontraron que los anticuerpos del tipo IgG presentes en las muestras de suero, reconocen algunos determinantes antigénicos al igual que los anticuerpos del tipo IgM. En estos estudios solo trabajaron con muestras de suero y detectaron dos tipos de anticuerpos, IgG e IgM. Sin embargo, en el presente estudio se trabajó con muestras de suero y saliva con el objetivo de observar si existe un patrón de reconocimiento característico para *N. fowleri*. Encontrando que las muestras de suero y saliva de los tres grupos presentaron un

posible patrón de reconocimiento de los antígenos de *N. fowleri*. (Tabla 5). Las proteínas de 10, 14, 23, 33, 42, 46, 50, 57, 67, 75, 85, 90, 95, 107, 125 Kd de los extractos de *N. fowleri*, fueron reconocidas con mayor frecuencia por las inmunoglobulinas IgA, IgG e IgM presentes en las muestras de suero y saliva de los tres grupos (Fig. 7-12, Tabla 5). Esto nos podría indicar una alta especificidad de los anticuerpos presentes en estas muestras contra los antígenos de *N. Fowleri*.

CONCLUSIONES

Del total de muestras de suero y saliva de los tres grupos de estudio, el grupo de enfermos presentó más del 50% de muestras positivas que reconocieron antígenos de *N. fowleri*, lo que nos indica que esta población en comparación con los otros dos grupos (Donadores y Control) posiblemente presentan una mayor exposición a *N. fowleri*.

Las diferencias encontradas en las muestras positivas de las tres poblaciones de estudio, pueden ser debidas al grado de exposición a *N. Fowleri*, y no a la presencia de esta ameba en las diferentes regiones de estudio, ya que en ellas se han aislado cepas patógenas y no patógenas de *Naegleria*.

El estudio comparativo con otras cepas de *Naegleria* o con otros géneros de amebas puede servir para establecer si los anticuerpos presentes en las muestras de suero y saliva son específicos contra esta ameba, o que estas muestras pueden presentar anticuerpos contra las diferentes especies de *Naegleria* o si se estarían presentando reacciones cruzadas de anticuerpos con otros antígenos.

Otro aspecto que se debe de considerar en futuros estudios es el papel de la inmunoglobulina IgA, la cual estuvo presente en las muestras de saliva de los tres grupos de estudio, y como se mencionó anteriormente la vía de infección de *N. fowleri* es la mucosa nasal y la IgA es el principal tipo de inmunoglobulina presente en las mucosas, lo que nos indicaría la importancia de ésta, en la protección contra la infección de *N. fowleri*.

BIBLIOGRAFIA

- Acosta-Altamirano, A. (1992). Respuesta inmunitaria en la cavidad oral. Inmunidad de mucosas. Distribuidora y editora Mexicana. 53-64.
- Anderson, K., and Jamieson, A. (1972). Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* ii:379.
- Apley, J., Clarke, S. K. R., Roome, A. P. C. H., Sandry, S. A., Saygi, G., Silk, B., and Warhurst, D. C. (1970). Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Brit. Med. J.* i:596-599.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitative of microgramme quantities of protein, utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Bio.* 72:248-254.
- Butt, C. G. (1966). Primary amoebic meningoencephalitis. *New Engl J. Med.* 274:1473-1476.
- Butt, C. G., Baro C., and Knorr, R. W. (1968). *Naegleria* (sp) identified in amoebic encephalitis. *Am. J. Clin. Pathol de N.* 50:568-574.
- Cable, B. L., and John, D. T. (1986). Conditions for maximum enflagellation in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 33:467-472.
- Cain, A. R. R., Mann, P. G., and Warhurst, D. C. (1979). IgA and primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* i:441.
- Callicott, J. H. Jr. (1968). Amoebic meningoencephalitis due to free-living amoebas of the *Hartmanella (Acanthamoeba)-Naegleria* group. *Am. J. Clin. Pathol.* 49:84-91.
- Camacho, V. C. (1986). La amibiasis y su terapéutica. *Atención médica.* 6: 14-15, 25-28.
- Campbell, M. (1993). Amoebic brain abscess and meningoencephalitis. *Seminars in Neurology.* 2: 153-160
- Carter, R. F. (1968). Primary amoebic meningoencephalitis: Clinical, Pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J. Pathol. Bacteriol.* 96:1-25.
- Carter, R. F. (1970). Description of a *Naegleria sp.* isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* 100:217-244.
- Cerva, L. (1969). Amoebic meningoencephalitis. Axenic culture of *Naegleria*. *Science.* 63:576.
- Culbertson, C. G. (1975). Soil amoeba infection. Specific indirect immunoenzymatic (peroxidase) staining of formalin-fixed paraffin sections. *Am. J. Clin. Pathol.* 63:475-482.
- Culbertson, C. G., Smith J. W., Cohen H. K., and Minner, J. R. (1959). Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am. J. Pathol.* 35:185-197.
- Cursons, R. T. M., and Brown., T. J. (1975). The 1968 New Zelanda cases of primary amoebic meningoencephalitis-myxomicete or *Naegleria*? *N. Z. Med. J.* 82:123-125.
- Cursons, R. T. M., Keys, E. A., Brown, T. J., Learmonth, J., Campbell, C., and Metcalf, P. (1979). IgA and primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet.* i:223-224.
- Cursons, R. T. M., Brown, T. J., Keys, E. A., Moriarty, K. M., and Till, D (1980). Immunity to pathogenetic free- living amoeba. Role of humoral antibody. *Infect. Immun.* 29:401-407.

- De Jonckheere, J. F. (1981). *Naegleria australiensis* sp. nov., another pathogenic *Naegleria* from water. *Protistologica*. 17:423-429.
- Dubray, B. L., Wilhelm, W. E., and Jennings, B. R. (1987). Serology of *Naegleria fowleri* and *Naegleria lovaniensis* in a hospital survey. *J. Protozool.* 34:322-327.
- Duma, R. J. Rosembly, W. L., McGhehee, R. F., Jones, M. M., and Nelson, E. C. (1971). primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin and a review. *Ann. Inter. Med.* 74:923-931.
- Eliás, G. M., y Martínez, P. J. A. (1985). Introducción a la protozoología. Ed. Limusa. Méx.
- Fowler, M., and Carter, R. F. (1965). Acute pyogenic meningitis probably due to *Acantamoeba* sp.: A preliminary report. *Brit. Med. J.* ii:740-742.
- Fulton, C. (1970). Amebo-flagellates as research partners: The laboratory biology of *Naegleria* and *Tetramitus*. *Meth. Cell Physiol.* 4:341-476.
- Fulton, C. (1977). Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *Annu. Rev. Microbiol.* 31:597-629.
- Gómez-Rodríguez, F. E. (1992). Factores con función inmunitaria presentes en la saliva. *Distribuidora y Editora Mexicana.* 43-49.
- Hudson, L., and Hay, F. C. (1989). *Practical immunology*. Third Edition. Blackwell Scientific Publications. England. 73-78, 348-350.
- Jadin, J. B., Hermanne, J., Robin, G., Willaert, E., Van Maercke, Y., and Stevens, W. (1971) Trois cas de meningo-encéphalite amibienne primitive observés à Anvers Belgique). *Ann. Doc. Belge méd. Trop.* 51:255-266.
- John, D. T., Cole, T. B. Jr., and Marciano-Cabral, F. M. (1984). Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:12-14.
- John, D. T., and De Jonckheere, J. F. (1985). Isolation of *Naegleria australiensis* from Oklahoma lake. *J. Protozool.* 32:571-575.
- John, D. T. (1993). *Parasitic protozoa*. 2nd edition. Edited by Julius P. Kreier and John R. Baker. Academic Press Inc., U.S.A.
- Kudo, R. R. (1969). *Protozoología*. Ed Continental. México.
- Lawande, R. V., Abraham, S. N., Jonh, I., and Egler, L. J. (1979). Recovery of soil amebas from the nasal passages of children during the dusty harmattan period in Zaria. *Am. J. Clinic. Pathol.* 71:201-203.
- Lawande, R. V., MacFarle, J. T. Werr, W. R. C., and Awunor,-Renner, C. (1980). A case of primary amoebic meningoencephalitis in a Nigerian farmer. *Am. J. Trop. Mrd. Hyg.* 29:21-56.
- Lee, J. J., Hutner, S. H., and Bovve, E. C. (1985). *An Illustrade Guide to the Protozoa*. Allen Press. Inc. Lawrence, U.S.A.
- Mandal, B. N., Gudex, D. J., Fictchett, M. R. Pullon, D. H. H. Malloch, J. A., David, C. M., and Apthorp, J. (1970). Acute meningoencephalitis due to amoebae of the order Myxomycetale. *N. Z. Med. J.* 71:16-23.
- Marciano-Cabral, F., and Fulford, D. E. (1986). Cytophatology of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 51:1133-1137.
- Marciano-Cabral, F., Cline, M. L., and Bradley, S. G. (1987). Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria Fowleri* species. *J. Clin. Microbiol.* 25:692-697.

- Martínez, A. J. (1985). Free-living amebas: Natural history, Prevention, Diagnosis, Pathology, and treatment of Disease. CRC Press. Boca Raton, Florida.
- Martínez, A. J. (1987). Pathogenesis, Amphizoic amoeba, human pathology. Piccin Nuova Libreria. 148-160.
- Martínez, A. J., Visvevara, G. S. (1992). The pathology of granulomatous amebic encephalitis. The VI International Conference on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae. Abstracts 262.
- Page, F. C. (1974). Rosculus athacus Hawes, 1963 (amoebida, Flabellulidae) and amphizoic tendency in amoebae. Acta Protozool. 13:143-154.
- Page, F. C. (1988). A new key to freshwater and soil Gymnamoebae with instructions for culture. Freshwater Biol. Assoc., Ambleside, Cumbria, England.
- Pan, N. R., and Ghosh, T. N. (1971). Primary amoebic meningoencephalitis in two Indian children. J. Indian Med. Assoc. 56:134-137.
- Patras, D., and Andujar, J. J. (1966). Meningoencephalitis due to *Hartmanella (Acanthamoeba)*. Am. J. Pathol. 46:226-233.
- Powell, E., Newsomw, A, and Allen, S., (1992). Detection of amoebic antigens by protein immunoblotting. the VIth International Conference on the Biology and Pathogenicity of Free-Livin Amoebae. Abstracts 272.
- Ramírez, E, y Bonilla, P. (1993). Epidemiología de las amebas en México. Inf. Cient.y Tec. 15-17.
- Reilly, M. F., Bradley, M. K., and Bradley, S. G. (1982). Agglutination of *Naegleria fowleri* by human serum. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 170:209-212.
- Reilly, M. F., Marciano-Cabral, F., Bradley, D. W., and Bradley, S. G. (1983). Agglutination of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* by antibodies in human serum. J.Clin. Microbiol. 17:576-581.
- Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E., and Medina, F. (1983). A survey of pathogenic and free-living amoeba inhabiting swimming pool in Mexico City. Environ. Res. 32: 205-212.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P., and Lares. (1987). Amoebas isolated from the atmosphere of México City an environs. Environ. Res. 42:149-154.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Gallegos, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez., Ortiz, R., Zaldivar, B., Ramírez, P, and Durán, A. (1993). Pathogenic and free-living amoebas isolated from swimming pool and physiotherapy tubs in México. Environ. Res. 62: 43-52.
- Rodríguez-Zaragoza, S., Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., and Hernández, D. (1993). Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosí, S.L.P. Mexico. J. Expo. Analy. and Environ. Epidio. 3:229-241.
- do Santos, J. G., Neto. (1970). Fatal primary amebic meningoencephalitis; A retrospective study in Richmond Virginia, Am. J. Clin. Pathol. 54:737-742.
- Shuster, F. L. (1975). Ultrastructure cysts *Naegleria spp*: A comparative study. J. Protozool. 22:352-359.
- Seidel, J. S., Harmats, P., Visvesvara, G. S., Cohen, A., Edwards, J., and Turner, J. (1982). Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis. New Engl. J.Med. 306:346-348.

- Sparago, O., Brebent, R. Drouet, E., and Pernin, P. (1992). Production and characterization of mouse monoclonal antibodies against *Naegleria fowleri*. The Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Abstracts 273.
- Tew, J. G., Burmeister, J., Green, E. J., Pflaumer, S. K. and Goldstein, J. (1977). A radioimmunoassay for human antibodies specific for microbial antigens. *J. Immunol. Meth.* 14:231-241.
- Valenzuela, A. G., Lopez-Copella, E., and De Jonckheere, J. F. (1984). Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern México. *Trans. Roy. soc. Trop. Med. Hyg.* 78:558-559.

Apéndice I. Inmunoglobulinas que fueron reconocidas por las muestras de suero y saliva de las tres poblaciones en la técnica de ELISA.

GRUPO	SUERO			SALIVA		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
REFER						A36
	B1	B1				
					B3	
		B11				
						B15
	E6					
	E7					
				M1		
					R8	
				R9	R9	
						R25
				R27		
		R30				
Donadores			D3		D3	D3
	D6		D6		D6	
			D7		D7	D7
					D8	
	D9				D9	
			D11		D11	D11
	D12		D12			
					D13	
	D16		D16			
			D17		D17	
			D18		D18	
						D20
			D21			
					D22	
			D23		D23	
			D24		D24	D24
					D27	D27
			D28		D28	
			D29			D29
					D30	
	D31					
						D33
	D34		D34		D34	D34
					D36	D36

	SUERO			SALIVA		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
Donadores	D42					
			D48			
			D51			D51
	D52		D52			
	D53					
	D54					
					D56	
						D57
			D59			
					D62	D62
			D67			
			D68			D68
					D71	
					D72	
					D74	
					D76	
					D77	
	D79		D79			
			D80			
			D82			D82
		D85	D85		D85	D85
		D86	D86			D86
	D89		D89			
						D90
						D92
	D94					
					D96	D96
					D97	
					D98	D98
	D99				D99	
Enfermos			P1	P1		P1
			P2			
	P3	P3	P3	P3		P3
	P4		P4	P4		
	P5		P5	P5		
	P6	P6		P6		
	P7	P7	P7	P7		
	P8		P8	P8		
	P9	P9	P9	P9		
	P10	P10	P10			

	SUERO			SALIVA		
	IgA	IgG	IgM	IgA	IgG	IgM
Enfermos		P11	P11			
	P12		P12	P12		
	P13			P13		
	P14	P14	P14			
	P15		P15	P15		
	P16		P16			
	P17		P17			
	P18	P18	P18	P18		
		P19	P19	P19		
	P20		P20	P20		
	P21		P21			
	P22		P22			
	P23		P23			
	P24			P24		
			P25	P25		

Apéndice II. Proteínas que fueron reconocidas por las diferentes inmunoglobulinas, presentes en las muestras de suero y saliva de las tres poblaciones, por la técnica de inmunoblots.

PM	csu IgA	csu IgG	csu IgM	csa IgA	csa IgM	dsu IgA	dsu IgG	dsu IgM	dsa IgA	dsa IgG	dsa IgM	esu IgA	esu IgG	esu IgM	esa IgA
6					1		1								
7							1								1
8							2						1		1
9		1				1	6	2	1			1			1
10						3	2	4	2	1		1	1		
11			1				1	9	1				1		1
12				1			2		4						1
13						1	1	3							1
14							5	1		1				3	
15	1		1				1	1	1	1				1	1
16							2			1					
17								3				1			1
18						1	3	3						1	
19				1			1					1			
20							1								1
21				2			1			1					
22							1						2		1
23		1				1	2	2		1				1	
24				1				4			1				
25							2							1	
26				1				1	1					1	
27								2		1					
28							1	2		1		1			
29										1			1		1
30											1				
31							1	1					1	1	
32							2	5		2		2	1		1
33							3	1	1	2			1		2
34						1		3	1			1			1
35		1					2	1							
36		1			1		2	3	1						
37		1				1		1		2				1	
38							1	4		1		1	1		
39						1	1			1					
40							1	3		1					1
41								3		1			2		1
42						4		1		1					

PM	csu IgA	csu IgG	csu IgM	csa IgA	csa IgM	dsu IgA	dsu IgG	dsu IgM	dsa IgA	dsa IgG	dsa IgM	esu IgA	esu IgG	esu IgM	esa IgA
43		1								1		1	1		
44								1					1		1
45						1			1			1			
46							5	1	2	2		5	3		
47	1					1	1		1					1	
48								1		2					
49							6						1	3	1
50		1				1	1	8				2		4	
51						1	1	3	2	2			2		
52			1			3		3	3	1				2	1
53		1					1	1							2
54							1	2		1				1	
55						1	3	1				1	1	2	
56				1			2	1		1			1	2	1
57										3					
58							2	11						2	
59								2		3			2		
60				2			1	2	1	1			3		2
61		1					2	1				1	1		
62				1										1	1
63							1	3				1	2		
64							1		1	2			1		3
65							3	4				1			
66										1	1			1	
67						1	1	2				1		2	
68				1		1	2		2	1		1		2	
69							2	1		1			1		1
70	1							1						2	
71							2	2		1			2		
72						1				1		2			
73							1	2					1		1
74							1	1		1		1	2	2	2
75								2							
76							1	5					1	1	
77							3	2							
78							2	2	1			1			1
79						1	1	5	1				3		2
80		1		1						1					
81							1	2							
82		1				1	2			1		3		1	
83	1										1			1	1

PM	csu IgA	csu IgG	csu IgM	csa IgA	csa IgM	dsu IgA	dsu IgG	dsu IgM	dsa IgA	dsa IgG	dsa IgM	esu IgA	esu IgG	esu IgM	esa IgA
84							1	4					2		1
85						2	1			2					2
86	1		1					2	2		1	1			
87		1					1			2					
88								2	1						
89	1	1		1		1	2	5					1		
90	1					2	1	1		1			1		
91	1							4	1	1					
92					1		1	2							
93								1	1						
94								7							1
95							2	4				1	2	4	
96							2	4	1	1			1		
97								1		3					
98							2	1							
99							1	2	1					2	
100						1									
101				1				5							
102								6	4					1	2
103										1					
104		1		1	2	1	3	1					1		2
105								5	2					1	
107							2								1
108	1			1				6							
109							1			1			3		4
110															1
111						1		3							
112						2	1								
113														1	
114							1	5							
115								4				1			
116		1					1							1	1
117								3							
118	1						4								
119					1										
120								1							
121			1					6	1				1		
122							1	1		1					2
123											1				
124						1		3					2		4
125						2	6		2	2	1				

PM	csu IgA	csu IgG	csu IgM	csa IgA	csa IgM	dsu IgA	dsu IgG	dsu IgM	dsa IgA	dsa IgG	dsa IgM	esu IgA	esu IgG	esu IgM	esa IgA
126								1				3		2	
127											1				
128								10			2	1			
129	1						1								
131						1	1	6							
132				1				1					1		
133							1			1					1
135								2				1		3	
136				1				3			1				
138							1	2							
140															1
141	1						1					1			4
142										2					
143								1							
145				1											
146							1	1		2	1				
147													1		
148								3							
150					1		1				1				1
152								4			1	1			
155				1		1		8							
156							2								
157												1			
159								1							
160				1				4							
161													2		2
162			1					4	1						
164								1				1			
165								1							
166														1	
167								3							
168														1	
170														1	1
171				1							1				1
172							1						2		3
173								2							
176												1		1	
177														1	
181												1			
183				1		1									
184															1

PM	csu IgA	csu IgG	csu IgM	csa IgA	csa IgM	dsu IgA	dsu IgG	dsu IgM	dsa IgA	dsa IgG	dsa IgM	esu IgA	esu IgG	esu IgM	esa IgA
186														2	1
189								2							
190								1							
193								4							
196								1							
200								1							
202						1		3							
204						4		4							
206							2								
208	1						1								
209								1							
210							1	3							1
211	1		1												
212								9							
215								4							
216								1							
217								2							
222								1							
223										2					
230				2											

csu= Grupo control suero
csa= Grupo control saliva

dsu= Grupo donadores suero
dsa= Grupo donadores saliva

esu= Grupo enfermos suero
esa= Grupo enfermos saliva