



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**AMIBAS DE VIDA LIBRE PATÓGENAS EN CANALES DE
RIEGO DEL VALLE DE MEXICALI, BAJA CALIFORNIA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA:

ANTONIO VARGAS JUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS: BIOL. ARTURO CALDERÓN VEGA



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.

INDICE

1. RESUMEN	2
2. INTRODUCCIÓN	3
Generalidades de amibas de vida libre patógenas	6
a. <i>Naegleria</i> spp.	6
b. <i>Acanthamoeba</i> spp.	8
c. <i>Balamuthia mandrillaris</i>	10
d. <i>Hartmannella</i> spp.	11
e. <i>Vahlkampfia</i> spp.	12
f. Ciclos de vida.	13
3. UBICACIÓN TAXONÓMICA	13
4. ANTECEDENTES	14
5. JUSTIFICACIÓN	16
6. OBJETIVOS	17
7. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	18
8. MATERIAL Y MÉTODOS	20
a. Trabajo de campo	20
I. Análisis “ <i>in situ</i> ” de los parámetros fisicoquímicos	21
II. Recolección de muestras de agua para el aislamiento de AVL	21
b. Trabajo de laboratorio	21
I. Identificación y cuenta de coliformes totales en el agua	21
II. Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre	21
III. Clonación	22
IV. Axenización	22
V. Prueba de tolerancia a la temperatura	23
VI. Transformación ameboflagelar	23
VII. Identificación de los aislados amibianos por microscopía de luz	23
VIII. Pruebas de patogenicidad en animales de laboratorio	23
c. Análisis estadístico	24
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
a. Identificación de los aislados de amibas de vida libre	25
b. Identificación de las AVL	25
c. Prueba de tolerancia a la temperatura	28
d. Transformación ameboflagelar	29
e. Pruebas de patogenicidad	31
f. Análisis de los parámetros fisicoquímicos del agua “ <i>in situ</i> ”	35
I. Temperatura del agua	35
II. Temperatura ambiente	36
III. Ph	37
IV. Oxígeno disuelto	38
V. Conductividad	39
g. Coliformes totales	41
h. Análisis estadístico	42
10. CONCLUSIONES	44
11. LITERATURA CITADA	46
12. ANEXOS	53
13. GLOSARIO	60

1. RESUMEN

Las amibas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoos cosmopolitas las cuales tienen importancia ecológica y biomédica debido a que participan como uno de los primeros eslabones en la cadena alimenticia y algunas especies de estos organismos se consideran de importancia médica ya que pueden causar enfermedades en el ser humano. Hasta ahora los géneros de AVL que se han reportado con especies potencialmente patógenas para el ser humano son *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Sappinia* y *Balamuthia*. En Mexicali, Baja California se han reportado desde hace varios años brotes epidémicos de infecciones meníngeas con una evolución de la enfermedad comparable al causado por amibas patógenas de vida libre. El presente estudio se llevo a cabo para demostrar en el agua de los canales de riego del Valle de Mexicali la presencia de organismos amibianos de los géneros considerados como patógenos para el humano, y de encontrarse buscar una relación entre su presencia y los casos de infecciones reportados en Mexicali. Se hicieron análisis fisicoquímicos y bacteriológicos, en el campo y en el laboratorio para complementar el estudio. Se obtuvieron 40 aislados de AVL's pertenecientes a 9 géneros. Los aislados más abundantes fueron *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni* y *A. polyphaga*, con un porcentaje del 65 % del total de aislados. En ensayos de patogenicidad con animales de laboratorio estos géneros y especies fueron los más virulentos. La distribución de los aislados amebianos en los canales de riego fue muy homogénea, es decir, las amibas fueron aisladas de casi todos los sitios de muestreo a lo largo del Valle de Mexicali, aunque fue notorio que su presencia estuvo limitada en la zona donde entra el agua que alimenta a los canales y que proviene del Río Colorado en los Estados Unidos, es decir que en los puntos de muestreo cercanos al origen, casi no hubo aislados. La importancia de encontrar a estas especies patógenas en los canales de riego implica un riesgo para los usuarios que utilicen estos cuerpos de agua para recreación y que pudieran estar relacionados con los casos de brotes epidémicos que se han reportado en esa zona.

2. INTRODUCCIÓN

Los protozoos son animales unicelulares que presentan estructuras especializadas cuya complicación morfológica se ha podido apreciar al microscopio electrónico y que son llamados organelos. Estos organelos tienen funciones específicas para la locomoción, ingestión, digestión, excreción, secreción, regulación osmótica, reproducción, etc. Los protozoos son animales unicelulares. Poseen formas sumamente variadas y un tamaño que oscila entre los 10 μm y los 3 mm de longitud; solitarios o coloniales; con una distribución cosmopolita, se les ha encontrado en aguas dulces, marinas y terrestres; de vida libre o parásitos. Los protozoos han logrado explotar una gran diversidad de ambientes, principalmente lugares donde hay humedad o una película de agua presente. De gran importancia ecológica en cada uno de los hábitats en que se les encuentra ya que forman una parte fundamental de la cadena trófica, debido a que se alimentan de bacterias, hongos, algas y otros metazoarios (Wellings *et al.*, 1979; Pelczar *et al.*, 1982). También participan en los cambios de nutrientes y energía en la naturaleza, actuando como depredadores controlando las poblaciones de bacterias (Jadwiga W. *et al.*, 2000). Los protozoos representan una reserva de carbono y de nutrientes minerales al formar quistes de resistencia, y por su fisiología, estas reservas son esenciales para la estabilidad y la productividad de las comunidades animales y vegetales (Bamforth, 1980; Anderson, 1988; Burns, 1988). Los protozoos tienen un porcentaje de entre el 50% y el 70% de eficiencia en la síntesis de biomasa, y su presencia estimula la regeneración bacteriana del fósforo y la fijación del nitrógeno (Clarholm, 1981).

Debido a que varios grupos de protozoos son parásitos de invertebrados y de vertebrados superiores (incluyendo al hombre) revisten una gran importancia médica. En este trabajo se estudia a un grupo de amibas de vida libre (AVL) las cuales son un pequeño grupo de protozoos de importancia médica y ecológica. El término "amibas de vida libre" (AVL) no constituye una categoría taxonómica, estos organismos han sido clasificados basándose en características morfológicas y de comportamiento, en vez de sus relaciones filogenéticas (Jadwiga y Linder, 2000).

También se denominan amibas "anfizóicas" (gr. *Amph*; que significa de ambos lados), término que describe la capacidad de sobrevivir libres y como endoparásitos. Tienen la capacidad de ser cosmopolitas distribuyéndose en ambientes tanto naturales como artificiales, algunos ejemplos son los casquetes polares, el suelo en donde constituyen del 50 al 90 % de los protozoos heterótrofos, y en la atmósfera (Rivera *et al.*, 1987), y de manera especial en cuerpos de agua, como piscinas (De Jonckheere, 1979), estanques, ríos y bebederos (John y De Jonckheere., 1985; Rivera *et al.*, 1989). Este tipo de microorganismos se desarrollan mejor en ambientes con temperaturas elevadas; es por eso que se encuentran usualmente en aguas termales e incluso en agua embotellada (Wellings *et al.*, 1977; Rivera *et al.*, 1987).

En relación con las necesidades de nutrición, algunas especies de amibas de vida libre se consideran en el grupo de los protozoos que pueden tomar células enteras (usualmente procariotas) como su único alimento. No solamente son dependientes de su presa por

necesidad de factores específicos de crecimiento sino que también son dependientes de una cantidad determinada de aminoácidos y otros elementos mayores, los que deben estar en una cierta proporción en su dieta (Levandowski, *et al*, 1979).

Otras especies entran en el grupo de los protozoos que habitan en aguas con muchas sustancias orgánicas, hábitats ricos en bacterias y partículas; con gran tolerancia a tales condiciones y a la anaerobiosis facultativa. Los sistemas de transporte y de permeabilidad están bien desarrollados, usualmente son muy flexibles en su dieta y son capaces de vivir con una gran variedad de sustancias y con fuentes reducidas de carbono y nitrógeno (Levandowski, *et al*, 1979).

Las amibas en el medio acuático se pueden asociar con las partículas suspendidas en la columna de agua o permanecer en la superficie, donde se encuentra la interfase agua-aire. Las capas de partículas pueden tomarse como un componente del comportamiento térmico de los lagos así como un importante recurso ecológico, pues independientemente de los mecanismos de formación, éstos representan los mejores sitios de descomposición de la materia orgánica y de la regeneración de nutrientes (Kyle y Noblet, 1985).

Los organismos localizados en las interfases tienen mayores oportunidades de sobrevivir debido al efecto de concentración de nutrientes en las superficies (Singleton, 1984). En las interfases sólido-líquido se concentran proteínas y otras moléculas orgánicas e inorgánicas como resultado de la atracción electrostática y de otras leyes físicas.

En la interfase líquido-gas se concentran las moléculas hidrófobas como los lípidos y algunos tipos de proteínas. En ambos casos, los materiales que se concentran pueden ser aprovechados por las bacterias, éstas a su vez por las amibas y otros protozoos bacteriófagos.

Los microorganismos llegan a éstas interfases por sus respuestas quimiotácticas a las regiones de incremento de nutrientes, o se transportan hasta esos lugares por el efecto de las corrientes y responden a las mismas fuerzas que las moléculas (Rodríguez, 1994).

Algunas células se mantienen adheridas en un lugar debido a la producción de material extracelular, el que generalmente está compuesto de proteínas y polisacáridos. Con él, se asegura el acceso al lugar donde están concentrados los nutrientes, pues le sirve de cemento que les permite mantenerse adheridas a las partículas.

La mayor actividad de las amibas se lleva a cabo en la superficie de los cuerpos de agua y en los sedimentos, aunque también se lleva a cabo sobre los cuerpos de animales y de plantas sumergidas.

La actividad en la columna de agua depende de la cantidad de partículas suspendidas, pues carecen de la posibilidad de nadar (excepto los ameboflagelados) y necesitan estar adheridos a un sustrato para poder desarrollar sus actividades normales.

La preferencia de las amibas de vida libre por las capas de algas verde-azules puede deberse a que las usan para alimentarse, como sustrato para vivir o como ambos.

Las bacterias se benefician del sustrato que provee el mucílago de las algas y de las sustancias extracelulares liberadas por éstas últimas, las cuales estimulan el crecimiento bacteriano (Rodríguez, 1994).

La difusión del oxígeno en los sedimentos puede alcanzar los primeros 30cm (Novitsky y Keplay, 1981). Sin embargo, la difusión depende de la cantidad de materia orgánica depositada en ellos, de la estructura que estos últimos tengan y de la cantidad de oxígeno disuelto que exista en el agua circundante. De tal suerte que en algunos cuerpos de agua la difusión del oxígeno sólo alcanza los primeros centímetros de los sedimentos (Novitsky y Keplay, 1981; Singleton, 1984).

En los sedimentos profundos de los lagos puede haber más actividad microbiana que en el litoral. Esto puede deberse al alto contenido de materia orgánica, al pequeño tamaño de las partículas que les da una gran área superficial o al ramoneo de los protozoos sobre las bacterias. Éstas últimas y los protozoos que las consumen, son especialmente importantes en el reciclaje de los nutrientes en los sedimentos anaerobios. En estos ambientes, los principales grupos de protozoos son los ciliados y las amibas desnudas (Campbell, 1986).

La presencia de bacterias y sus ramoneadores incrementan la eficiencia de la transferencia de energía en las complejas redes tróficas acuáticas, aunque la teoría clásica sugiere que cada enlace adicional en una cadena alimenticia la hace disminuir. Esto se debe a que los protozoos recuperan el carbono que se perdería como exudado vegetal y animal, detritus, organismos perdidos durante la depredación y materia orgánica refractaria (como las paredes celulares de los vegetales) (Rodríguez, 1994).

El estudio de las amibas de vida libre ha demostrado que solo un grupo muy restringido provoca infecciones humanas incluyendo a los géneros: *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Hartmannella*, *Naegleria* (Gallegos, 1997) y *Vahlkampfia* (Jadwiga y Linder; 2000).

Algunas especies de *Acanthamoeba* pueden actuar como organismos oportunistas ya que se observa casi invariablemente asociada a distintos procesos patológicos que conducen a deficiencias del sistema inmunológico (Martínez, 1980) además de producir infecciones en el sistema nervioso central (SNC) e infecciones oculares. También tienen una cierta predilección por otros tejidos como nódulos linfáticos, piel, pulmón, próstata, hueso, músculo, hígado, bazo y útero. Sin embargo aunque estas amibas pueden causar enfermedades severas, la casuística de infecciones en el humano es baja (Gallegos, 1997).

Se diferencian tres enfermedades bien marcadas debido a los signos y síntomas que se observan en la infección:

- ♦ Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), causada por especies del género *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris*.

- ♦ Queratitis amibiana crónica, producida por algunas especies del género *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*.
- ♦ Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), originada por *Naegleria fowleri*.

De los géneros mencionados anteriormente las especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* son los organismos del grupo de AVL más comúnmente encontrados en el suelo y en el agua. Dentro de este género existen 7 especies que son patógenas para el ser humano (*A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. palestinensis*, y *A. hatchetti* y *A. rhysodes*). Estos microorganismos se comportan como oportunistas, ya que se les ha encontrado como habitantes de las fosas nasales en humanos (Cerva *et al.*, 1973; Rivera *et al.*, 1986; John, 1993).

GENERALIDADES DE AMIBAS DE VIDA LIBRE PATÓGENAS

Naegleria spp.

El género *Naegleria* se ubica taxonómicamente dentro de la familia *Vahlkampfiidae*, cuenta con seis especies (*N. fowleri*, *N. australiensis*, *N. lovaniensis*, *N. gruberi* y *N. jadini*) y con dos subespecies (*N. australiensis itálica* y *N. lovaniensis tarasca*). Este organismo ha sido encontrado alrededor del mundo en suelo, lagos, ríos y aguas calentadas artificialmente por termoeléctricas (John, 1982). Se reproduce por fisión binaria en etapa de trofozoíto el cual mide de 15-28 μm tiene un desplazamiento muy rápido por la formación de lobópodos eruptivos hialinos, se transforma a una etapa flagelada cuando el alimento es escaso o, bajo condiciones más adversas como temperaturas bajas, o cuando son expuestos los trofozoítos en agua destilada a 37°C entre 60 y 90 minutos. El quiste es esférico y tiene una sola cubierta con uno o varios poros sobre su pared, y mide entre 8 y 22 μm de diámetro. El quiste puede sobrevivir por varios meses a 4 °C (Martínez, 1980).

Dentro del género *Naegleria* existe una especie *Naegleria fowleri* la cual se ha observado que causa una rara infección cerebral de tipo fulminante llamada meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP). La infección se adquiere por la entrada de los trofozoítos al epitelio olfatorio y vía la placa cribosa de la nariz alcanza el SNC. El periodo de incubación puede ser de 2 a 3 días o de 7 a 15 días, esto depende particularmente del tamaño del inóculo y de la virulencia del organismo. Por consiguiente la infección ocurre en niños, jóvenes o adultos sanos; pero que recientemente se han sumergido o caído en cuerpos de agua tibia naturales o piscinas. Los primeros tres casos de infecciones fueron descritos en Australia (Fowler y Carter, 1965). Desde entonces, más de un centenar de casos han sido descritos de los cuales solo dos se han reportado que han sobrevivido a la infección. Los síntomas ocurren usualmente dentro de una semana después de la exposición seguidas por dolor de cabeza, fiebre, vomito y rigidez del cuello (Martínez, 1980).

La MEAP es usualmente fulminante y fatal después de haber comenzado los síntomas (Martínez, 1985), como son: dolor de cabeza, fiebre, náusea, vómito, y rigidez del cuello (tabla 1), los síntomas progresan rápidamente a letargo, confusión y coma. En la mayoría de los casos registrados, el paciente muere dentro de 48 a 72 hrs. (Martínez, 2001). Cuando se realiza el análisis de un cuerpo “*post mortem*” los bulbos olfatorios se encuentran hemorrágicos y necróticos. Los trofozoítos se encuentran en los espacios perivasculares de las arterias de tamaño pequeño y medio. Cuando se presenta la infección aparece una meningitis purulenta difusa con edema cerebral. El examen de muestras frescas de líquido cerebroespinal o cortes histológicos de tejido del SNC, revelan trofozoítos en la mayoría de los casos. Para controlar la infección se tiene que iniciar lo más rápido posible un tratamiento agresivo con anfotericina B, miconazol o azitromicina esto puede ser efectivo en algunos casos pero en la mayoría de ellos los pacientes mueren (Martínez, 1985).

Tabla 1. Signos y síntomas en la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) y Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), (Tomado de Martínez, 2001).

Signos y síntomas	MEAP	EAG
Síntomas.	+	+
Anormalidades del estado mental.	+	+
Dolor de cabeza.	+	-
Fiebre: + 38.2 °C.	+	+
Nausea y vómito.	+	+
Cuello rígido.	+	+
Ataques.	+	+
Anorexia.	+	+
Problemas en la visión.	+	+
Fotofobia.	+	+
Alucinaciones.	+	+
Problemas al dormir.	-	+
Dolor de cuello.	+	-
Signos.	Principio	Último
Coma.	-	+
Papiledema	+	+
Parálisis de nervios craneales (nervios III y VI).	+	-
Causa de la muerte.	Ataque cardiorrespiratorio, edema pulmonar y edema cerebral.	Bronconeumonía, falla del hígado y riñón.

Los trofozoítos son activos y constantemente cambian de forma y tamaño (Fig. 1). Cuando están redondeados llegan a medir de 10 a 15 μm de diámetro. Su citoplasma es finamente granular y contiene un halo nuclear conspicuo y un denso nucleolo central. Numerosas vacuolas están visibles en el citoplasma. Los trofozoítos se desplazan produciendo lobópodos los cuales están claros inicialmente pero llenos con citoplasma granular. Bajo condiciones adversas, el trofozoíto enquistado. El quiste es esférico, con un tamaño de 8-12 μm , con una simple cubierta lisa. También tiene poros a través de los cuales el trofozoíto emerge. El citoplasma del quiste es finamente granular, con un característico núcleo central. Cuando se exponen a agua destilada, los trofozoítos pueden pasar a una etapa flagelada.

Acanthamoeba spp.

La morfología del trofozoíto del género *Acanthamoeba* es irregular, este presenta un desplazamiento lento y se observan subseudopodos denominados acantópodos los cuales son cortos y muy finos, estos son producidos de los bordes anteriores del pseudópodo. Su quiste mide en promedio más de 18 μm , teniendo como característica principal dos cubiertas llamadas ectoquiste (externa) y el endoquiste (interna). El ectoquiste generalmente es ondulado, y el endoquiste es redondo, estrellado o angular; con varios poros para su exquistamiento en los bordes angulados.

Este género no presenta una fase ameboflagelada. En el caso del género *Acanthamoeba* algunas especies como *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. astronyxis*, *A. palestinensis* y *A. rhyzodes* tienen la capacidad de producir en el humano una enfermedad denominada

encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), se caracteriza por la formación de granulomas en el sistema nervioso que se forman porque el organismo responde a las amebas encapsulándolas en estas estructuras provocando a largo plazo la enfermedad crónica con síntomas de confusión mental de diverso grado, como: cefalea, fiebre, irritación meníngea, náusea y vómito. Las acantamebas patógenas pueden causar infecciones graves en otros órganos como son: pulmón, piel, ojos y oídos (Kilvington *et al.*, 1991).

El periodo de incubación es de varias semanas o meses para que la enfermedad se establezca. La entrada puede ser a través de la piel o mucosas, así como por la aspiración nasal de agua o aire contaminados con amibas o quistes viables de las mismas. Una vez en el organismo, se establece una lesión primaria desde la cual, por vía hematogena, las amibas alcanzan el sistema nervioso central. En este tipo de infección del SNC en las lesiones se pueden encontrar tanto trofozoítos como quistes (Martínez y Janitshke, 1985; John, 1993).

La EAG presenta un largo curso clínico con signos y síntomas neurológicos que dependen del sitio que se encuentra dañado por los trofozoítos. La EAG se presenta principalmente en pacientes crónicamente debilitados por otros padecimientos, en pacientes bajo tratamiento inmunosupresivo, o que tienen comprometidos los mecanismos inmunológicos, incluyendo aquellos con SIDA (Tabla 2) (síndrome de inmunodeficiencia adquirida) (González *et al.*, 1986; Willey *et al.*, 1987; Anzil *et al.*, 1991).

Acanthamoeba spp. puede formar parte de la fauna normal de individuos saludables y generalmente se comporta como un organismo oportunista, excepto en la queratitis ocular, en la que infecta a individuos sanos y la invasión es directa en la córnea después de un traumatismo o en usuarios de lentes de contacto contaminados (Khan, 2003).

Tabla 2. Comparación de enfermedades causadas por *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. y *Balamuthia mandrillaris* (Tomado de Martínez, 2001).

Amiba	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba</i> spp./ <i>Balamuthia mandrillaris</i>
Morfología	Trofozoítos: 10-15µm diam, forma “limax”; quiste: 8-12µm, esférico, una sola cubierta; una etapa flagelada.	Trofozoítos: 25-40 µm, con delgados y filosos seudópodos “acantópodos”; quiste: esférico, doble capa, ecto y endoquiste poligonal.
Enfermedad.	Meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP).	Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) <i>Acanthamoeba</i> (Queratitis).
No. de casos reportados hasta	Cerca de 175 casos.	EAG: + 140 casos. Queratitis: + 600 casos.

1995.		
Epidemiología.	Individuos sanos pero que han nadado o han estado en contacto con agua tibia contaminada.	Individuos inmunodeprimidos (ej. SIDA).
Periodo de incubación.	3-7 días.	Probablemente más de 10 días.
Portal de entrada.	Neuroepitelio olfatorio.	Piel, Pulmones y Neuroepitelio olfatorio.
Velocidad de la enfermedad.	Rápida.	Lenta e insidiosa.
Vía hacia SNC.	Directa; plexus nervioso amielínico.	Probablemente hematogena.
Órganos afectados.	Cerebro solamente.	Cerebro, piel, ojos y pulmones.
Curso clínico.	Agudo, fulminante, fatal en 7 días.	Subagudo (8-30 días) o crónico (+ de 32 días).
Signos y síntomas.	Dolor de cabeza, anorexia, nauseas, vómito, fiebre, anormalidades mentales, meningitis y ataques.	Anormalidades mentales, ataques, fiebre, dolor de cabeza, meningitis, ulceraciones en piel, anormalidades visuales.
Complicaciones oculares.	Ninguna.	Queratitis.
Diagnóstico de laboratorio y FCE.	FCE similar a meningitis bacteriana, neutrofilia, pleiocitosis, glucosa baja, examen directo de muestras frescas de FCE, cultivo de tejidos o inoculación de ratones con trofozoítos.	FCE similar a cuando se tiene encefalitis viral, cultivo de tejidos o inoculación de ratones con trofozoítos.
Forma de amibas en el SNC.	Trofozoítos.	Trofozoítos y quistes.
Tratamiento.	Anfotericina B + miconazol + rifampicina.	Sulfadiazina, ketoconazol, isocianato de propamidina, (Queratitis).

*FCE: Fluido cerebro espinal.

Las dos formas del ciclo de vida (trofozoíto y quiste) de *Acanthamoeba* spp. se pueden encontrar en los tejidos del huésped humano. La vía de acceso puede ser por instilación nasal, ya que los trofozoítos de *Acanthamoeba* son capaces de invadir la mucosa nasal y causar enfermedad fatal en el SNC de animales de experimentación (Culbertson *et al.*, 1958; Martínez *et al.*, 1977).

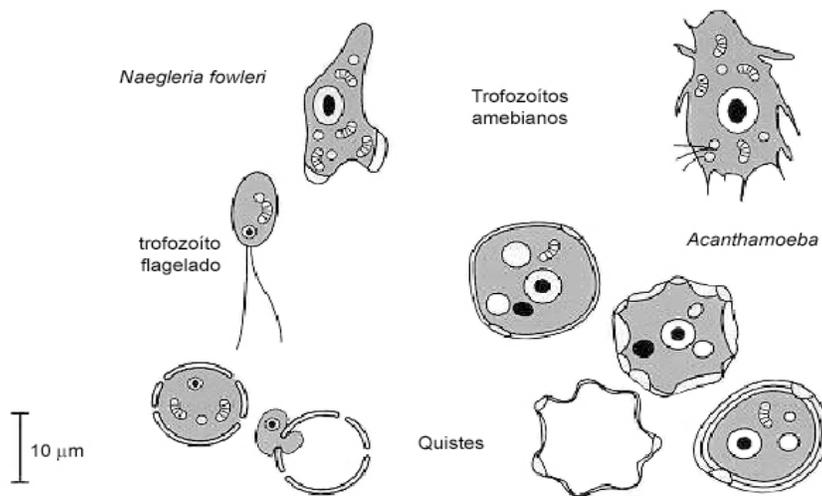


Figura 1. Comparación de la morfología entre *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* spp.

Balamuthia mandrillaris

Este es un protozoo de vida libre el cual fue aislado de un mandril babuino (*Papio sphinx*) (Visvesvara *et al.*, 1993). *Balamuthia mandrillaris* es actualmente la única especie de el género que causa encefalitis amibiana granulomatosa en humanos (Reed *et al.*, 1997). *B. mandrillaris* es una descripción nueva como patógena la cual ataca usualmente a individuos inmunosuprimidos (Katz *et al.*, 2000). El trofozoito de *B. mandrillaris* esta caracterizado por tener un retículo endoplásmico peculiar parecido a una cinta. El nucleolo es muy denso y parece estar dividido en dos, esta es una característica que se utiliza para diferenciar a esta amiba del género *Acanthamoeba* especialmente cuando se observa en una sección histológica. El núcleo posee vesículas características en el citoplasma (Martínez *et al.*, 2001).

Se han reportado casos de patologías que provienen de *B. mandrillaris* con ataques idiopáticos con neutropenia crónica de causas desconocidas, letargo progresivo, dolor de cabeza, con coma y muerte a los tres meses de haber comenzado los síntomas. En los exámenes microscópicos se han observado numerosos trofozoitos amebianos, los cuales, mediante pruebas de inmunofluorecencia indirecta, quedaron identificados como trofozoitos de *B. mandrillaris* (Rodríguez *et al.*, 1998).

Mediante resonancias magnéticas craneales se analizan imágenes que muestran un solo y gran nódulo en el lóbulo temporal seguido de lesiones en los hemisferios cerebrales que desaparecen después del tratamiento con antibióticos y altas dosis de corticoesteroides. El examen patológico de biopsias “*post mortem*” muestran trofozoitos de *Balamuthia mandrillaris* rodeados por inflamaciones granulomatosas y vasculitis. La meningoencefalitis puede ser considerada en casos de meningoencefalitis subaguda con disminución de la concentración de glucosa en el fluido cerebroespinal y múltiples

lesiones nodulares que aparecen en las imágenes por tomografía axial computarizada (TAC) del cerebro (Katz *et al.*, 2000).

Los síntomas de *Balamuthia mandrillaris* son similares a la meningitis en general (Martínez *et al.*, 2001), y en algunos casos produce síntomas que imitan un cerebro que contiene un tumor cerebral llamado “glioma” (Lowichik *et al.*, 1995). El tratamiento es incierto, sin embargo dos pacientes se han recuperado después de la administración de una mezcla de antibióticos (Martínez *et al.*, 2001).

Las infecciones de *B. mandrillaris* han sido reportadas tanto en pacientes inmunocompetidos como en pacientes inmunocompetentes, principalmente de personas jóvenes (Schuster, 2002).

***Hartmannella* spp.**

Las amibas del género *Hartmannella* son organismos que tienen un trofozoíto alargado y monopodial, su forma es “limax”, estas amibas presentan un desplazamiento con suaves movimientos de extensión del pseudópodo anterior. Los quistes son de forma esférica con paredes lisas sin fase flagelar. Las especies del género *Hartmannella* han sido halladas con cierta frecuencia en muestras de agua y de suelo (Kasprzak, 1982).

En 1973 Cerva, detecta la presencia de estas amebas en la mucosa nasal de seres humanos. Su patogenicidad ha sido probada en varios ensayos de laboratorio los cuales han resultado negativos. Page (1988) ubica taxonómicamente el género *Hartmannella* en la clase Lobosea la cual deriva en la familia Hartmannellidae. Algunas características estructurales como: estructuras muy delicadas en forma de copa sobre la superficie de la membrana, las cuales forman un glicocáliz; permiten distinguir estas amebas de otros grupos como Heterolobosea y Leptomyxidae con los cuales existe una gran relación (Gallegos, 1992).

Hartmannella es de tamaño variable, su longitud oscila entre 10 y 18 μm . Durante su locomoción su forma más aparente es de limax, tiene bien diferenciado el endoplasma del ectoplasma. Presentan un núcleo aunque puede haber especies binucleadas. Sus mitocondrias son alargadas y sirven como criterio para su identificación. No presentan una etapa ameboflagelada en ninguna de sus fases. Sus quistes son de diferentes tamaños con pared doble. Estas amibas llevan a cabo la división mitótica, en la cual el nucleolo central va desapareciendo gradualmente durante la profase. En la metafase desaparece la membrana nuclear (Gallegos, 1992).

En 1992 se demuestra la presencia de *Hartmannella* en tejidos corneales en lentes de contacto usados por un paciente con queratitis (Aitken *et al.*, 1996). A pesar de que el género *Hartmannella* ha sido incluido en la lista de parásitos humanos (García, 1997), la capacidad de producir enfermedades en humanos y animales esta en controversia. Amibas pertenecientes al género *Hartmannella* se han encontrado con cierta frecuencia en muestras de agua dulce y de suelo (Kasprzak, 1982), en diferentes partes del mundo.

Cerva en 1973, registró la presencia de estas amibas en la mucosa nasal de los seres humanos. (Gallegos, 1992).

En el caso particular de México en 1992 Gallegos describe a una amiba de vida libre perteneciente al género *Hartmannella*, que provocó la evolución de un cuadro de meningoencefalitis en un paciente.

***Vahlkampfia* spp.**

Los quistes de este género carecen de poros, para su exquistamiento; no se observan gránulos perinucleares. No hay una fase flagelada. Algunas especies pueden presentar pigmentación.

Aitken y colaboradores 1996, reporta que en su laboratorio se demostró la presencia de *Vahlkampfia* en tejidos corneales en lentes de contacto usados por un paciente con queratitis desde 1992.

Vahlkampfia y *Hartmannella* producen efectos citopáticos semejantes con destrucción casi completa de la monocapa corneal en 24 h. (Kinnear, 2003).

Tabla 3. Efecto citopático que presentan tres géneros amibianos en células de la córnea humana (Kinnear, 2003).

Tiempo (h)	Géneros amibianos (10 ⁶ /ml)		
	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Vahlkampfia</i>	<i>Hartmannella</i>
3	+	+-	+-
6	++	+	+
9	+++	++	++
24	++++	++++	++++

Clave:

- +- Aparición de zonas de lisis asociadas con disminución celular.
- + 0-25% de monocapas destruidas
- ++ 25-50% de monocapas destruidas
- +++ 50-75% de monocapas destruidas
- ++++ 75-100% de monocapas destruidas

Aunque el grado de destrucción fue similar después de 24 h. de incubación, fue más rápido el daño producido por *Acanthamoeba*. De esta manera en orden para maximizar alguna diferencia, la proporción de células sobrevivientes después de 6 h. de incubación fue evaluada para los tres géneros diferentes.

Los experimentos presentados aquí sugieren que esos tres géneros de amibas de vida libre están tienen capacidad para producir un efecto citopático sobre los queratocitos lo que es equivalente en grado y mecanismo al producido por un aislado de *Acanthamoeba* el cual es conocido por ser patógeno (Kinnear, 2003).

Ciclos de vida.

En el ciclo de vida de las AVL se incluyen una fase trófica en la que la amiba se alimenta y reproduce y una fase quística, que representa el estado de resistencia. Algunos organismos pertenecientes a la familia Vahlkampfiidae presentan una fase ameboflagelar la cual es una de sus características distintivas.

3. UBICACIÓN TAXONOMICA

Se han propuesto varias clasificaciones, basadas principalmente en aspectos morfológicos del trofozoito y del quiste. Sin embargo, debido a que las características morfológicas son comunes para muchas amibas, en algunos casos se presentan dificultades de identificación. En ocasiones es necesario tomar en cuenta criterios tales como la ultraestructura, pruebas de transformación o de virulencia, movilidad, requerimientos nutricionales, patrón de división nuclear, tolerancia a la temperatura, forma de crecimiento en cultivo. Para hacer una identificación precisa de las AVL se han adoptado nuevas metodologías diagnósticas como las pruebas inmunológicas, los patrones de zimodemos de extractos crudos y sondas específicas de ADN (De Jonckheere, 1984, 1987; Ferrante, 1991; Kilvington 1995).

En la tabla 4 se presenta el sistema taxonómico más aceptado y que describe con precisión el lugar que ocupan las amibas tratadas en este trabajo de tesis en el grupo de los protozoos, el cual corresponde a Lee y colaboradores (1985).

Tabla 4. Clasificación taxonómica de los géneros que pueden causar enfermedades en el humano (Tomado de Lee *et al.*, 1985)

Reino:	Protista Haeckel, 1866.
Subreino:	Protozoa Goldfuss, 1818; emend. von Siebold, 1846
Phylum:	Sarcomastigophora, Honinberg y Balamuth, 1963
Subphylum:	Sarcodina, Schmarda, 1871
Superclase:	Rhizopodea, von Siebold, 1845
Clase:	Lobosea, Carpenter, 1861
Subclase:	Gymnamoebia, Haeckel, 1862
Orden:	Amoebidae, Kent, 1880
Suborden:	Tubulina, Bovee y Jahn, 1966
Familia:	Hartmannellidae, Volkonsky, 1931; emend. Page, 1974
Género:	<i>Hartmannella</i> Alexeieff, 1912; emend. Page, 1974
Suborden:	Acanthapodina Page, 1976
Familia:	Acanthamoebidae Sawyer y Griffin, 1975
Género:	<i>Acanthamoeba</i> Volkonsky, 1931; emend. Page, 1967
Orden:	Schizopyrenidae Singh, 1952
Familia:	Vahlkampfiidae Jollos, 1917; Zulueta, 1917
Género:	<i>Naegleria</i> Alexeieff, 1912; emend. Calkins, 1913
Clase:	Acarpomyxea Page, 1976
Orden:	Leptomyxida Pussard, 1975
Familia:	Leptomyxidae Goodey, 1915
Género:	<i>Balamuthia</i> Visvesvara, 1993

4. ANTECEDENTES

Antecedentes del estudio de las amibas de vida libre.

El origen del estudio de las amibas de vida libre se inicia con las observaciones de Antonio van Leeuwenhoek quien en 1674 se convierte en la primera persona en observar protozoos de vida libre bajo el microscopio en una gota de agua; posteriormente otro hallazgo importante en este campo de la ciencia ocurre en el año de 1841 cuando Dujardin en Francia (Page, 1966), describe por primera vez una amiba pequeña de vida libre asignándole el nombre de *Amoeba limax*.

Después en 1879, Leidy, realiza el primer estudio monográfico sobre las amibas limax, años más tarde en 1892, Flexner reportó un absceso en la mandíbula de una mujer de 60 años, debido probablemente a amibas de vida libre (Martínez, 1985). Continuando en el ámbito de la protozoología en 1899, Scharfingger observó por primera vez una amiba flagelada y le dio el nombre de *Amoeba gruberi*; en 1900, Dangeard estudio y describió la mitosis de *Acanthamoeba hyalina* y afirmó que “no había nada más difícil que clasificar una amiba”. Once años más tarde en 1911, Alexeieff establece el género *Hartmannella* y en 1912 propone el nombre del género *Naegleria* para las amibas limax capaces de realizar la transformación temporal a una fase flagelada y su división nuclear caracterizada por promitosis que se caracteriza por la permanencia de la membrana nuclear durante el proceso de la división celular. En ese mismo año Chatton y LaLung-Bonnare describieron el género *Vahlkampfia* por la ausencia de una fase flagelada (Martínez, 1985). En 1930, se marca una pauta importante en el estudio de las amibas cuando Castellani reportó el crecimiento de una amiba limax en una placa de agar inoculada previamente con levaduras y bacterias. En ese mismo año Douglas clasificó a esta amiba como *Hartmannella castellanii*. Desde entonces el método de placa de agar inoculado con bacteria ha sido utilizado en los estudios de la biología de las amibas anfizóicas (Singh, 1941).

Antecedentes de casos reportados en México.

En México existen las condiciones adecuadas para el desarrollo de amebas patógenas las cuales pueden causar problemas muy severos para el humano. El problema se centra en la dificultad que existe para la identificación de las amebas ya sea por observación directa de los fluidos corporales como el líquido cefalorraquídeo que es el lugar en donde se puede encontrar a las amibas para su diagnóstico, o bien a partir de cultivos en medios de agar especiales. Para una persona sin experiencia estos organismos pueden pasar desapercibidas como simples células, leucocitos o partículas de sedimento del mismo fluido o medio de cultivo (Tamayo, 1980).

En México se han detectado 11 casos comprobados de MEAP de los cuales se han publicado 3. El primero de ellos se reportó en Mexicali B. C. (Valenzuela, *et al.*, 1984), en un adolescente varón de 16 años. La historia clínica señaló que su ingreso al hospital fue debido a un intenso dolor de cabeza y que siete días antes el paciente había nadado en

un canal de riego de poca profundidad. Las altas temperaturas que se alcanzan en el verano en el estado de Baja California (alrededor de 47 °C a la sombra), hacen que el nadar en cuerpos de agua de casi cualquier tipo sea una práctica muy frecuente en la zona. En este caso el paciente murió tres días después de haber sido hospitalizado (Calderón, 1994).

La observación del líquido cefalorraquídeo mostró formas amebianas en movimiento activo. El análisis “*post mortem*” reveló una meningoencefalitis con hemorragia severa y amplia destrucción de la fosa posterior del cerebro. La tinción con inmunoperoxidasas para las amebas aisladas del tejido cerebral, fue positiva para *Naegleria fowleri* (Calderón, 1994).

El segundo caso de MEAP por *Naegleria fowleri* fue identificado en Monterrey N. L. (Rodríguez, 1984). El diagnóstico en este caso se hizo a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo y la observación directa de las muestras así como las preparaciones con la técnica de tinción de Gómori revelaron que el proceso infeccioso fue provocado por *N. fowleri*. Un hecho notable en este caso fue que el paciente sobrevivió después un tratamiento a base de anfotericina B.

El tercer caso de MEAP descrito en México en la población de Huetamo, en el estado de Michoacán (López-Corella, *et al.*, 1989) reporta la muerte de un joven de 13 años por meningoencefalitis con necrosis parenquimatosa con destrucción del cerebelo. Las muestras tomadas de las lesiones del tejido nervioso mostraron numerosos trofozoítos de amibas, los cuales fueron posteriormente identificados por inmunohistoquímica como *N. fowleri*. En este caso, quedó sin precisar el origen de la infección pero se presume que pudo haberse adquirido en una poza de cría de peces ya que el paciente nadaba en ese lugar con frecuencia.

5. JUSTIFICACIÓN

Desde hace tres años se inició un proyecto de investigación conjunto entre la FES Iztacala UNAM y el IMSS para detectar la presencia de amebas patógenas de vida libre de la especie *Naegleria fowleri* en el agua de los canales de riego del Valle de Mexicali, Baja California. El interés por detectar a *Naegleria fowleri* en esta zona se originó por el reporte de brotes anuales de meningoccefalitis de etiología desconocida principalmente en jóvenes que utilizaban estos canales de riego para nadar y refrescarse del excesivo calor del Valle, principalmente en el verano donde las temperaturas pueden alcanzar hasta los 55 °C a la sombra. En el caso de los pacientes de Mexicali diagnosticados con infección de meningoccefalitis, los signos y síntomas así como los análisis negativos para bacterias, hongos y virus, hicieron pensar en *N. fowleri* como el organismo causante de las infecciones.

Se hicieron estudios protozoológicos en los canales de riego del Valle de Mexicali, recolectando muestras de agua de la red de canales para ser analizadas por microscopía, aislamiento en cultivos y técnicas de biología molecular en busca de *N. fowleri*, los resultados mostraron la presencia del protozoo con una amplia distribución en el sistema de riego. Sin embargo, además de este patógeno se aislaron un gran número de especies de AVL's diferentes a *N. fowleri* entre las que destacan diferentes especies de amebas de los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Hartmannella* destacándolos entre otros porque en la literatura se han reportado algunas especies patógenas para el humano.

En el presente estudio se pretende identificar todos los organismos aislados de los canales de riego de Mexicali además de *N. fowleri* y probar su capacidad para producir infecciones en animales de laboratorio, con el fin de evaluar su potencial para infectar al ser humano y determinar con base en los resultados amebológicos el impacto de su presencia en los canales de riego para la salud de los usuarios de estas aguas.

6. OBJETIVOS

General

- ⊖ Detectar a las amibas de vida libre potencialmente patógenas presentes en el agua de los canales de riego, del Valle de Mexicali, Baja California.

Particulares

- ⊖ Aislar amibas de vida libre patógenas presentes en el agua de los canales de riego, del Valle de Mexicali, Baja California.
- ⊖ Identificar por microscopía de luz los géneros de amebas patógenas aisladas.
- ⊖ Valorar el potencial patógeno de los aislados amebianos en pruebas de patogenicidad en animales de laboratorio.
- ⊖ Determinar la relación de la presencia de AVL con los parámetros biológicos y los parámetros ambientales.
- ⊖ Ubicar los canales de riego en Mexicali, Baja California donde puedan encontrarse especies de amebas de vida libre patógenas.

7. UBICACIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

La península de Baja California esta situada en el extremo noroccidental del país, formando una estrecha franja de tierra que se desprende de la frontera con los Estados Unidos, internándose en el mar paralelo a la costa continental, entre el Océano Pacífico y el Mar de Cortés. Uniéndose al resto del país por un estrecho corredor desértico en la porción noreste. En el lugar predomina un clima seco y extremoso, exceptuando la porción noreste particularmente en las zonas más elevadas, lo que favorece la existencia de vegetación desértica con desiertos pedregosos poblados por vegetación xerófila (García, 1988).

Mexicali es la actual capital del estado de Baja California, en la frontera con los Estados Unidos, surge a fines del siglo XIX como consecuencia del aprovechamiento de las aguas del Río Colorado que convierte al Valle de Mexicali en una de las zonas más fértiles del país. En la figura 2, se muestra la ubicación del área de estudio.

El clima predominante es del tipo BW(h1) hs (x1)(e1) según (García, 1988), es decir es muy seco, o desértico, cálido muy extremoso con verano seco. La temperatura promedio es de 23.2 °C con las temperaturas más altas de 48 °C en el mes de mayo y la más baja de 12 °C durante el mes de enero.

El servicio de agua potable de la ciudad de Mexicali y en algunos poblados del Valle, es administrado por la Comisión Estatal de Servicios Públicos de Mexicali (CESPM), que es un organismo descentralizado del Gobierno del Estado. El agua de que se abastece Mexicali proviene del Río Colorado, que nace al norte del estado de Colorado, Estados Unidos de Norteamérica, se origina por deshielos de las montañas rocallosas a una altura de 4,276 metros y recorre aproximadamente 2,735 kilómetros, atravesando 7 estados de aquel país: Colorado, Utah, Wyoming, Nevada, California, Arizona y Nuevo México. Llegando a la presa Morelos, ubicada a una distancia de 85 kilómetros al oriente de la ciudad, el agua fluye a través de diversos canales de riego hasta llegar al canal Barrassini. Este es apropiadamente el canal alimentador de las plantas potabilizadoras I y II de la ciudad de Mexicali.

El sistema de riego agrícola del Valle de Mexicali esta formado por una compleja red de canales revestidos de concreto que distribuyen el agua proveniente del Río Colorado. Los canales de riego del Valle de Mexicali son someros de aguas transparentes y de corrientes lentas una característica aparente de estos sistemas es la presencia de hidrófitas que varían en densidad a lo largo del sistema de canales. Se ha identificado a la hidrilla (*Hydrilla verticillata*) como la principal planta acuática que se desarrolla en el agua, esta se encuentra dentro de la serie de registros de plantas acuáticas mexicanas (L. f) Royle (Hydrocharitaceae) (Lot *et al.*, 1986) representando un caso especial por el peligro actual y potencial que representa para los cuerpos de agua de nuestro país, pues es considerada una de las malezas acuáticas más agresivas y difíciles de controlar de todo el mundo. *H. verticillata* es una planta acuática que crece enraizada y totalmente sumergida. La profundidad a la que crece depende de la turbidez del agua, prefiriendo aguas someras, transparentes y con movimiento moderado; adaptándose a diferentes calidades de agua,

desde las oligotróficas a las eutróficas, y aún tolera aguas alcalinas y salobres (Cook y Lüond, 1982). La importancia de esta planta radica en que crece y cubre grandes extensiones del cuerpo de agua en poco tiempo por medio de una reproducción vegetativa, puesto que cualquier pequeño fragmento del vegetal, al quedar enraizado, puede dar origen a otra nueva planta.

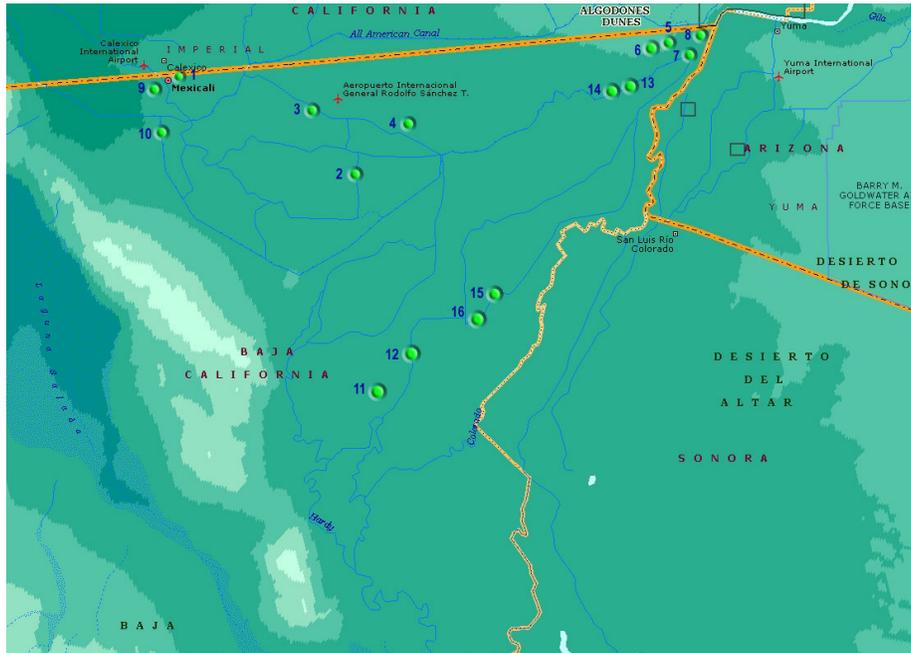


Figura 2. Imagen que muestra la ubicación de los sitios de muestreo en el Valle de Mexicali, Baja California.

Tabla 5. Muestra el número, nombre y clave del canal correspondiente a la figura 2.

No. de canal	Nombre del canal	Clave
1	Independencia "Ley"	IND
2	Abasolo	ABS
3	Islas Agrarias B	IAB
4	Irapuato	IRA
5	Col. Ladrillera 1	LA1
6	Col. Ladrillera 2	LA2
7	Alimentador Norte	ANI
8	Represa Matamoros	RPM
9	Coronita	COR
10	Xochimilco	XCH
11	Nayarit	NAY
12	Oaxaca	OAX
13	Ejido Morelos Independencia	MOR
14	Ejido Morelos Chapoteadero	MOC
15	Silva Sur 1	SL1
16	Silva Sur 2	SL2

8. MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizaron 3 muestreos de campo en 14 canales de riego distribuidos en el Valle de Mexicali, Baja California en agosto de 2001 y en los meses de febrero y septiembre de 2002 (tabla, 5).

Trabajo de Campo.

La selección de los sitios de muestreo se hizo tomando en consideración aquellos canales de riego que habían sido mencionados por algunos de los pacientes diagnosticados con meningoencefalitis amibiana por haber nadado en ellos previo a la adquisición de la infección.

Análisis "in situ" de los parámetros fisicoquímicos del agua.

Temperatura del agua. Para registrar esta temperatura en cada uno de los lugares muestreados, se utilizó un termómetro digital (HI9040 Hanna Instruments), sumergiendo la sonda en el agua y manteniéndola en posición hasta obtener una lectura estable. La determinación del factor temperatura es importante para este estudio dado que las AVL en general se desarrollan mejor en cuerpos de agua con temperaturas elevadas las cuales favorecen la presencia de AVL patógenas.

Temperatura ambiente. En este caso se utilizó también un termómetro digital Hanna HI9040 (Hanna Instruments), la lectura de este parámetro está relacionada con la temperatura del agua ya que el ambiente es uno de los factores que determinarán la temperatura del agua y ello podría estimular o inhibir la presencia de las AVL.

pH. Para medir el pH se utilizó un potenciómetro digital pH Testr2, (Oakton Instruments), es importante tomar en cuenta este parámetro ya que las AVL pueden cambiar su ciclo de vida pasando de una fase trófica a una quística dependiendo de las variaciones que este factor pueda presentar en el agua.

Oxígeno disuelto. Las lecturas de oxígeno disuelto se hicieron con un oxímetro digital VWR 4000 (VWR Scientific), calibrado a la salinidad y altura sobre el nivel del mar con una sonda de temperatura integrada para también es importante analizar los niveles en los que se encuentra y analizar las fluctuaciones que este pueda tener en los sitios de muestreo ya que estos organismos son estrictamente aerobios.

Conductividad. La conductividad sales y partículas disueltas (conductímetro Walklab Trans Instruments), es una expresión numérica de la capacidad de una solución para transportar una corriente eléctrica. Esta capacidad depende de la presencia de iones y de su concentración total, de su movilidad, valencia y concentraciones relativas, así como la temperatura de la medición.

Recolecta de muestras de agua para el aislamiento de AVL

Se tomaron muestras de agua en volúmenes de 1 litro en frascos estériles de polipropileno. La recolección de muestras se hizo a lo largo de los primeros 50 cm. de la columna de agua, la cual representa el área de mayor contacto de los bañistas. Se tomaron muestras tratando de incluir sedimento, cuando lo hubiera ya que la concentración de amibas de vida libre es mayor en el sedimento debido a la cantidad de materia orgánica (MO) que se encuentra en esta fase (Rodríguez, 1994). Sin embargo, al momento de los muestreos, el mantenimiento de los canales y la calidad del agua que fluye a través de ellos hizo que fuera difícil recolectar sedimento en casi todos los cuerpos de agua muestreados.

Trabajo de laboratorio

Identificación y cuenta de coliformes totales en el agua.

Para detectar y cuantificar el número de coliformes totales se utilizó el kit de Millipore "Coli Count", la selección de este método se hizo tomando en consideración el tiempo en el que se podría procesar una muestra para el análisis bacteriano considerando la distancia entre el sitio de muestreo y el laboratorio, aunque las muestras fueron transportadas en avión. Muestras de agua fueron inoculadas *in situ* según las instrucciones del fabricante y en el menor tiempo posible fueron incubadas a una temperatura de 37°C, las placas se analizaron para observar el color (necesario para la identificación de coliformes) y contar el número de colonias que se desarrollaron después de 24 y 48 hrs. Para el conteo de coliformes se ubicaron las colonias de color azul, registró la cantidad en la placa y se reportó el número de bacterias en UFC/100 ml de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En los ambientes acuáticos naturales la fuente principal de alimentación de AVL's son las poblaciones bacterianas. Las amibas de vida libre pueden alimentarse de algunos protozoos pequeños, algas y hongos, sin embargo, tienen preferencia por células bacterianas como fuente de carbono. Se sabe que en muchos casos, en ambientes naturales, la abundancia de las poblaciones amebianas dependen en gran medida del número de bacterias presentes en el medio (Rodríguez, 1994).

Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre

Las muestras se procesaron por el método descrito por De Jonckheere (1977) para aislar amebas de vida libre. Se recolectaron de cada canal de riego seleccionado volúmenes de agua de 50 ml los cuales se centrifugaron a 2000 X g durante 10 min. (Centrifuga Eppendorf 5403), el sobrenadante se desechó y el sedimento se inoculó en placas de Petri con medio de agar no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* (NNE), se incubaron a 30 °C y se guardaron en bolsas de plástico para evitar la desecación. Las muestras sembradas en placas de agar NNE fueron observadas diariamente para detectar el crecimiento de formas amebianas reportando las características morfológicas de cada aislado.

Clonación

En el agua de los diferentes canales de riego de Mexicali se identificaron dos o más formas amebianas correspondientes a diferentes géneros o especies de amibas de vida libre. Con el fin de separar a los diferentes organismos para su identificación y análisis, los cultivos amebianos se hicieron crecer en placas de Petri con medio NNE por 24 hrs. Transcurrido este tiempo los aislados amebianos que crecieron en las placas se observaron con el microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100) a 40 x y se separaron de cada caja los organismos amebianos de forma y tamaño distintos. Para ello se localizó en el agar a un organismo o grupo de organismos iguales y se cortó ese segmento cuidando de no arrastrar otros organismos y el trozo de agar fue transferido a una placa nueva de NNE para hacerlo crecer y tener una placa con organismos de un solo tipo. Las placas obtenidas de esta manera se siguieron guardando de forma invertida en bolsas de plástico a temperatura ambiente para controlar su crecimiento hasta que fuera necesario obtener cultivos en masa para los análisis donde sea necesario.

Axenización

Una vez identificados y clonados los aislados de AVL se transfirieron a tubos con medio líquido de PBSGM (Phosphate Bactocasitone Serum Glucose Medium) conocido comúnmente como medio de Chang (para ver su formulación revisar anexo), este procedimiento se utiliza para axenizar los cultivos es decir para obtener cultivos amebianos puros libres de la bacteria utilizada originalmente en el medio NNE para hacer crecer microorganismos amebianos.

El medio axénico de Chang contiene, sales, glucosa y suero fetal de bovino como fuente de carbono. A este medio además se le agrega una mezcla de antibióticos con el fin de evitar contaminación bacteriana externas en los cultivos axénicos. Los antibióticos que se agregaron fueron penicilina G sal sódica, estreptomycin y kanamicina a una concentración de 200 µg/ml (De Jonckheere, 1977).

Para obtener un cultivo amebiano axénico, con ayuda del microscopio invertido, se selecciona en la placa de NNE una zona de abundante crecimiento de trofozoítos y se corta de ese sitio un segmento de agar de 5 mm² el cual se transfiere a un tubo de medio axénico de Chang (De Jonckheere, 1977; Rivera *et al.*, 1989). Los cultivos axénicos de amibas son útiles para facilitar la identificación de los géneros y especies amebianas, controlar el crecimiento amebiano y obtener cantidades masivas de amibas o sostener su crecimiento por períodos prolongados, aunque su principal razón de es la de obtener células amebianas puras que puedan ser utilizadas para realizar pruebas de patogenicidad en ratones, evitando inocular otros organismos (bacterias).

Las células amebianas se mantienen por periodos prolongados se haciendo resiembras mensuales en tubos con medio de Chang.

Prueba de tolerancia a la temperatura.

Duplicados de las placas de Petri con NNE inoculadas con los aislados obtenidos de las muestras de agua derivadas de los canales de riego del Valle de Mexicali, se incubaron por separado a temperaturas de 42 y 45 °C durante 72 horas. La incubación de los aislados en placas de Petri a estas temperaturas se hizo para aislar a los diferentes tipos de amibas que pudieran encontrarse en las placas de agar NNE y ello porque las diferentes especies de amibas se desarrollan en ámbitos de temperatura diferentes, y se ha observado que las amibas patógenas por lo general crecen mejor a temperaturas de incubación altas (42 a 45 °C), mientras que otras especies de amibas de vida libre lo hacen a temperaturas inferiores. Todas las cepas de amebas patógenas son termófilas pero no todas las termófilas son patógenas (Delattre y Oger, 1981; Martínez, 1985).

Transformación ameboflagelar.

Para llevar a cabo esta prueba se colocaron unas gotas de agua destilada sobre la superficie de un cultivo amibiano creciendo en placa de NNE, la placa se incubó a 37 °C durante 2 horas y se efectuaron observaciones constantes con el microscopio invertido cada 15 minutos para buscar la presencia de amibas flageladas. Esta prueba permitió separar aquellas amibas que tuvieron una fase temporal de ameboflagelación. En el grupo de amibas que presentan esta etapa se incluyen las del género y especie *Naegleria fowleri*, la cual presenta un estado temporal de flagelación (De Jonckheere, 1988).

Identificación de los aislados amibianos por microscopía de luz.

Utilizando un microscopio óptico en contraste de fases (Zeiss), se hicieron las observaciones de los organismos amibianos en sus formas tróficas y quísticas en diferentes etapas de maduración. Las muestras para la observación e identificación de los aislados fueron tomadas a partir de los cultivos de placas de agar NNE por barrido con solución salina de Page para evitar choque osmótico o de los cultivos que se axenizaron con medio de Chang.

Preparaciones de las muestras de amibas fueron observadas directamente bajo el microscopio óptico en contraste de fases a 40x. Se tomaron las medidas de 50 trofozoítos (longitud, ancho y diámetro de núcleo) y 50 quistes (diámetro) reportando el promedio de cada aislado. Se registraron las diferentes formas del trofozoíto y se buscó la presencia de poros en los quistes los cuales son importantes para la determinación de la especie. La identificación taxonómica de los aislados se hizo con la clave dicotómica de Page (1988) para la identificación de gimnamebas.

Pruebas de patogenicidad en animales de laboratorio.

La patogenicidad de los aislados amibianos se determinó en ratones machos de la cepa CD-1, de tres semanas de edad. La patogenicidad de los aislados amibianos en animales de experimentación fue ensayada por dos vías; una por el método de inoculación intracerebral y la otra por instilación nasal.

La inoculación intracerebral se hizo concentrando por centrifugación trofozoítos a partir de un cultivo axénico, en etapa de crecimiento exponencial, hasta una densidad de 1×10^6 /ml, esto se hizo por el conteo de células en un cultivo de medio de Chang de tres días, a partir de los cuales se midió diariamente la densidad de amibas por ml con un hemocitómetro, hasta que se alcanzó el nivel celular requerido. A partir de este cultivo se tomó una alícuota y se inyectó intracerebralmente en cada ratón un volumen de 20 μ l de cultivo amibiano con una jeringa para insulina a través de los huesos parietales de la articulación interparietal, hacia la línea media del cráneo a la altura de las orejas. Para la inoculación por instilación nasal, se aplicaron 20 μ l de la solución amebiana dentro de los orificios nasales de cada ratón. Ambas pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en grupos de cinco ratones cada una (Wong *et al.*, 1977; Reilly *et al.*, 1983; De Jonckheere *et al.*, 1984).

Los ratones se vigilaron diariamente para determinar la mortalidad de los mismos. Los ratones inoculados con amibas que sobrevivieron 21 días fueron sacrificados y disecados y se sembraron trozos de sus órganos (cerebro, hígado, pulmón y riñones) en placas de NNE, y se incubaron a 37 °C por 24 h. A los ratones muertos antes de los 21 días, también se les extrajeron los órganos y se sembraron de la misma manera. Una cepa amibiana se considera patógena cuando la mortalidad causada alcanza el 60% o más por cualquiera de las dos vías utilizadas (Wong *et al.*, 1977).

Análisis estadístico.

En los estudios de correlación las variables se estudian simultáneamente, para ver la forma en que se encuentran interrelacionadas. Para nuestro estudio se necesita saber si hay o no relación entre las dos variables siguientes: factores fisicoquímicos y organismos aislados.

Se correlacionaron los valores de los parámetros fisicoquímicos con la presencia o ausencia de amibas de vida libre y se aplicó el coeficiente de correlación lineal de Pearson para encontrar la probabilidad de correlación que existe entre los datos.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron tres muestreos, durante los meses de febrero, agosto y septiembre que corresponden a dos épocas del año; la más fría y la más calurosa. Con la finalidad de comprobar si la temperatura ambiental tiene alguna incidencia en la población de AVL y de relacionar su presencia en el agua de los canales, con los brotes de encefalitis que tienen lugar usualmente en el Valle.

Se seleccionaron los canales de riego en Mexicali, Baja California en base a aquellos que eran más populares para nadar y debido a que en algunos casos clínicos de encefalitis se hace referencia a que los pacientes habían nadado en algunos de estos canales con anterioridad a la manifestación de la infección (Lares-Villa, 1993).

Identificación de los aislados de amibas de vida libre

Para la identificación de amibas de vida libre se utilizan diferentes características propias de este grupo de protozoos: la identificación por morfología utilizando el microscopio óptico, la tolerancia a la temperatura, la búsqueda de una fase de transformación ameboflagelar, son factores útiles para la descripción de los aislados amibianos.

Identificación de las AVL.

En los tres muestreos se obtuvieron un total de 40 aislados amibianos pertenecientes a 9 géneros, *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Rhizamoeba*, *Rosculus*, *Naegleria*, *Vanella*, *Mayorella*, *Thecamoeba* y *Hartmannella*

En el primer muestreo, se obtuvieron e identificaron por microscopía de luz en contraste de fases, tolerancia a la temperatura y transformación ameboflagelar a 15 aislados amibianos, los cuales se muestran en la tabla 6, en esa tabla se observa que la diversidad de amibas fue baja, es decir solo se identificaron para este muestreo tres géneros de amibas de vida libre, *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Rhizamoeba*. También es notable observar que 13 de los 15 aislados pertenecen al género *Acanthamoeba* casi el 87% del total de aislados.

Otra característica que se puede apreciar en la tabla 15 es que de las 13 acantamebas aisladas, *A. castellanii* fue la especie predominante con 11 aislados comparada con 2 de *A. culbertsoni*. La ventaja del género *Acanthamoeba* con respecto al número de aislamientos encontrados en los canales de riego en este muestreo puede deberse a que ésta amiba ofrece una mejor adaptación a las condiciones que se presentan en el ambiente estudiado, se debe recordar además que la fase de quiste y además tiene gran capacidad de resistencia y puede permanecer en el medio mayor tiempo que otras especies de protozoos (Rodríguez, 1994).

Tabla 6. Géneros y especies de AVL aisladas correspondientes al muestreo I.

Canal	Muestreo I
IND	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
ABS	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
IAB	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
IRA	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
	<i>Vahlkampfia</i>
LA1	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
ANI	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
RPM	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
COR	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
XCH	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
	<i>Rhizamoeba</i>
NAY	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
OAX	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
MOI	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
MOC	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
LA 2	ND
SIL 2	ND

*ND: No determinada.

Por el contrario, los géneros de *Vahlkampfia* y *Rhizamoeba* se aislaron solamente una vez, esto pudo deberse a que las condiciones no eran las adecuadas para su desarrollo, y además se pudo haber creado un sistema de competencia en el cual sólo las amibas del género *Acanthamoeba* se pudieron desarrollar y adaptarse mejor a las condiciones del medio que otras especies de amibas (Rodríguez, 1994).

Con respecto al segundo muestreo, de los 15 canales de agua de riego en el Valle de Mexicali, se obtuvieron un total de 16 aislados (tabla 7), observándose una mayor variedad en el tipo de géneros de amibas. En este muestreo además de *A. castellanii* y *A. polyphaga*, aparecen *Naegleria fowleri* y *Vahlkampfia*; lo cual presenta relevancia, ya que son tres de los cinco géneros de amibas de vida libre relacionados con enfermedades en el ser humano. De hecho los aislados de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* representaron más del 56% del total de amibas identificadas en este muestreo.

Tabla 7. Géneros y especies aisladas de AVL correspondientes al muestreo II.

Canal	Muestreo II
IND	<i>Rosculus ithacus</i>
ABS	<i>Rosculus ithacus</i>
IAB	<i>Hartmannella</i> sp.
IRA	<i>Acanthamoeba</i> sp.
LA1	<i>Naegleria fowleri</i>
ANI	<i>Naegleria fowleri</i>
RPM	<i>Naegleria</i> sp
COR	<i>Naegleria fowleri</i>
XCH	<i>Vahlkampfia</i> sp
NAY	<i>Naegleria</i> sp
OAX	<i>Naegleria</i> sp
MOI	<i>Rosculus ithacus</i>
MOC	<i>Vahlkampfia</i> sp.
LA 2	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i>
SIL 2	<i>Vahlkampfia</i> sp.

*ND: No determinada.

Finalmente en el tercer muestreo llevado a cabo en el mes de septiembre, se obtuvieron 9 aislados pertenecientes a 7 géneros amibianos (tabla 8). Aquí se debe mencionar que en esta oportunidad solo se muestrearon 7 de los 15 canales de agua de riego propuestos inicialmente para ser estudiados, anteriormente se explicó que la razón de esta disminución en el número de sitios de muestreo fue la imposibilidad de tomar o hacer mediciones en los sitios por falta de agua, eutrofización o mantenimiento en algunos de los canales de agua.

Tabla 8. Género y especies aisladas de AVL correspondientes al muestreo III.

Canal	Muestreo III
IND	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
ABS	<i>Vanella</i> sp. <i>Mayorella</i> sp
IAB	<i>Vahlkampfia</i> sp
IRA	<i>Thecamoeba</i> sp
LA1	ND
ANI	ND
RPM	ND
COR	<i>Hartmannella</i> sp
XCH	ND
NAY	<i>Naegleria</i> spp
OAX	<i>Acanthamoeba</i> sp
MOI	ND
MOC	ND
LA 2	ND
SIL 2	ND

*ND: No determinada.

Analizando la tabla 17 se puede observar cierta homogeneidad en cuanto a la obtención de aislados amibianos. En este último muestreo se aislaron cuatro de los cinco géneros de amibas de vida libre reportados como patógenos para el ser humano (*Hartmannella*, *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Vahlkampfia*) representando el 66% del total de aislados.

Tabla 9. Número total de géneros amibianos aislados en los tres muestreos.

Canal	Género amibiano aislado								
	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Vahlkampfia</i>	<i>Rosculus</i>	<i>Hartmannella</i>	<i>Vanella</i>	<i>Mayorella</i>	<i>Thecamoeba</i>	<i>Rhizamoeba</i>
IND	3	0	0	1	0	0	0	0	0
ABS	1	0	0	1	0	1	1	0	0
IAB	1	0	1	0	1	0	0	0	0
IRA	2	0	1	0	0	0	0	1	0
LA1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
ANI	1	1	0	0	0	0	0	0	0
RPM	1	1	0	0	0	0	0	0	0
COR	1	1	0	0	1	0	0	0	0
XCH	1	0	1	0	0	0	0	0	1
NAY	1	2	0	0	0	0	0	0	0
OAX	2	1	0	0	0	0	0	0	0
MOI	1	0	0	1	0	0	0	0	0
MOC	1	0	1	0	0	0	0	0	0
LA2	2	0	0	0	0	0	0	0	0
SL2	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Total	19	7	5	3	2	1	1	1	1

Prueba de tolerancia a la temperatura.

Esta prueba se realizó para apoyar la identificación por microscopía de luz, ya que las especies pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* pueden crecer a temperaturas mayores de 37 °C, preferentemente hasta los 42 °C para *Acanthamoeba* y más de 45 °C para las amebas patógenas de género *Naegleria* (Martínez, 1985).

Para el primer muestreo (tabla 10), dos géneros de acantamebas tuvieron la capacidad de tolerar temperaturas de incubación de 42 y 45° C con una alta posibilidad de que estos aislados fueran patógenos, ya que tentativamente fueron identificados como pertenecientes a las especies *A. castellanii* y *A. culbertsoni* descritos en la literatura como

amibas capaces de producir patologías en el humano (Martinez, 1985). Por otra parte los géneros *Rhizamoeba* y *Vahlkampfia* no tuvieron la capacidad para desarrollarse en las temperaturas antes mencionadas demostrando así que no son termotolerantes.

En el segundo muestreo (tabla 11), las amibas de la especie identificada tentativamente como *N. fowleri* presentó un crecimiento considerable tanto a 42°C como a 45°C, lo mismo sucedió en el caso de *Acanthamoeba castellanii* y en el caso de *Acanthamoeba polyphaga* que crecieron hasta los 42 °C. El género *Vahlkampfia*, no creció a las temperaturas de incubación antes mencionadas, a pesar de que se le ha relacionado como causante de queratitis (Aitken, 1996).

Finalmente con respecto al tercer muestreo (tabla 12) los aislados del género *Naegleria* y los identificados como *Acanthamoeba*, *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba culbertsoni*, tuvieron la capacidad de crecer a una temperatura de 42°C.

Esta prueba es de suma importancia para este trabajo ya que nos sirve de dos formas: la primera es como una herramienta para la identificación morfológica y la otra es para saber que tan termotolerantes son; ya que en las tablas se observa que pueden soportar temperaturas que llegan a los 45°C, lo cual en caso de invadir el cuerpo humano seria importante.

Transformación ameboflagelar.

Con respecto a la transformación ameboflagelar en las tablas 10, 11 y 12 se muestran los resultados de los organismos aislados e identificados para los tres muestreos respectivamente.

En el primer muestreo no se observa ningún resultado positivo con respecto a flagelación esto se debe principalmente a que solo se aislaron dos especies de las cuales una es *Acanthamoeba castellanii*, otra *Acanthamoeba culbertsoni* y dos géneros de *Rhizamoeba* sp y *Vahlkampfia* sp de los cuales ningún organismo ha sido reportado en la literatura con capacidad de ameboflagelación.

En el segundo muestreo dos aislados presentaron flagelación, y ellos pertenecieron al género y especie *Naegleria fowleri*. Esta es la única amiba patógena a la cual se le ha reportado como capaz de presentar una etapa flagelar.

En el último muestreo la prueba resultó ser negativa para todos los aislados dentro de los cuales se encontraron dos organismos pertenecientes al género *Naegleria*.

Tabla 10. Prueba de transformación ameboflagelar y prueba de tolerancia a la temperatura, correspondientes al primer muestreo.

Canal de muestreo	Organismo aislado	Transformación ameboflagelar	Tolerancia a la temperatura		
			37°C	42°C	45°C
IND	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
ABS	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
IAB	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
IRA	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
	<i>Vahlkampfia</i>	-	+	-	-
LA1	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
ANI	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
RPM	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
COR	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
XCH	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
	<i>Rhizamoeba</i>	-	+	-	-
NAY	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
OAX	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
MOI	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
MOC	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+

Tabla 11. Prueba de transformación ameboflagelar y prueba de temperatura, correspondientes al segundo muestreo.

Canal de muestreo	Organismo aislado	Transformación ameboflagelar	Tolerancia a la temperatura		
			37°C	42°C	45°C
IND	<i>Rosculus</i>	-	+	-	-
ABS	<i>Rosculus</i>	-	+	-	-
IAB	<i>Hartmannella</i>	-	+	-	-
IRA	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	-	-
LA1	<i>Naegleria</i>	+	+	+	+
ANI	<i>Naegleria</i>	+	+	+	+
RPM	<i>Naegleria</i>	-	-	-	-
COR	<i>Naegleria</i>	+	+	+	+
XCH	<i>Vahlkampfia</i>	-	+	-	-
NAY	<i>Naegleria</i>	-	-	-	-
OAX	<i>Naegleria</i>	-	-	-	-
MOI	<i>Rosculus</i>	-	+	-	-
MOC	<i>Vahlkampfia</i>	-	+	-	-
LA 2	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	+
	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	-
SIL 2	<i>Vahlkampfia</i>	-	+	-	-

Tabla 12. Prueba de transformación ameboflagelar y prueba de temperatura, correspondiente al tercer muestreo.

Canal de muestreo	Organismo aislado	Transformación ameboflagelar	Tolerancia a la temperatura		
			37° C	42° C	45° C
IND	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	-
	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	+	-
ABS	<i>Vanella</i>	-	-	-	-
	<i>Mayorella</i>	-	-	-	-
IAB	<i>Vahlkampfia</i>	-	-	-	-
IRA	<i>Thecamoeba</i>	-	-	-	-
COR	<i>Hartmannella</i>	-	-	-	-
NAY	<i>Naegleria</i>	+	+	+	-
OAX	<i>Acanthamoeba</i>	-	+	-	-

Pruebas de patogenicidad.

De los 40 aislados de AVL, 23 de ellos correspondientes al 57.5 % resultó ser patógeno, y el otro 42.5 % no presento patogenicidad.

Los órganos (cerebro y pulmón) de los ratones que murieron o que fueron sacrificados a los 21 días de inoculación, se recuperaron y se cortaron en trozos de alrededor de 1 cm³ y fueron sembrados en placas de agar NNE, para recuperar los trofozoítos y confirmar la invasión de los órganos considerados blanco (Wong *et al.*, 1977).

La inoculación intracerebral y la instilación nasal introducen los trofozoítos directamente en cerebro y pulmón, los cuales son órganos que mantienen concentraciones altas de oxígeno, factor importante para el desarrollo de estas amibas las cuales son estrictamente aerobias.

Los resultados de la prueba de patogenicidad por muestreo y por especie de amiba se muestran en las tablas 13, 14 y 15, para los tres muestreos.

Las pruebas de patogenicidad mostraron virulencia positiva para 14 aislados amibianos, pertenecientes al género *Acanthamoeba*, incluyendo siete aislados de *A. castellanii*, dos de *A. culbertsoni*, dos de *A. polyphaga* y tres de *Acanthamoeba* sp.

Con respecto al género *Naegleria*, 6 aislados resultaron ser patógenos, cuatro de ellos pertenecen a la especie *Naegleria fowleri* y dos a una especie no determinada de *Naegleria*. De las amibas del género *Vahlkampfia* sólo se pudo probar la patogenicidad de dos de los aislados mientras que un aislado del género *Hartmannella* fue positivo en pruebas de patogenicidad.

Tabla 13. Pruebas de patogenicidad correspondientes al primer muestreo.

Aislado	% de mortalidad	Recuperación	Diagnóstico morfológico
ID(I)01	0	Negativa	<i>A. culbertsoni</i>
AB(I) 01	60	Cerebro y Pulmón	<i>A. castellanii</i>
IA(I)01	80	Cerebro y Pulmón	<i>A. castellanii</i>
IR(I)01	100	Cerebro y Pulmón	<i>Vahlkampfia</i> sp.
IR(I)02	100	Cerebro y Pulmón	<i>A. castellanii</i>
LA(I)01	60	Cerebro y Pulmón	<i>A. culbertsoni</i>
A1(I)01	0	Negativa	<i>A. castellanii</i>
RM(I)01	0	Negativa	<i>A. castellanii</i>
CO(I)01	100	Cerebro y Pulmón	<i>A. castellanii</i>
XH(I)01	0	Negativa	<i>A. castellanii</i>
XH(I)02	0	Negativa	<i>Rhizamoeba</i> sp.
NY(I)01	100	Cerebro y Pulmón	<i>A. castellanii</i>
OX(I)01	80	Cerebro y Pulmón	<i>A. castellanii</i>
MI(I)01	0	Negativa	<i>A. castellanii</i>
MC(I)01	0	Negativa	<i>A. castellanii</i>

Tabla 14. Pruebas de patogenicidad correspondientes al segundo muestreo.

Aislado	% de mortalidad	Recuperación	Diagnóstico morfológico
CO(II)01	100	Cerebro y Pulmón	<i>Naegleria fowleri</i>
NY(II)01	100	Cerebro y Pulmón	<i>Naegleria</i> sp.
IB(II)01	100	Cerebro	<i>Hartmannella</i> sp.
AB(II)01	0	Negativa	<i>Rosculus ithacus</i>
ID(II)01	80	Cerebro	<i>Acanthamoeba</i> sp.
LA1(II)01	100	Cerebro y Pulmón	<i>Naegleria fowleri</i>
LA2(II)01	100	Cerebro y Pulmón	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
LA2(II)02	100	Cerebro y Pulmón	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
XH(II)01	100	Cerebro	<i>Vahlkampfia</i> sp.
IA(II)	80	Pulmón	<i>Naegleria fowleri</i>
IR(II)	80	Cerebro y Pulmón	<i>Acanthamoeba</i> sp.
CO(II)01	60	Cerebro	<i>Naegleria fowleri</i>

Tabla 15. Pruebas de patogenicidad correspondientes al tercer muestreo.

Aislado	% mortalidad	Recuperación	Diagnóstico morfológico
CO(III)01	0	Negativa	<i>Hartmannella</i> sp.
NY(III)01	100	Cerebro	<i>Naegleria</i> sp.
OX(III)01	80	Cerebro y Pulmón	<i>Acanthamoeba</i> sp.
IR(III)01	0	Negativa	<i>Thecamoeba</i> sp.
IA(III)01	0	Negativa	<i>Vahlkampfia</i> sp.
AB(III)01	0	Negativa	<i>Vanella</i> sp.
AB(III)02	0	Negativa	<i>Mayorella</i> sp.
ID(III)01	100	Cerebro y Pulmón	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
ID(III)02	100	Cerebro y Pulmón	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>

Con respecto a los aislados patógenas obtenidas, tenemos que tanto a la temperatura ambiental como la temperatura del agua pueden ser factores que determinan la creación de un sistema de competencia en donde se ven favorecidas las especies de AVL patógenas con respecto a otras especies amibianas que no lo son (Gallegos, 1997).

Por esta razón se puede considerar como riesgoso el uso de estos cuerpos de agua con fines recreativos, ya que al analizar los resultados se observó que un gran número de amibas con potencial patógeno habitan en los canales de riego analizados. Esta observación se hace tomando en cuenta que se aislaron especies representantes de cuatro de los cinco géneros de AVL reportadas como patógenas para el hombre; estos géneros son: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia* pudiendo causar infecciones como la encefalitis amibiana granulomatosa y la meningoencefalitis amibiana primaria para los dos primeros géneros respectivamente y queratitis para el primero, tercero y cuarto género mencionados.

Al analizar la tabla 16 para relacionar los canales de riego con la presencia de amibas de vida libre patógenas, se puede observar que los canales de riego de los cuales se aislaron organismos patógenos fueron, en el primer muestreo; Abasolo, Islas Agrarias B, Irapuato, Ladrillera 1, Coronita, Nayarit y Oaxaca; en tanto que en el segundo muestreo fueron: Independencia, Islas Agrarias B, Irapuato, Ladrillera 1, Alimentador Norte, Coronita, Xochimilco, Nayarit y Ladrillera 2; por último en el tercer muestreo los canales fueron: Independencia, Nayarit y Oaxaca.

Tabla 16. Especies patógenas presentes en los canales de riego en los tres muestreos realizados en el Valle de Mexicali.

Canal	Muestreo		
	I	II	III
IND	-	<i>Acanthamoeba sp.</i>	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
ABS	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	-	-
IAB	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Hartmannella sp.</i> <i>Naegleria fowleri</i>	-
IRA	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Acanthamoeba sp.</i>	-
LA1	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	<i>Naegleria fowleri</i>	-
ANI	-	<i>Naegleria fowleri</i>	-
RPM	-	-	-
COR	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Naegleria fowleri</i>	-
XCH	-	<i>Vahlkampfia sp.</i>	-
NAY	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Naegleria sp.</i>	<i>Naegleria sp.</i>
OAX	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	-	<i>Acanthamoeba sp.</i>
MOI	-	-	-
MOC	-	-	-
LA 2	-	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i>	-
SL1	-	-	-
SL2	-	-	-

En la misma tabla 16 se puede apreciar que solo hubo presencia constante de organismos amibianos patógenos durante los tres muestreos en el canal NAY (Nayarit) aislándose e identificándose amibas de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Sin embargo, en los canales IND, IAB, IRA, LA1, COR y OAX el aislamiento de especies patógenas se hizo en dos de los tres muestreos realizados. Esto habla de que en los canales de riego de Mexicali la presencia de especies patógenas constante y está representada principalmente por los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*.

Los resultados de los parámetros que se determinaron *in situ* durante los tres muestreos se tabularon en tablas y se muestran en los apartados correspondientes.

Análisis de los parámetros fisicoquímicos del agua “*in situ*”.

Temperatura del agua.

Con respecto a este factor, se debe mencionar que la temperatura del agua incide de manera directa en la presencia, abundancia y distribución de las AVL en los sistemas acuáticos naturales, con esto se quiere resaltar que cuerpos de agua con temperaturas elevadas pueden servir como un reservorio potencial para la perpetuación y la posible dispersión de AVL patógenas y termófilas. Algunos géneros como *Naegleria* y *Acanthamoeba* con especies patógenas para el hombre, pueden soportar temperaturas elevadas (más de 45 °C) e incluso desarrollarse más rápidamente por disminución de competencia con otros organismos no termotolerantes en aguas con temperaturas elevadas (Rivera, 1983).

En el Valle de Mexicali, el clima es extremo y la temperatura del ambiente llega a ser muy elevada pudiendo alcanzar más de 49 °C a la sombra. Con temperaturas ambientales extremas durante muchas horas al día, los cuerpos de agua tienden a subir su temperatura considerablemente. En el caso de los canales de riego artificiales (paredes de concreto) del Valle de Mexicali, la profundidad de la columna de agua es baja generalmente entre 0.5 y 1.5 m, la corriente lenta y la radiación solar es intensa, características que permiten que la temperatura del agua pueda elevarse de manera importante a lo largo del día. Lo que permitiría el buen desarrollo de amibas de vida libre termotolerantes.

En la tabla 17 se muestra el comportamiento de la temperatura del agua a lo largo de los tres muestreos. De las tres etapas la mayor temperatura se registró durante el tercer muestreo, correspondiente al mes de septiembre, donde se midieron valores de temperatura que estuvieron entre los 28 y los 31.8 °C. En este mes la diferencia entre la mayor y la menor temperatura del agua entre los canales muestreados no alcanzó los 4°C, lo que habla de una temperatura del agua alta, pero estable a lo largo de los diferentes sitios de muestreo. Las menores temperaturas correspondieron al segundo muestreo, variando de 16 hasta los 25°C.

Entre el primero y el segundo muestreo las diferencias de temperatura del agua no fueron muy diferentes, encontrándose una diferencia de 9°C entre las temperaturas máximas y mínimas.

Los valores de temperatura del agua máximos encontrados en los meses de agosto y febrero fueron de 28.1 y 25 °C ámbito que pudiera influir en la presencia de las amibas, objetos del estudio.

La mayoría de especies de AVL aisladas pertenecen a los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Cuando se registran valores de 30 °C, el género que prevalece es *Naegleria*. Por otra parte *Acanthamoeba* se aisló en aquellos cuerpos de agua que presentaban un amplio ámbito de temperatura del agua que iba de los 25- 35 °C.

Tabla 17. Valores de la temperatura del agua obtenidos durante los tres muestreos.

Canal	Clave	Temperatura del agua °C		
		Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III
INDEPENDENCIA	IND	20.1	17.4	30.6
ABASOLO	ABS	20.5	17.2	29.9
ISLAS AGRARIAS B	IAB	21.7	17.1	30.9
IRAPUATO	IRA	25.6	18.3	31.8
LADRILLERA 1	LA1	27.1	21.1	ND
LADRILLERA 2	LA2	21.0	18.6	ND
ALIMENTADOR NORTE	ANI	27.2	17.2	ND
REPRESA MORELOS	RPM	23.8	16.0	ND
CORONITA	COR	18.7	17.7	28.0
XOCHIMILCO	XCH	23.2	17.2	ND
NAYARIT	NAY	25.7	16.7	30.0
OAXACA	OAX	25.9	16.6	28.5
EJIDO MORELOS			17.0	ND
INDEPENDENCIA	MOI	28.1		
EJIDO MORELOS			25.0	ND
CHAPOTEADERO	MOC	24.8		
SILVA SUR 1	SL1	ND	19.6	ND
SILVA SUR 2	SL2	ND	19.6	ND

*ND: No determinada

Temperatura ambiente

Al igual que con la temperatura del agua, este factor es de importancia ya que la temperatura del ambiente incide directamente sobre las condiciones del agua, la transferencia de calor entre el ambiente y el agua determina finalmente el valor de esta última. De manera que cuando la radiación solar es intensa el agua tiende a elevar su temperatura y las AVL presentes en ese cuerpo de agua crean un sistema de competencia con capacidad para desplazar a otras amibas que no son termotolerantes. La temperatura de un cuerpo de agua con respecto a la del ambiente muestra una relación directamente proporcional (Gallegos, 1997).

En la tabla 18 se observan los registros de temperatura ambiental, los cuales van de los 21 hasta los 46°C, entre el primer muestreo correspondiente al mes de febrero el cual coincide con la época de invierno, y el tercer muestreo, fue septiembre uno de los meses más calurosos del año. La diferencia entre la temperatura máxima y mínima registradas fue de 25 °C, sin embargo, para las amibas patógenas este factor no se considera un factor limitante, ya que todas las amibas patógenas son termotolerantes (Martínez, 1985). Cabe mencionar que durante los muestreos realizados fue común encontrar a personas nadando en los diferentes canales de riego del Valle de Mexicali, esto debido a las elevadas temperaturas ambientales que se alcanzan durante el día.

Se han registrado numerosos reportes en donde se menciona que en las épocas más calurosas del año hay un aumento en los casos de meningitis, debido a AVL (Callicot *et*

al., 1968; John, 1993; Lares-Villa *et al.*, 1993; Ockert, 1993; Griesemer *et al.*, 1994), también se señala la relación directa que existe entre la posible presencia de AVL con potencial patógeno y la temperatura elevada del agua (Caín *et al.*, 1981; Kilvington *et al.*, 1991; Schoeman *et al.*, 1993).

Tabla 18. Valores de temperatura ambiental obtenidos durante los tres muestreos.

Canal	Temperatura ambiente °C		
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III
IND	30.3	21.0	43.0
ABS	32.1	21.0	46.0
IAB	35.4	22.0	45.0
IRA	37.2	23.0	44.0
LA1	39.7	35.5	ND
LA2	33.2	31.0	ND
ANI	35.3	29.0	ND
RPM	35.0	30.0	ND
COR	31.3	29.5	35.5
XCH	35.2	31.2	ND
NAY	31.2	29.0	39.0
OAX	34.2	27.5	41.0
MOI	33.2	31.5	ND
MOC	31.2	28.5	ND
SL1	ND	32.5	ND
SL2	ND	36.5	ND

*ND: No determinada

pH

Kyle y Pittman (1985) en experimentos *in vitro*, con amibas de vida libre reportan que el ámbito de pH tolerado por estos organismos fluctúa de 4.6 a 9.5. En el caso particular de las acantamebas patógenas, se menciona que este grupo puede desarrollarse en un ámbito amplio de pH, lo cual muestra la habilidad de estas AVL para colonizar varios nichos. En condiciones experimentales la capacidad de tolerancia de pH para las amebas del género *Acanthamoeba* esta entre 4-12 unidades de pH (Kinnear, 2003).

Tomando en cuenta que el intervalo de pH que soportan las amibas en ambientes naturales va de 5.5 a 8.6 (Gallegos, 1992), los resultados obtenidos indican que las AVL aisladas de los cuerpos de agua no estuvieron sometidas a valores de pH tan amplios, por lo que este parámetro no fue considerado como un factor limitante que influyera en la presencia o ausencia de estos organismos.

El intervalo de pH registrado en los tres muestreos realizados en Mexicali (Tabla 19) estuvo entre 6.5 y 8.9 la mayoría de los valores fueron alcalinos. Estos valores no salen de los límites de tolerancia reportados para las AVL en ambientes naturales y por lo tanto no fueron considerados como limitantes para la presencia de estos microorganismos en el agua.

Tabla 19. Valores de pH medidos en los canales de riego de Mexicali durante los tres muestreos.

Canal	Valor de pH		
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III
IND	7.3	8.2	8.4
ABS	7.7	8.6	8.3
IAB	8.3	8.6	8.0
IRA	8.1	7.7	8.2
LA1	7.6	8.2	ND
LA2	8.0	8.9	ND
ANI	7.3	8.2	ND
RPM	6.5	8.1	ND
COR	6.8	8.4	8.2
XCH	6.9	8.5	ND
NAY	7.2	8.6	8.4
OAX	6.8	8.6	8.5
MOI	7.2	8.4	ND
MOC	7.1	7.7	ND
SL1	ND	8.5	ND
SL2	ND	8.5	ND

*ND: No determinada

Oxígeno disuelto

Este parámetro es uno de los más importantes para el sostenimiento de las AVL's en el agua, ya que estos protozoos son estrictamente aerobios y requieren oxígeno para realizar sus procesos fisiológicos. En su ambiente natural, cuando las concentraciones de oxígeno disminuyen, las amibas pasan de una fase trófica a un estado de letargo en forma de quiste (John, 1993).

La medida de la concentración de oxígeno disuelto en el agua para esta investigación fue expresada en porcentaje de saturación de oxígeno en lugar de mg/L. Esta decisión se hizo para compensar la capacidad del oxígeno para disolverse en el agua dependiendo de la cantidad de oxígeno a diferentes niveles de altitud. Al expresar la concentración de OD en porcentaje de saturación podemos entender la disponibilidad de oxígeno en el agua independientemente de la altitud del área donde se esté llevando a cabo la medición. Varios estudios han demostrado que el porcentaje de saturación de OD en el agua puede indicar la fase en la cual pueden estar las amibas (John, 1993).

El porcentaje de saturación de OD en los diferentes canales de riego fue muy variable, encontrándose en un rango amplio en los tres muestreos. El valor de OD fluctuó de 52% valor obtenido en el canal coronita del primer muestreo hasta 185% en el canal ladrillera 2 del segundo muestreo, esto puede ser observado en la tabla 20. Estos valores significan grandes concentraciones de oxígeno disuelto en el agua de los canales de riego muestreados, y con ello se asegura que la disponibilidad de oxígeno para el sostenimiento de las amibas de vida libre en este tipo de aguas y para este factor, no representa un agente limitante para el desarrollo de las AVL's en estos cuerpos de agua.

La razón para medir elevadas concentraciones de oxígeno en el agua (en la mayoría de los sitios de muestreo el porcentaje superó el 100% de saturación) puede ser atribuido a la presencia de grandes cantidades de la planta acuática *Hydrilla verticillata*, la cual crece como plaga en los canales de riego, y que, debido a la intensa radiación solar en la zona estimula el proceso de la fotosíntesis suministrando grandes cantidades de oxígeno al agua circundante. Este proceso también explicaría el porque las altas concentraciones de el oxígeno ya que en algunos canales, la corriente es constante chocando con rocas o barreras que se encontraban en los canales, haciendo que el agua se oxigenara más por acción mecánica. Aunado a esto y debido a la radiación solar el proceso de fotosíntesis el cual comienza a las 9:00 de la mañana, comenzando así la producción de oxígeno y para la hora en la que se realizaba el muestreo los canales ya estaban muy saturados de oxígeno

Tabla 20. Valores de OD en % de saturación obtenidos durante los tres muestreos.

Canal	Oxígeno disuelto % de saturación		
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III
IND	100	115	120
ABS	95	124	140
IAB	105	135	150
IRA	60	105	135
LA1	63	120	ND
LA2	85	185	ND
ANI	70	104	ND
RPM	81	97	ND
COR	52	115	65
XCH	90	117	ND
NAY	120	150	80
OAX	147	155	135
MOI	115	125	ND
MOC	90	74	ND
SL1	ND	130	ND
SL2	ND	130	ND

*ND: No determinada.

Conductividad

Cuando se presentan valores de más de 30 000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (medida de la conductividad) en un cuerpo de agua se le considera como salina, lo cual puede afectar de forma negativa la presencia de algunos microorganismos que no estén adaptados a este tipo de condiciones de salinidad, cuando los cuerpos de agua presentan valores de conductividad por debajo de este ámbito se les considera como agua dulce. En los tres muestreos realizados al agua de los canales de riego en el Valle de Mexicali, los valores de conductividad indican que el agua del sistema de riego es dulce, ya que se encuentra muy por debajo de la conductividad que se puede medir para un cuerpo de agua salado (Tabla 21).

Tabla 21. Valores de conductividad obtenidos durante los tres muestreos.

Canal	Conductividad $\mu\text{S/cm}$		
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III
IND	1489	1290	1210
ABS	1356	1280	1250
IAB	1291	1300	1310
IRA	6043	5710	590
LA1	1163	1220	ND
LA2	1320	1320	ND
ANI	1074	1110	ND
RPM	1166	1220	ND
COR	1489	1230	1330
XCH	1294	1310	ND
NAY	1055	1170	1200
OAX	1091	1130	1340
MOI	1132	1230	ND
MOC	1124	920	ND
SL1	1489	1440	ND
SL2	1356	1280	ND

*ND: No determinada

La tabla 21 muestra los valores de conductividad expresados en $\mu\text{S/cm}$ medidos en los tres muestreos, en ella se observa muy poca variación en los valores obtenidos durante los tres muestreos, de manera general la conductividad estuvo en el ámbito de 1055- 1489 $\mu\text{S/cm}$, con excepción de dos valores bajos 590 y 920 $\mu\text{S/cm}$ y dos valores muy altos en el canal Irapuato con valores de conductividad de 6043 y 5710 $\mu\text{S/cm}$ para el primer y segundo muestreo respectivamente. Para estos dos valores, la interpretación del porqué se alcanzó una conductividad tan alta puede ser explicada porque en éste canal de riego al momento de los muestreos I y II el flujo de agua fue mínimo porque el agua se encontró estancada debido a la falta de mantenimiento de este canal de riego, lo cual puede provocar que la intensa radiación solar evapore gran parte del agua que ahí se encuentra, por lo que la concentración de solutos aumenta y con ello se obtienen valores de conductividad más altos. Este comportamiento se explica con hecho de que en el III muestreo cuando ya se había limpiado el canal y el flujo de agua se incrementó por lo tanto la medida de la conductividad bajó hasta 590 $\mu\text{S/cm}$ (el valor más bajo encontrado en los 3 muestreos). Sin embargo, a pesar de las notables diferencias en conductividad entre muestreos, en este canal Irapuato fue posible aislar amibas pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Thecamoeba*, en las tres ocasiones, lo que puede ser explicado por la resistencia que tienen los quistes y trofozoítos de las amibas a las variaciones de salinidad pudiendo tolerar cambios de salinidad y presión osmótica muy altos (Rodríguez, 1994).

Coliformes totales.

En los estudios sobre la dinámica de las poblaciones de las especies patógenas pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, algunos autores han mostrado que existe correlación entre el número de amibas de vida libre y la cantidad de bacterias presentes en el agua, especialmente con bacterias del grupo coliformes. Sin embargo, este comportamiento no es cierto en todos los casos (Singh, 1972).

Por este motivo fue conveniente establecer la densidad de los organismos bacterianos especialmente del grupo de los coliformes. En la tabla 22 se muestra el número de bacterias coliformes totales expresados en UFC (unidades formadoras de colonias)/100 mL aisladas de los canales de riego de Mexicali.

Tabla 22. Valores de coliformes totales obtenidos durante los tres muestreos.

Canal	Coliformes totales (UFC/100 mL)		
	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III
IND	500	400	1800
ABS	200	100	400
IAB	100	100	400
IRA	3500	2900	500
LA1	1700	1000	ND
LA2	1200	300	ND
ANI	200	200	ND
RPM	100	300	ND
COR	1000	1200	700
XCH	100	0	ND
NAY	300	100	400
OAX	200	100	700
MOI	100	300	ND
MOC	0	0	ND
SL1	0	0	ND
SL2	100	100	ND

*ND: No determinada

La Norma Oficial Mexicana NMX-AA-042 considera que para determinar la contaminación por patógenos, el límite máximo permisible en aguas de uso de riego agrícola es de 1000 y 2000 como número más probable (NMP) de coliformes fecales por cada 100 ml. En la tabla 11 se aprecia que la cantidad de bacterias supera ese límite en el canal Irapuato con 2500 y 3900 UFC/100 mL para el primer y segundo muestreo respectivamente. En los canales LA1, LA2 y COR del primer muestreo, LA1 y COR del segundo e IND del tercero el número de coliformes supero las 1000 UFC/100 mL. Por lo tanto existe una concentración de bacterias que permite sustentar a las poblaciones de AVL en los canales de riego muestreados. En el caso del canal Irapuato la cantidad tan elevada de bacterias es el resultado del estancamiento del agua por falta de mantenimiento en este canal lo cual pudo elevar considerablemente la concentración de coliformes en estos dos muestreos, para el tercer muestreo y después del mantenimiento y

recuperación del flujo normal del agua en el canal la cantidad de coliformes disminuyó drásticamente hasta alcanzar un valor de 500 UFC/100 mL. Las bacterias se encuentran en cantidades suficientes para servir como fuente de carbono (alimento) para diferentes poblaciones amebianas y no constituyen un factor limitante para la presencia de estos protozoos. Durante el trabajo de campo, se detectaron viviendas en la periferia de los canales (campos agrícolas) y el cambio de uso de suelo a fabricas maquiladoras; lo anterior hace posible que existan vertidos ilegales de aguas residuales lo que explica la presencia de coliformes totales.

Análisis estadístico.

Para establecer si existió una relación entre los parámetros ambientales y los organismos aislados se aplicó la prueba estadística paramétrica conocida como coeficiente de correlación lineal de Pearson (tabla 23). En este análisis se utilizaron dos conjuntos de datos para de encontrar una posible correlación entre los datos de los tres muestreos.

Para utilizar esta prueba y dado que los parámetros estaban expresados en diferentes unidades se transformaron los valores obtenidos en diferentes unidades (excepto el pH) a logaritmos con la siguiente formula: $(\log 10)$ cuando fue un resultado diferente a 0 y $(\log 10 + 1)$ cuando el valor obtenido fue 0; esta transformación se hizo para uniformizar las unidades y que los datos tuvieran una distribución normal.

De acuerdo a experimentos registrados en la literatura (Griffin, 1972; Lares-Villa, 1993; Rivera, 1993) se esperaba encontrar una correlación alta en el número de amibas aisladas y la temperatura del agua y del ambiente, es decir a mayor temperatura e incluso coliformes totales mayor número de organismos patógenos (Gallegos, 1997).

Al analizar la tabla 23 observamos que de los factores ambientales contrastados para buscar correlación con la presencia de amibas solo el pH, la conductividad y los coliformes totales tuvieron un grado de correlación positiva.

Con respecto a la temperatura del agua el análisis de correlación de Pearson mostró que si existe una relación entre la temperatura del agua y el incremento en el número de organismos amebianos aislados del agua como se observa en la tabla 23. La prueba no indica que un género específico de amibas haya tenido ventaja de la temperatura del agua, es decir, el análisis muestra que la temperatura influyó sobre el número de amibas totales aisladas pero no demuestra que un género específico de amibas haya sido influido para desarrollarse directamente de la temperatura del agua.

Con respecto al pH se obtuvieron dos valores positivos (correlación directa perfecta) correspondientes a los géneros *Hartmannella* sp. y *Naegleria* sp. esto quiere decir que a estos géneros no les afectó el pH del cuerpo de agua para determinar su presencia en el agua. Por otra parte, el valor negativo (correlación directa imperfecta) que se presento en el análisis para el género *Acanthamoeba* sp. significa que los valores de pH medidos en el agua si afectaron la presencia de los organismos de este género en los canales de riego.

En el caso de los coliformes totales los valores positivos de correlación más elevados entre la presencia de estos géneros y el parámetro medido los presentaron *Naegleria* sp. y *Vanella* sp. confirmando de esta manera que se requieren de concentraciones altas de materia orgánica (en este caso bacterias) para ser utilizada como nutrimento lo cual repercute en el mantenimiento de poblaciones abundantes (Rodríguez, 1994).

10. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados en el inicio de este trabajo de investigación, se pueden concluir los siguientes puntos.

En los canales de riego del Valle de Mexicali, cuyo uso fue previsto para la irrigación de los campos de cultivo en Mexicali, y que frecuentemente es utilizado por los pobladores del valle para surtirse de agua para su consumo así como para nadar y refrescarse del intenso calor de la zona se aislaron diversos protozoos de identificados como amibas de vida libre. Consolidando los datos de los aislados amebianos se encontró que en el agua de 11 de los 16 canales de riego muestreados fue posible aislar amibas de vida libre.

Los aislados fueron cultivados en medios específicos y por sus características de tolerancia a la temperatura, transformación ameboflagelar y morfometría de los quistes y trofozoítos se pudieron identificar 40 aislados pertenecientes a 9 géneros descritos en las claves taxonómicas de Page. Los aislados amebianos de vida libre recolectados estuvieron representados de la siguiente manera: 12 organismos de la especie *Acanthamoeba castellanii*, 3 de *Acanthamoeba culbertsoni*, 2 de *Acanthamoeba polyphaga*, 2 de *Acanthamoeba* sp; 3 de *Naegleria fowleri*, 4 de *Naegleria* sp. 5 de *Vahlkampfia* sp. 3 de *Rosculus ithacus*, 2 *Hartmannella* sp. y 1 aislado correspondiente a los géneros *Mayorella* sp, *Rhizamoeba* sp, *Thecamoeba* sp. y *Vanella* sp.

De los 5 géneros de amibas reportadas como patógenas para el ser humano en esta investigación se aislaron 4, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*. En el caso de *Acanthamoeba* se reportan tres especies, mientras que para *Naegleria* solamente una, *N. fowleri*. En el caso de los demás aislados su identificación solo se hizo hasta el nivel de género.

Los géneros amebianos positivos en pruebas de patogenicidad fueron: *Acanthamoeba* 14 (60.9%), *Naegleria* 6 (26.0%), *Vahlkampfia* 2 (8.8%) y *Hartmannella* 1 (4.3%), y estuvieron representados por las especies, *Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *Naegleria fowleri*, los demás géneros no fueron identificados a nivel de especie. En las pruebas de patogenicidad ensayadas en ratones de cuatro semanas de edad, los aislados causaron la muerte del 60 al 100 % de los ratones en los que fueron ensayados. El porcentaje de aislados amebianos patógenos distribuidos por el valle de Mexicali es muy alto considerando el número de sitios muestreados y la extensión del valle muestreada. Cuando los datos de los aislados amebianos con patogenicidad son visualizados en el mapa del Valle de Mexicali, se observa que la distribución de los organismos fue muy uniforme aunque se observa una diferencia puntual en el origen del agua que proviene del Río Colorado en su entrada en la frontera con México, esa diferencia es la falta de aislados amebianos patógenos en los canales Morelos, Represa Matamoros, Independencia y los canales Silva Sur 1 y 2 en la zona Este del Valle de Mexicali correspondiente con la entrega de agua de los Estados Unidos a México. Ello pudiera significar que el agua proveniente de los Estados Unidos a través del Río Colorado viene libre o con pocas formas amebianas con potencial patógeno y que a su

paso por México se va contaminando con estos protozoos al pasar por centros de población rurales y urbanos.

Los canales de riego en los cuales se encontraron los organismos amibianos patógenos descritos en este trabajo fueron: en el primer muestreo; Abasolo, Islas Agrarias B, Irapuato, Ladrillera 1, Coronita, Nayarit y Oaxaca; en tanto que en el segundo muestreo fueron: Independencia, Islas Agrarias B, Irapuato, Ladrillera 1, Alimentador Norte, Coronita, Xochimilco, Nayarit y Ladrillera 2; por último en el tercer muestreo fueron: Independencia, Nayarit y Oaxaca.

Finalmente se puede mencionar que el factor que más favoreció la presencia de amibas patógenas fue la concentración de coliformes totales en el agua especialmente cuando fue correlacionada con la presencia de *Naegleria* sp. Confirmando de esta manera que las amibas patógenas crecen mejor en lugares donde haya presencia de materia orgánica.

11. LITERATURA CITADA

- Aitken, D., Hay, J., Kinnear, F. B., Kirkness, C. M., Lee, W. R y Seal D. V. 1996. Amebic keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthalmology*. **103**: 485-495.
- Anderson, R.O. 1988. Comparative Protozoology Ecology, Physiology, Life History, Springer Verlag. New York. 1988 pp.
- Anzil, A., Rao, C., Wrzolek, M., Visvesvara, G., Sher, J. y Kozlowski, P. 1991. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **115**: 21-25.
- Bamforth, S. 1980. Terrestrial Protozoa. *J. Protozool.* **27**: 33-36.
- Berger, T., Mondino, J., Hoft, H., Donzis, B., Holly, N., Farley, K, y Levenson, E. 1990. Successful medical management of *Acanthamoeba* keratitis. *Amer. J. Ophthalmol.* **110**: 395-403.
- Betts, W. B. 1995. Protozoan Parasites and Water. The Royal Society of Chemistry, Thomas Graham House, Science Park, Cambridge. 260 pp.
- Bottone, E. 1993. Free-living amoebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Mt. Sinai J. Med.* **60**: 260-270.
- Burns, R.G. 1988. Experimental models in the study of soil microbiology. **En:** *Handbook of Laboratory Models Systems for Microbial Ecosystems*. Vol. II. Ed. por Wimpenny J.. CRC Press, EUA. 51-98
- Cain, A., Wiley, P., Brownell, B y Warhust, D. 1981. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet*. *i*:441.
- Calderón, A. 1994. Detección de *Naegleria fowleri* en canales de riego de la región de Mexicali, Baja California. Tesis de Licenciatura, FES-I, UNAM. 51 p.
- Campbell, 1986. *Microbial Ecology*. A.P. 320 pp.
- Callicot, J. H., Nelson, E. C., Jones, M; Dos Santos, J.G., Duma, R.J y Morrison, J.V; 1968. Meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoebae. *J. Amer. Med. Asoc.* **206**:579-582.
- Cerva, L., Serbus, C y Skocil, V. 1973. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitologica.* **20**:97-103.

Chatton, E., Lalung-Bonnaire, E., Amibe limax (*Vahlkampfia* n. gen.) dans l'intestin humain. Son importance pour l'interprétation des amibes de culture. 1912. *Bull. Soc. Pathol. Exotique*. **5**: 135

Clarholm, M. 1981. Protozoan Grazing of Bacteria in soil-impact and Importance. *Micro. Ecol.* **7**: 343-350.

Cook, C.D.K y R Lüond. 1982. A revision of the genus *Hydrilla* (Hydrocharitacea). *Aquatic Bot.* **13**:485-504.

Cultbertson, C., Smith, J. y Minner, J. 1958. *Acanthamoeba* observations on animal pathogenicity. *Science* **127**:1506.

Cultbertson, C. G. 1975. Soil ameba infection. *Am. J. Clin. Pathol.* **63**: 475-482.

Comision Nacional de Aguas Nacionales .Ley de Aguas Nacionales 1992. Ed. Ligusa. México. 70 pp.

Delattre, J., y Oger. 1981. *Naegleria fowleri* and heated aquatic environments: a possible mechanism. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **61**: 441-452.

De Jonckheere, J. 1977. Use of an medium for diferentiation between pathogenic and non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 751-757.

De Jonckheere, J. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur* 130 **B**:205-212.

De Jonckheere, J., Pernin, P., Scaglia, M. y Michel, R. 1984. A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* n. spp. *J. Protozool.* **31**(2): 324-331 pp.

De Jonckheere, J. 1987. Epidemiology From amphizoic amoebae. Human pathology. Ed. by Rondanelli, E.G. Chapter 5. *Puccin Nuova Libreria. Padova Italy*. 125-147 pp.

De Jonckheere, J. 1988. Species identification and virulence of *Acanthamoeba* strains from human nasal mucosa. *Parasitol. Res.* **74**: 314-316.

Dempe, S., Martinez, A.J., and Janitschke, K. Subacute and chronic meningoencephalitis in mice after experimental infection with a strain of *Naegleria fowleri* originally isolated from a patient. *Infection*, 10,5,1982.

Donzis, B., Mondino, J., Weissman, A., y Bruckner, A. 1989. Microbial analysis of contact lens care systems contaminated with *Acanthamoeba*. *Amer. J. Ophthalmol.* **108**:53-56.

Ferrante, A.1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunol* 13: 31-47.

Fowler, M., Carter, R. F. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. A preliminary report. *Br. Med. J.* (1965) ii : 7.

García, E. 1988. Modificaciones al sistema de Clasificación Climática de Köppen. *Larios, México*. 217 pp.

Garcia, L. S.1997. Classification of human parasites. *Clin. Infect. Dis.* **25**:21-23.

Gallegos, E. 1997. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuerpos de agua de uso recreativo en el estado de San Luís Potosí. Tesis Doctorado, FES-I, UNAM. 132pp.

Gallegos, E; 1992. Caracterización biológica de una amiba de vida libre patógena aislada de un paciente con meningoencefalitis amibiana primaria en el estado de Puebla México. Tesis Maestría. Fac. Ciencias. UNAM. 75pp.

González, M., Gould, E., Dickinson, G., Martínez, A.J., Visvesvara, G., Cleary, T. y Hensley, G.1986. Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organisms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **110**: 749-751.

Griesemer, D.A., Barton, L.C., Rese, C.M., Johnson, P.C., Gabrielsen, J.A., Talwar, D. y Visvesvara, G.S. 1994. Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. *Pediatric. Neurol.* **10**: 249-254.

Griffin, J.L. 1972. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science.* **178**:69.

Jadwiga W, Linder E. 2000, Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* 2001, 152:613-619.

John, D.T. Primary amoebic meningoencephalitis and the biology of *Naegleria fowleri*. *Ann, Rev. Microbiol.* (1982) **36**: 101-3.

John, D. y De Jonckheere. 1985. Isolation of *Naegleria australensis* from an Oklahoma lake. *J. Protozool.* 32:571-575.

John, D. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. *En: Parasitic Protozoa, Ed por Kreier J. P. y Baker J. R. Academic Press, Nueva York.* 140-246.

Jones, G. y C. Bradshaw. 1993. The measurement of the conductance of electrolytes. V. A redetermination of the conductance of standard potassium chloride solutions in absolute units. *J. Amer. Chem. Soc.* **55**:1780

Inoue T, Asari S, Tahara K, Hayashi K, Kiritoshi A, Shimonura Y. 1998. *Acanthamoeba* keratitis with symbiosis of *Hartmannella* ameba. *Amer. J. Ophthalmol.* **125**: 721-723.

Khan, N. A. 2003. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbial Pathogenesis.* **34**: 277-285.

Kasprzak, W., Mazur, T y Cerva, L. 1982. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. *Folia Parasitol. Prague.* **29**:211-218.

Katz, J.D. *et al.* 2000. A case of *Balamuthia mandrillaris* meningoencephalitis. *Arch. Neurol.* **57**: 1210-1212.

Kilvington, S. 1991. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from detected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 310-314.

Kilvington, S. 1995. Identification and epidemiological typing de *Naegleria fowleri* with DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2071-2078.

Kinnear, F. B. 2003. Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* and *Hartmannella*: Quantitative and Qualitative *in vitro* studies on Keratocytes. *Journal of infection.* **46**:228-237.

Kyle D. E and Gayle P. N. 1985. Vertical Distribution of Potentially Pathogenic Free-living Amoebae in Freshwater Lakes. *J. Protozool.* **32**:(1), 99-105.

Kyle, D. E y Pittman, N. 1985. Vertical distribution of thermotolerant free-living amoebae in fresh water lakes. *J. Protozool.* **32**: 99-105.

Lares-Villa, F., De Jonckheere, J.F., Moura, H., Rechi, I. A., Ferreira, G.E., Fernández, Q. G., Ruiz, M. C y Visvesvara, G.S. 1993. Five Cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali. México; Study of the isolates. *J. Clin. Microbiol.* **31**:685-688.

Levandowski, M. y S. H. Hutner, 1979. Capitulo 1 Introduction. En: Biochemistry and Physiology of Protozoa, editado por Levandowski M. and S.H. Hutner, 2da ed. Vol. 1, A.P New York, 1-7 pp.

López-Corella, E., De Leon, B. B y De Jonckheere, J. F. 1989. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo, Michoacán México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Méx.* **46**: 619-622.

Lee, J. J., Hunter, S. H. Y Bovee, E. C. 1985. An Illustrated Guide to the Protozoa. *Soc. Prot.* Allen Press, Inc., Kansas. 622 pp.

Lot H., A., A. Novelo R. y P. Ramírez-García. 1986. Listados florísticos de México V. Angiospermas acuáticas mexicanas 1. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 60 pp.

Lowichik, A. *et al.* 1995. *Leptomyxid* amebic meningoencephalitis mimicking brain stem glioma. *Amer.J.Neur.Radiol.* 16, 926-929.

Martinez, A., Dos Santos, J., Nelson, E., Stamm, W. y Willaert E. 1977. Primary amoebic meningoencefalitis. In: Sheldon, S.S y Rosen, P.P *Pathology Annual Parte 2. Vol. 12. Appleton- Century Crofts Nueva York*, 225-248.

Martinez, A.1980. Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection ? *Neurology.* **30**: 567-574.

Martinez, A. J. Free living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease. Boca Raton FL. *CRC Press* (1985).

Martinez, A. y Janitschke, J. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; a review. *Infection* **13**: 251-256.

Martínez, J. A. *et al.* 2001. *Balamuthia mandrillaris*; Its pathogenic potential. *J.Euk.Microbiol.* 6S-9S.

Novistky J. A, and P.E. Keplay. 1981. Patterns of Microbial Heterotrophy Trough Changin Enviroment in a Marine Sediments. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **4**:1-7.

Ockert, G.1993. Review article: Ocurrence, parasitism and pathogenic potency of free-living amoeba. *Appl. Parasitol.* **34**:77-88.

Page, F. 1966. Taxonomical Criteria for Small Amoebae, whit a redefinition of the genera *Hartmanella* and *Acanthamoeba* and Descriptions of Three New Species. Tesis Doctoral, University of Wisconsin. 150pp.

Page, F. C. 1988. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 122 pp.

Pelczar, J., Reid, D. y Chan, S. 1982. Microbiología. *Mc Graw Hill, Nueva York.* 826 pp.

Reilly, M., Marciano- Cabral, F., Bradley, M. y Bradley, S. 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. y Medina, F. 1983. A survey of pathogenicand free living amoebae inhabiting swimming-pool waters in México City. *J. Environ. Res.* **32**:205-211.

Rivera, F., García, G; Lugo, A; Zierold, E; Islas, J; Ramirez, E y Bonilla, P. 1986. Amoebae in a waste stabilization pond system in México. *Water, Air and Soil Pollution Journal*. **28**:185-198.

Rivera, F., Sánchez, M., Lugo, A., Ramírez, P., Ortiz, R. y Calderón, A. 1987. Ciliates in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution Journal*. **34**: 245- 262.

Rivera A, F., Lares V, F., Gallegos N. E., Ramírez F, E., Bonilla L, P., Calderón V, A., Martínez J., Rodríguez Z, S. y Alcocer D, J. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *J. Environ. Res.* **50**: 289-295.

Rivera, F., Bonilla, P., Ramirez, E., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Saldivar, B., Ramirez, P y Durán A. 1993. Pathogenic and free-living amoebae from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *J Environ. Res.* **62**:43-52.

Reed, R. *et al.* 1997. Notable cases: fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. *Med.J.Aust.* **167**: 82-84.

Rodriguez-Perez, E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. *Infectologia*. **4**: 263-266.

Rodríguez, Z. S. 1994. Ecology of Free-Living Amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**(3): 225-241.

Rodríguez, R., Mendez, O., Molina, O., Luzardo, G., Martínez, A. J., Visvesvara, G. S., Cardozo, J. 1998. Infección del sistema nervioso central por amibas de vida libre: comunicación de tres nuevos casos venezolanos. *Rev. Neurol.* **26** (154); 1005-1008.

Schoeman, C. S., Vander Vyver, A. F y Visvesvara, G. S. 1993. Primary amoebic meningo-encephalitis in southern Africa. *J. Infect.* **26**: 211-214.

Sing, B. N. y Das, S. R. 1972. Ocurrance of pathogenic *Naegleria aerobia*, *Acanthamoeba culbertsoni* and *H. rhyzodes* in sewage sludge samples of Lucknow. *Curr. Sci.* **41**: 277-281.

Singh, B. N., Selectivity in bacterial food by soil amoebae in pure mixed culture and in sterilized soil. *Ann. Appl. Biol.*, 28, 52, 1941.

Sing, B. N., Srivastava, R, Dutta, G.P. 1971. Virulence of strains of *Entamoeba histolytica* to rats and the effect of cholesterol, rat cecal and hamster liver passage on the virulence of non-invasive strains. *Indian. Journal. Exp. Biol.*. **9**:21-7.

Singleton, F. L, 1984. Aquatic Microbiology. En: General Microbiology. editado por Boyd F. R, Mosby Collage Publishing. St. Louis. 400- 419 pp.

Schuster, F. L. 2002. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clinical Microbiology Reviews.* **15** (3); 342-354.

Tamayo, J. G., Gonzalez, J. E. y Martinez, A. J. 1980. Meningoencefalitis amibiana primaria y encefalitis granulomatosa amibiana. *Acta Medica Venezuelana*. **27**: 84-91.

Valenzuela, G., Lopez-Corella, E. y De Jonkheere, J. F. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from north western Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**: 558-559.

Visvesvara, G., Schuster, F. y Martinez, J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N sp., Agent of amoebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 504- 514.

Wong, M., Karr, S. y Chow, C. 1977. Changes in the virulence of *Naegleria fowleri* maintained *in vitro*. *J. Parasitol.* **63**: 872- 878.

Wiley, C., Safrin, R., Davis, C., Lampert, P., Braude, A., Martinez, A. y Visvesvara, G. 1987. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a patient with AIDS. *J. Inf. Dis.* **155**: 130-133.

Wellings, F., 1977. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 661-667.

Wellings, F., Amuso, S. y Lewis., Farmelo, M., Moody, D. y Osikowicz, C. 1979. Pathogenic *Naegleria*, Distribution in Nature. Publication de la Environmental Protection Agency, Cincinnati, EPA/600/I-79-018.

Anexo 1

Tabla 1. Medidas correspondientes a los trofozoítos y quistes del primer muestreo.

Canal	Organismo aislado	Trofozoíto		Quiste Diámetro μm
		Ancho μm	Largo μm	
IND	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	X=20.7; DS=6.37 mo=23.5	X=16.0; DS=2.9 mo=18.8	X=12.9; DS=1.7 mo=11.75
ABS	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=21.7; DS=6.2 mo=23	X=16.2; DS=2.4 Mo=11.75	X=14.1; DS=1.9 mo=11.75
IAB	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=18.7; DS=3.3 mo=16.5	X=12.3; DS=1.57 mo=11.7	X=12.5; DS=1.8 mo=11.5
IRA	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=22.9; DS=2.7 mo=18.8	X=19.4; DS=4.0 mo=18.8	X=12.9; DS=1.8 mo=11.75
	<i>Vahlkampfia</i>	X=30.9; DS=3.0 mo=30.55	X=10.3; DS=2.8 mo=9.4	X=12.4; DS=1.4 mo=11.75
LA1	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	X=19.7; DS=6.5 mo=23.5	X=16.0; DS=3.9 mo=17.5	X=12.6; DS=1.7 mo=11.7
ANI	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=17.8; DS=3.3 mo=16.5	X=14.3; DS=1.7 mo=11.7	X=16.5; DS=1.6 mo=11.5
RPM	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=16.8; DS=3.5 mo=16.5	X=13.2; DS=1.4 mo=10.7	X=12.4; DS=1.5 mo=11.5
COR	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=18.7; DS=4.3 mo=16.5	X=12.3; DS=1.57 mo=11.7	X=13.6; DS=1.8 mo=11.5
XCH	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=16.7; DS=3.6 mo=16.5	X=12.7; DS=1.4 mo=10.4	X=13.8; DS=1.9 mo=11.5
	<i>Rhizamoeba</i>	X=14.6; DS=3.4 mo=14.5	X=16.7; DS=3.6 mo=14.3	X=12.7; DS=1.4 mo=12.5
NAY	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=15.4; DS=4.3 mo=15.4	X=13.8; DS=3.5 mo=15.7	X=12.5; DS=2.0 mo=11.5
OAX	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=15.8; DS=3.7 mo=15.9	X=17.0; DS=1.3 mo=12.7	X=12.4; DS=1.5 mo=11.5
MOI	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=13.4; DS=4.6 mo=17.8	X=12.7; DS=1.4 mo=11.6	X=13.8; DS=1.9 mo=11.5
MOC	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=16.7; DS=3.7 mo=15.5	X=11.8; DS=1.6 mo=10.4	X=12.7; DS=1.8 mo=11.5

*X: Media.

DS: Desviación Estándar.

Mo: Moda.

Tabla 2. Medidas correspondientes a los trofozoítos y quistes del segundo muestreo.

Canal	Organismo aislado	Trofozoíto		Quiste Diámetro μm
		Ancho μm	Largo μm	
IND	<i>Rosculus ithacus</i>	X=12.2; DS=1.6 mo=7.0	X=7.3; DS=1.5 mo=7.0	X=7.1; DS=1.0 mo=7.0
ABS	<i>Rosculus ithacus</i>	X=12.3; DS=1.4 mo=23	X=14.2; DS=1.3 Mo=6.9	X=8.1; DS=1.5 mo=6.8
IAB	<i>Hartmannella</i>	X=18.7; DS=3.3 mo=16.5	X=12.3; DS=1.57 mo=11.7	X=12.5; DS=1.8 mo=11.5
IRA	<i>Acanthamoeba</i>	X=22.9; DS=2.7 mo=18.8	X=19.4; DS=4.0 mo=18.8	X=12.9; DS=1.8 mo=11.75
LA1	<i>Naegleria fowleri</i>	X=24.0; DS=2.17 mo=25.88; n=50	X=10.20; DS=1.12 mo=11.75; n=50	X=9.60; DS=1.47 mo=11.75; n=50
ANI	<i>Naegleria fowleri</i>	X=23.70; DS=3.57 mo=23.5; n=40	X=8.93; DS=1.88 mo=7.05; n=50	X=15.65; DS=2.84 mo=16.45; n=50
RPM	<i>Naegleria</i>	X=16.8; DS=3.5 mo=16.5	X=13.2; DS=1.4 mo=10.7	X=12.4; DS=1.5 mo=11.5
COR	<i>Naegleria fowleri</i>	X=18.7; DS=4.3 mo=16.5	X=12.3; DS=1.57 mo=11.7	X=13.6; DS=1.8 mo=11.5

XCH	<i>Vahlkampfia</i>	X=16.7; DS=3.6 mo=16.5	X=12.7; DS=1.4 mo=10.4	X=13.8; DS=1.9 mo=11.5
NAY	<i>Naegleria</i>	X=15.4; DS=4.3 mo=15.4	X=13.8; DS=3.5 mo=15.7	X=12.5; DS=2.0 mo=11.5
OAX	<i>Naegleria</i>	X=15.8; DS=3.7 mo=15.9	X=17.0; DS=1.3 mo=12.7	X=12.4; DS=1.5 mo=11.5
MOI	<i>Rosculus ithacus</i>	X=13.4; DS=4.6 mo=17.8	X=12.7; DS=1.4 mo=11.6	X=13.8; DS=1.9 mo=11.5
MOC	<i>Vahlkampfia</i>	X=16.7; DS=3.7 mo=15.5	X=11.8; DS=1.6 mo=10.4	X=12.7; DS=1.8 mo=11.5
LA2	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	X=18.71; DS=3.30 mo=16.45; n=50	X=12.83; DS=1.57 mo=11.75; n=50	X=12.55; DS=1.38 mo=11.75; n=50
SL2	<i>Vahlkampfia</i>	X=23.35 DS=6.45 mo=25.85	X=7.94 DS= 2.6 mo=7.05	X=12.32 DS=1.96 m=11.85

*X: Media.

DS: Desviación Estándar.

Mo: Moda.

Tabla 3. Medidas correspondientes a los trofozoítos y quistes del tercer muestreo.

Canal	Organismo aislado	Trofozoíto		Quiste
		Ancho	Largo	
IND	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	X=22.9; DS=2.4 mo=18.8	X=19.2; DS=4.6 mo=18.8	X=12.3; DS=1.1 mo=11.5
	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	X=17.7; DS=5.4 mo=14.1	X=12.70; DS=2.79 mo=11.7	X=12.12; DS=2.05 mo=11.75; n=50
ABS	<i>Vanella</i>	X=27.54; DS=4.46 mo=25.5	X=10.85; DS=2.30 mo=11.7	X=11.46; DS=1.74 mo=11.5
	<i>Mayorella</i>	X=19.5; DS=1.8 mo=18.8	X=20.4; DS=4.7 mo=23.5	X=21.7; DS=3.2 m=23.5
IAB	<i>Vahlkampfia</i>	X=30.69; DS=3.30 mo=30.55;	X=10.33; DS=2.68 mo=9.4	X=12.40; DS=1.49 mo=11.75
IRA	<i>Thecamoeba</i>	X=13.58; DS=1.08 mo=14.1; n=50	X=10.2; DS=1.46 mo=11.75; n=50	X=16.2; DS=2.0 mo=16.4
COR	<i>Hartmanella.</i>	X=21.10; DS=4.27 mo=25.85; n=50	X=9.10; DS=2.36 mo=9.4; n=50	X=13.6; DS=1.8 mo=11.5
NAY	<i>Naegleria</i>	X=15.4; DS=4.3 mo=15.4	X=13.8; DS=3.5 mo=15.7	X=12.5; DS=2.0 mo=11.5
OAX	<i>Acanthamoeba</i>	X=15.8; DS=3.7 mo=15.9	X=17.0; DS=1.3 mo=12.7	X=12.4; DS=1.5 mo=11.5

*X: Media.

DS: Desviación Estándar.

Mo: Moda.

Anexo 2

Técnicas de Preparación de Medios de Cultivo.

Medio agar no nutritivo con *Escherichia coli*: (NNE).

La composición y preparación del medio se da de acuerdo con De Jonckheere (1984)

NaCl	0.120 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.004 g
CaCl ₂ H ₂ O.....	0.004 g
Na ₂ HPO ₄	0.192 g
KH ₂ PO ₄	0.132 g
Bactoagar.....	15.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Se mezclan en seco todos los ingredientes y se disuelven todos los componentes en 500 ml de agua destilada, aforando la mezcla a 1000 ml e hirviéndola hasta disolver totalmente el agar. Enseguida, se esteriliza en una autoclave a 121°C por 20 minutos. El medio se distribuye en cajas Petri estériles (capa delgada), aguardando una hora hasta gelificar. Se adicionan 5 gotas de una suspensión concentrada de agua destilada con *Enterobacter aerogenes* (en sustitución de *E. coli*) muerta a las placas de agar; luego, se extendió la bacteria por toda la caja y se esperó 20 minutos y se almacenó en un cuarto frío a 4°C hasta el tiempo de usarla.

La bacteria se obtiene cosechándola a partir de cultivos puros en solución con agua destilada e inactivándola en baño de agua a 70 °C por 30 minutos.

Medio PBSGM (medio de Chang).

Medio líquido PBSGM (Fosfato, Biotriptasa, Suero, Glucosa Medio, por sus siglas en inglés). Este medio se utiliza para aislar, axenizar y mantener los aislados de AVL que hayan crecido en el medio NNE (De Jonckheere, 1984).

Medio PBSGM

Bitriptasa.....	16.6 g
Dextrosa.....	2.7 g
Na ₂ HPO ₄	1.5 g
KH ₂ pO ₄	0.9 g
Agua destilada.....	1000 ml

Esta solución se envasa en tubos con tapón de rosca, vaciando en cada tubo 2.7 ml de medio. Se esterilizan los tubos con el medio a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Después de esterilizado el medio ya frío, se agrega a cada tubo 0.3 ml de suero fetal de ternera adicionado con penicilina y kanamicina a una concentración de 200 mg/ ml de cada antibiótico. Los tubos se conservan en refrigeración.

Medio de Nelson para *Naegleria*.

Solución de Page.

MgsO ₄ .7H ₂ O	0.4 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.4 mg
Na ₂ HPO ₄	14.2 mg
KH ₂ PO ₄	13.6 mg
NaCl	12.0 mg
Agua destilada	100.0 ml

A la solución anterior agregar:

Infusión de hígado (Oxoid o Panmede).....	0.17 g
Glucosa.....	0.17 g

Vaciar 4.5 ml en tubos con tapón de rosca de 16 x 125 mm. Esterilizar en autoclave por 25 min a 121 ° C. Enfriar y asepticamente agregar 0.5 ml de suero fetal por tubo (concentración final de 10 % de suero) antes de utilizar.

Medio modificado PYNF

Solución 1

Peptona Difco	10.0 g
Extracto de levadura Difco.....	10.0 g
Acido nucleico de levadura	
Sigma (almacenar a -20 °C	1.0 g
D-Glucosa.....	1.0 g
Acido fólico.....	15.0 mg
Solución de hemina	0.5 ml
KH ₂ PO ₄	0.362 g
Na ₂ HPO ₄	0.5 g
Agua destilada	900.0 ml

Si es necesario ajustar a PH de 6.9 y esterilizar a 121 °C por 15 minutos y almacenar a 4 °C.

Solución de Hemina

Hemina.....	.200 mg
-------------	---------

Trietanolamina.....100 ml

Almacenar a 4 °C

Medio Completo

Solución 1 900 ml

Suero fetal de bovino..... 100 ml

Penicilina (100 000 U/ml)..... 1 ml

Estreptomina (100 000 U/ ml)..... 1 ml

Almacenar a 4 °C.

Tinciones

Tinción Tricrómica (modificada por Cerva, L.com.pers.)

Hematoxilina de Gómori.

Cromótopo 2R..... 0.6 g

Verde rápido FCF..... 0.3 g

Ácido fosfotungstácico 0.6 g

Ácido acético..... 1.0 ml

Agua destilada 100 ml

Hematoxilina de Koolovsek

Hematoxilina 0.2 g

Sulfato de aluminio y potasio..... 5.0 g

Quelaton III (no esencial)..... 0.1 g

Peryodato de sodio 20 mg

Agua destilada 100 ml

Alcohol sublimado

HgCl₂..... 40 g

NaCl 50 g

Alcohol 50 %..... 1000 ml

Carbonato de litio al 1 %

Alcohol

Alcohol etílico.....99.0 ml

Ácido acético..... 1.0 ml

Procedimiento:

1. Se lava una caja con amebas en buen crecimiento con 5 ml de agua destilada.
2. Se hace el arrastre de este lavado de amebas con un asa acodada.
3. Se marcan los portaobjetos con un círculo de cera donde se va a poner el concentrado de amebas.
4. Con un bulbo unido a una pipeta Pasteur de punta alargada se toma el lavado de las cajas y se vacía en un tubo de ensaye con tapón de rosca. Centrifugar a 1000 g durante 10 min.
5. Se desecha el sobrenadante y se toman 3 gotas de la pastilla que se ha sedimentado en el tubo para colocarlas en el portaobjetos ya marcado con la cera.
6. Se ponen los portaobjetos en cámaras húmedas (cajas Petri con agua destilada).
7. Estas cámaras se incuban a la temperatura óptima a la que crece la ameba, durante 30 minutos con el objeto de que las amebas se adhieran al cristal. Ver al microscopio inmediatamente al sacarlas de la incubadora.
8. Se sumerge lo más pronto posible en el alcohol sublimado, debido a que las amebas se pueden separar del vidrio. Se mantiene la muestra sumergida por 2 horas (en este paso se lleva a cabo la coagulación de las proteínas).
9. Se hace el cambio de las muestras en alcohol al 80 %, y se deja sumergido durante toda la noche.

NOTA: Las preparaciones no se deben dejar secar.

Al día siguiente se hace un cambio con agua destilada para enjuagar.

Proceso de Tinción

1. La muestra se sumerge en hematoxilina por no más de 30 segundos.
2. Se enjuaga con agua alcalina (Unas gotas de NaOH 0.1 N en agua destilada con el objeto de que la hematoxilina vire de rojo a azul).
3. Se enjuaga con agua de la llave abundantemente.
4. Se le pone la solución de Gómori (Mezcla Tricrómica) durante 10 minutos.
5. Se enjuaga rápidamente en la mezcla de solución ácido-acético-alcohol para quitar el exceso de solución de Gómori.
6. Se sumerge la muestra en etanol al 96 % 10 veces.
7. En otro recipiente con alcohol se vuelve a sumergir la muestra 10 veces (sacando y metiendo). Esto se hace con el objeto de deshidratar la preparación.
8. Finalmente se sumerge en xilol durante 5 minutos.

Anexo 3

Tabla 23. Resultados del análisis de correlación de Pearson de los tres muestreos.

		Correlations																		
		TempAmb	TempAgua	pH	OxigL	Condl	ColifL	MOEBA	CANTH	HARTMA	MAYORELL	NAEGLER	PLATYAMC	RIZAMOEB	ROSCULU	THECAMO	VALHKAMP	VANNELLA	WILLAERTI	Totales
TempAmb	Pearson Corr	1	.737*	.131	-.185	-.126	.050	.264	.207	.065	.246	-.001	.070	.032	-.263	.171	.143	.086	.101	.300*
	Sig. (2-tailed)	.	.000	.351	.190	.445	.724	.056	.138	.645	.075	.997	.619	.820	.057	.221	.308	.540	.472	.029
	N	53	53	53	52	39	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
TempAgua	Pearson Corr	.737*	1	.056	-.242	-.021	.044	.102	.215	.111	.216	-.162	.089	-.004	-.094	.216	.138	.222	.160	.334*
	Sig. (2-tailed)	.000	.	.690	.084	.899	.753	.467	.122	.431	.120	.248	.525	.979	.502	.120	.325	.110	.251	.014
	N	53	53	53	52	39	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
pH	Pearson Corr	.131	.056	1	.308*	-.167	.519*	.198	-.397*	.275*	.086	.294*	.035	-.270	.198	.211	.160	.199	.230	.311*
	Sig. (2-tailed)	.351	.690	.	.026	.310	.000	.154	.003	.046	.538	.033	.801	.050	.156	.130	.253	.153	.097	.024
	N	53	53	53	52	39	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
OxigL	Pearson Corr	-.185	-.242	.308*	1	-.136	.268	.073	-.195	-.045	-.012	.143	-.235	-.066	-.001	.067	.050	.114	.055	-.030
	Sig. (2-tailed)	.190	.084	.026	.	.414	.055	.607	.165	.750	.932	.311	.093	.643	.992	.635	.722	.423	.699	.836
	N	52	52	52	52	38	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52	52
Condl	Pearson Corr	-.126	-.021	-.167	-.136	1	.195	-.067	.144	-.097	-.130	-.145	.525*	.	.138	.370*	-.120	-.113	-.055	.042
	Sig. (2-tailed)	.445	.899	.310	.414	.	.233	.684	.382	.556	.429	.377	.001	.	.401	.020	.466	.494	.739	.797
	N	39	39	39	38	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39
ColifL	Pearson Corr	.050	.044	.519*	.268	.195	1	.139	-.128	.255	.197	.374*	.152	-.157	.215	-.031	.073	.268*	.228	.408*
	Sig. (2-tailed)	.724	.753	.000	.055	.233	.	.307	.345	.058	.146	.005	.265	.247	.111	.819	.591	.046	.091	.002
	N	53	53	53	52	39	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	56	53
AMOEBA	Pearson Corr	.264	-.102	.198	.073	-.067	.139	1	.153	.392*	-.028	.250*	-.016	-.016	-.044	-.023	.311*	-.033	-.028	.535*
	Sig. (2-tailed)	.056	.467	.154	.607	.684	.307	.	.229	.001	.827	.047	.901	.901	.729	.859	.012	.799	.827	.000
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
ACANTH	Pearson Corr	.207	.215	-.397*	-.195	-.144	-.128	.153	1	-.028	-.019	-.220	-.153	.153	-.063	-.132	-.122	.061	-.019	.273*
	Sig. (2-tailed)	.138	.122	.003	.165	.382	.345	.229	.	.828	.881	.081	.229	.229	.623	.298	.335	.629	.881	.048
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
HARTMA	Pearson Corr	.065	.111	.275*	-.045	-.097	.255	.392*	-.028	1	.182	-.029	-.041	-.041	-.113	-.058	.024	.138	.182	.357*
	Sig. (2-tailed)	.645	.431	.046	.750	.556	.058	.001	.828	.	.149	.819	.751	.751	.375	.650	.850	.275	.149	.009
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
MAYORELL	Pearson Corr	.246	.216	.086	-.012	-.130	.197	-.028	-.019	.182	1	-.112	-.028	-.028	-.078	-.040	-.090	.248*	.301*	.245
	Sig. (2-tailed)	.075	.120	.538	.932	.429	.146	.827	.881	.149	.	.378	.827	.827	.542	.755	.481	.048	.016	.077
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
NAEGLER	Pearson Corr	-.001	-.162	.294*	.143	-.145	.374*	.250*	-.220	-.029	-.112	1	-.064	-.064	-.052	-.091	.131	.030	.072	.226
	Sig. (2-tailed)	.997	.248	.033	.311	.377	.005	.047	.081	.819	.378	.	.618	.618	.680	.476	.302	.813	.573	.104
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
PLATYAMC	Pearson Corr	.070	.089	.035	-.235	.525*	.152	-.016	.153	-.041	-.028	-.064	1	-.016	.360*	-.023	-.051	-.033	-.028	.238
	Sig. (2-tailed)	.619	.525	.801	.093	.001	.265	.901	.229	.751	.827	.618	.	.901	.004	.859	.689	.799	.827	.087
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
RIZAMOEB	Pearson Corr	.032	-.004	-.270	-.066	.	-.157	-.016	.153	-.041	-.028	-.064	-.016	1	-.044	-.023	-.051	-.033	-.028	.089
	Sig. (2-tailed)	.820	.979	.050	.643	.	.247	.901	.229	.751	.827	.618	.901	.	.729	.859	.689	.799	.827	.525
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
ROSCULU	Pearson Corr	-.263	-.094	.198	-.001	.138	.215	-.044	-.063	-.113	-.078	-.052	.360*	-.044	1	-.063	-.142	.323*	.159	.251
	Sig. (2-tailed)	.057	.502	.156	.992	.401	.111	.729	.623	.375	.542	.680	.004	.729	.	.621	.264	.009	.209	.070
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
THECAMO	Pearson Corr	.171	.216	.067	.370*	-.031	-.023	-.132	-.058	-.040	-.091	-.023	-.023	-.063	1	-.073	-.046	-.040	-.085	
	Sig. (2-tailed)	.221	.120	.130	.635	.020	.819	.859	.298	.650	.755	.476	.859	.859	.621	.	.568	.716	.755	.547
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
VALHKAMP	Pearson Corr	.143	.138	.160	.050	-.120	.073	.311*	-.122	.024	-.090	.131	-.051	-.051	-.142	-.073	1	-.104	.123	.237
	Sig. (2-tailed)	.308	.325	.253	.722	.466	.591	.012	.335	.850	.481	.302	.689	.689	.264	.568	.	.411	.333	.087
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
VANNELLA	Pearson Corr	.086	.222	.199	.114	-.113	.268*	-.033	.061	.138	.248*	-.030	-.033	-.033	.323*	-.046	-.104	1	.248*	.490*
	Sig. (2-tailed)	.540	.110	.153	.423	.494	.046	.799	.629	.275	.048	.813	.799	.799	.009	.716	.411	.	.048	.000
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
WILLAERTI	Pearson Corr	-.101	.160	.230	.055	-.055	.228	-.028	-.019	.182	.301*	.072	-.028	-.028	-.159	-.040	.123	.248*	1	.507*
	Sig. (2-tailed)	.472	.251	.097	.699	.739	.091	.827	.881	.149	.016	.573	.827	.827	.209	.755	.333	.048	.	.000
	N	53	53	53	52	39	56	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	53
Totales	Pearson Corr	.300*	.334*	.311*	-.030	.042	.408*	.535*	.273*	.357*	.245	.226	.238	.089	.251	-.085	.237	.490*	.507*	1
	Sig. (2-tailed)	.029	.014	.024	.836	.797	.002	.000	.048	.009	.077	.104	.087	.525	.070	.547	.087	.000	.000	.
	N	53	53	53	52	39	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

* Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

aCannot be computed because at least one of the variables is constant.

GLOSARIO

Queratitis: *Keratos gr*, (cuerno); *itis*, (inflamación). Inflamación de la córnea con o sin ulceración y puede acompañarse con perforación de la córnea.

Edema: Es la inflamación de una parte del cuerpo debido a la acumulación de líquido en los tejidos. Estos son más frecuentes en las extremidades inferiores, aunque puede afectar al cuerpo entero.

Encefalitis: *Enkephalon gr*, (cerebro); *itis*, (inflamación). Inflamación del cerebro.

Granuloma: *Granulum gr*, (grano pequeño); *oma* (tumor). Tumor pequeño de forma redondeada, cualquiera que sea su naturaleza.

Cefalea: *Kephale gr*, (cabeza). Dolor de cabeza sordo, continuo e intermitente, que se exagera o no bajo la influencia de causas exteriores: ruido, luz viva, sacudidas; de causas internas: emociones, esfuerzos de los movimientos de la cabeza, o del trabajo intelectual.

Instilación: *in lat*, (en); *stilla* (gota). Acción de hacer caer un líquido gota a gota.

Virulencia: *virus-* veneno *lat*. Grado del estado infeccioso que ocasiona el microbio introducido en un organismo.

Quimioterapia: *Gr.- chymeia* (química); *gr.- therapeyo* (yo cuido). Terapéutica basada en el empleo de los productos derivados de la química, y por extensión, investigación de las causas que determinan la acción de los medicamentos.

Radioterapia: *lat.- radius* (rayo); *gr.- therapeyo* (yo cuido). Empleo terapéutico de los rayos X.

Diálisis: *Gr.- dia* (a través); *lysis* (disolución). Cambio que se establece entre dos soluciones de sustancias de distinta naturaleza a través de una membrana porosa que las separa.

Otitis: *Gr.- ous* (oído); *itis* (inflamación). Inflamación aguda o crónica del oído.

Faringitis: *Gr. - pharynx* (faringe); *itis* (inflamación). Inflamación aguda o crónica de la faringe.

Idiopatía: Enfermedad que tiene carácter propio y no procede de otra.