



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CAMPUS IZTACALA

“Detección de *Acanthamoeba* spp. en canales de  
riego de Mexicali, Baja California”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

BRAULIO CALDERÓN GUZMÁN



DIRECTOR DE TESIS: BIOL. ARTURO CALDERON VEGA

Los reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México 2004



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.

Dedicatoria:

A mi Dios (Jesús) por que siempre has estado tan cerca, porque nunca me has dejado caer, porque siempre me mostraste el camino y he sentido gran felicidad, porque así sea, siempre, señor.

A mi pequeño Rafa, por traer tanta felicidad a casa, por su sonrisa que es una pequeña chispa, que motiva y da una inmensa alegría.

A mi amada esposa Ma. Guadalupe, por su valiosa cooperación en la realización de esta tesis.

A los mejores padres del mundo, Rafael y Nicolasa , que me regalaron la vida y gracias a sus cuidados, consejos y regaños me hicieron seguir siempre hacia delante.

A mis dos hermanas Elizabeth y Yenhui, que en las buenas y en las malas hemos estado siempre juntos.

A mi primo José Luis por compartir gran parte de su tiempo en esas aventuras inolvidables.

A mis revisores de Tesis por sus sugerencias y observaciones:

Dra. Maria del Rosario Sánchez Rodríguez  
Biol.. Arturo Calderón Vega  
M. en C. Maria Dolores Hernández Martínez  
M. en C. Ma. De Los Ángeles Sanabria Espinosa  
Biol. José Antonio Martínez Pérez

A la Doctora Elvia y al M. En C. Arturo por sus enseñanzas y su tiempo.

A mi segunda casa la Universidad Nacional Autónoma de México.

1 Resumen.....	1
2 Introducción.....	2
2.1 Amebas de vida libre.....	3
a) Importancia ecológica.....	3
b) Importancia biomédica .....	4
2.2 <i>Acanthamoeba</i> .....	5
a) Morfología y ciclo de vida.....	5
b) Taxonomía.....	7
c) Diagnostico.....	10
d) Tratamiento.....	11
3 Antecedentes.....	11
4 Justificación.....	13
5 objetivos.....	14
6 Ubicación de la zona de estudio.....	15
7 Materiales y Métodos.....	17
a) Recolecta y transporte de las muestras.....	17
b) Aislamiento de las amebas de la especie <i>Acanthamoeba</i> .....	18
c) Axenización.....	18
d) Identificación morfológica.....	19
e) Pruebas de tolerancia a la temperatura.....	19
8 Resultados y discusión.....	21
9 Conclusiones.....	35
10 Literatura citada.....	37
Anexo A.....	45
Anexo B.....	46
Anexo C.....	49

## 1. RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) son un grupo heterogéneo de organismos unicelulares, cosmopolitas, con adaptaciones para una existencia parásita o de vida libre. Tienen una gran importancia higiénica, médica y ecológica además de que forman parte de los ecosistemas acuáticos y aéreos, sin embargo algunos géneros como *Acanthamoeba* producen encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) en el sistema nervioso central y queratitis amebiana; que infecta a individuos sanos en su mayoría usuarios de lentes de contacto con higiene deficiente. Por estas razones fueron aisladas e identificadas taxonómicamente amebas del género *Acanthamoeba*; para dar un diagnóstico morfológico por microscopia de luz y pruebas de crecimiento a diferentes temperaturas, y pensar en una probable patogenicidad para este género. También se evaluaron algunas condiciones físicas y químicas del agua de los canales estudiados como: temperatura ambiental y del agua, pH y oxígeno disuelto.

Las AVL que se aislaron en mayor porcentaje fueron las del género *Acanthamoeba* abarcando un 60% en 3 muestreos, siendo *Acanthamoeba castellanii* la especie más abundante con un 63% del total de aislados. En cuanto a las consideraciones físicas y químicas del agua, estas presentaron las condiciones necesarias para que las AVL pudieran vivir, aunque dichos parámetros no influyeron directamente en el desarrollo de las amebas al no rebasar los límites preestablecidos para su desarrollo.

## 2. INTRODUCCIÓN

Las amebas son protozoos unicelulares de forma variada, que pueden ser solitarios o coloniales. Estos organismos han logrado explotar una gran diversidad de ambientes y muchas especies presentan diversos grados de asociación con otros organismos (Kudo, 1969). La importancia de estos protozoos es enorme, debido a que ocupan un lugar importante en los niveles tróficos de las comunidades naturales, ya que se alimentan principalmente de bacterias, hongos, algas, levaduras y otros protozoos (Wellings *et al.*, 1979; Pelczar *et al.*, 1982).

Las amebas de vida libre (AVL) son un grupo heterogéneo de organismos que poseen pseudópodos como carácter distintivo, su cuerpo tiene forma irregular y puede estar desnudo o protegido por conchas externas o internas, así como por esqueletos de varios tipos de diferente composición química.

Existen algunos géneros de AVL que pueden tener gran importancia médica y ecológica, capaces de sobrevivir en vida libre y como endoparásitos, por lo que se les ha denominado organismos anfizóicos (gr. *amphi*, que significa de “ambos lados”) Page (1974, 1976).

En este grupo se encuentran algunos géneros importantes, de interés en el aspecto clínico, que pueden causar ciertas patologías graves en seres humanos y animales. Estos géneros son: *Naegleria*, responsable de la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP), que invade y causa enfermedades a personas aparentemente sanas, con antecedentes de natación, mientras que *Acanthamoeba* es responsable de la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), debido a que se comporta como un organismo oportunista, capaz de producir infecciones en el Sistema Nervioso Central en personas inmunosuprimidas o bien la queratitis amebiana que ocurre frecuentemente en personas sanas en su mayoría usuarios de lentes de contacto con higiene deficiente (Gray y colaboradores 1994). Recientemente se han reportado los géneros *Balamuthia* y *Sappinia* como causantes de EAG (Martínez, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

### 2.1. Amebas de vida libre

#### a) Importancia ecológica

Las AVL son microorganismos cosmopolitas, prácticamente ubicuos, debido a su tamaño, facilidad de transportación y formación de quistes de alta resistencia. Todas estas características le permiten invadir otros medios diferentes al original (Bonilla, 2000); se han aislado de cuerpos de agua dulce, agua potable, plantas de tratamiento de agua residual, acuarios, suelo, aire, agua mineral embotellada, hielo, tanques de agua, sedimentos marinos, unidades de diálisis, unidades dentales, tinas de hidroterapia, cultivos celulares, piel de personas sanas, soluciones de lentes de contacto, entre otros (Lares, 1990; De Jonckheere, 1991; Visvesvara, 1991, 1993; Martínez, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

En los ambientes acuáticos, las AVL viven sobre la superficie del agua, adheridos a partículas flotantes o en el sedimento, si el cuerpo de agua no es muy profundo (Rodríguez, 1994). Son importantes en el mantenimiento del flujo de energía y reciclado de los nutrientes en los sistemas acuáticos ya que juegan un papel importante dentro del control poblacional de las bacterias, siendo estas su principal alimento. En el suelo participan en el incremento de la tasa de transformación del fósforo y nitrógeno a formas aprovechables para las plantas, aumentando así la biomasa vegetal (Fenchel, 1987; Tyndall *et al.*, 1989).

En la atmósfera, pueden ser transportadas en forma de quiste (que es una forma de resistencia), adheridas a partículas de polvo o cualquier otro elemento, que no oponga resistencia al viento. No se puede considerar a la atmósfera como un hábitat, debido a que la sobrevivencia de los microorganismos en ese ambiente hostil es corto; sin embargo, las condiciones que prevalecen durante su permanencia en la atmósfera son de gran importancia para su viabilidad y distribución (Bonilla, 2000).

## **b) Importancia biomédica**

Las AVL se encuentran ampliamente distribuidas en el ambiente y solo algunas representan un alto potencial patógeno para animales y el

hombre (Martínez *et al.*, 1991; Visvesvara *et al.*, 1993; Rodríguez, 1994) (Tabla 1).

Especies	Infección En el SNC*	Infección Ocular	Otros tejidos
<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	X		Nódulos linfáticos, adrenales, piel (ulceraciones), tiroides y senos nasales.
<i>A. castellanii</i>	X	X	Pulmón (neumonía), próstata, hueso, músculo, y piel.
<i>A. culbertsoni</i>	X	X	Hígado, bazo, útero y piel
<i>A. hatchetti</i>		X	
<i>A. palestinensis</i>	X		
<i>A. polyphaga</i>		X	
<i>A. rhyodes</i>	X	X	
<i>A. mauritaniensis</i>		X	
<i>Hartmannella vermiformis</i>	X		
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	X		Pulmón
<i>Naegleria fowleri</i>	X		

SNC\*: Sistema Nervioso Central

*A. mauritaniensis* nuevo agente reconocido en queratitis de humano (Scaglia, *et al.*, 1998).

Tabla 1. Infecciones humanas causadas por amebas de vida libre (John, 1993 modificada por Calderón, B.).

Las amebas del género *Acanthamoeba* se comportan como organismos oportunistas, esto porque algunas especies tienen la capacidad de producir infecciones en el sistema nervioso central (SNC), aunque también, se les ha encontrado habitando naturalmente en fosas nasales de humanos saludables (Rivera *et al.*, 1986; Cerva *et al.*, 1989).

Para que *Acanthamoeba* logre infectar, se deben conjugar factores de predisposición como: embarazo, alcoholismo, quimioterapia, radioterapia, diálisis, trasplantes, entre otros, y/o asociación con enfermedades como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), diabetes, neumonías, otitis, faringitis, cirrosis, hepatitis y trastornos del sistema inmunológico (Martínez y Janitschke, 1985). Las amebas alcanzan el cerebro a través del torrente sanguíneo, causando enfermedades como la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) o acantamebiosis, cuya patología presenta un curso clínico largo con signos y síntomas neurológicos que dependen del sitio dañado y la queratitis amebiana, que infecta principalmente a usuarios de lentes de contacto, a veces sanos y sin antecedentes de inmunosupresión.

La vía de entrada puede ser a través de la piel, tejido ocular o las mucosas por medio de agua o aire contaminados (Martínez, 1983, 1985; Martínez y Visvesvara, 1997; Marciano-Cabral *et al.*, 2000).

## 2.2. *Acanthamoeba*

### a) Morfología y ciclo de vida

*Acanthamoeba* es un microorganismo eucarionte, unicelular, aerobio, con reproducción asexual. El trofozoíto representa la parte proliferativa, cuyas dimensiones están entre los 24 a 56 $\mu$ m (Figura 1), presenta un núcleo con un nucleolo localizado centralmente con talla promedio de 15 a 35 $\mu$ m, variando el tamaño entre las diferentes especies (Pearl *et al.*, 1990), su citoplasma está constituido por dos zonas; una capa transparente o ectoplasma y un endoplasma granular que contiene múltiples mitocondrias, lisosomas y vacuolas (contráctil y alimenticia) (Martínez y Visvesvara, 1997), este estadio se distingue por presentar dos tipos de pseudópodos, uno de tipo hialino que le da movimientos multidireccionales y otro a lo largo del perímetro celular, llamados acantópodos (Gr. *acanthos*= espinas) que es uno de los rasgos distintivos de este género y que utiliza para fagocitar su alimento (John, 1993).

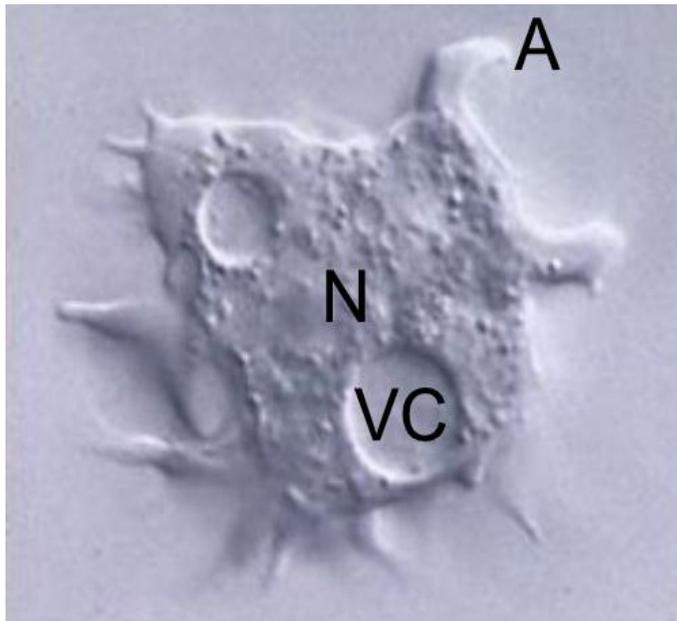


Figura 1. Trofozoíto de *Acanthamoeba* sp. A, acantópodo; N, núcleo; VC, vacuola contráctil (contraste de fases, 400x).

El quiste de *Acanthamoeba* se desarrolla cuando las condiciones medioambientales no son favorables (Figura 2), ya sea por falta de alimento, cambio de temperatura, escasez de nutrientes, efecto de fármacos, cloro, cambios de pH, desgaste acumulado por la saturación

celular en medios de cultivo, desecación e inanición (Pearl *et al.*, 1990; Neil, 1997).

El tamaño promedio del quiste varía dependiendo de la especie y está caracterizado por la doble pared envolvente que es el ectoquiste o pared externa y el endoquiste o pared interna, que junto con su pared de celulosa le confiere gran resistencia al medio ambiente. Las dos paredes están separadas entre sí y se unen solamente en algunos puntos denominados poros u opérculos, la forma de la pared es muy variada en cada una de las especies por lo que constituye una importante herramienta taxonómica (Lares, 1990; Visvesvara, 1991; John, 1993).

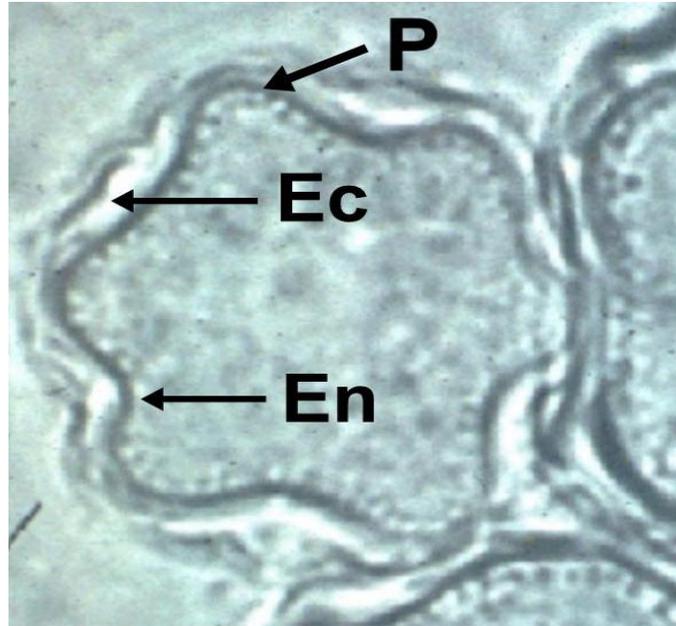


Figura 2. Quiste de *Acanthamoeba* sp. P, poro; Ec, ectoquiste; En; endoquiste (contraste de fases, 400x).

El ciclo de vida de *Acanthamoeba* presenta dos estadios: trofozoíto (fase trófica y reproductiva) y quiste (forma de resistencia)(Figura 3).

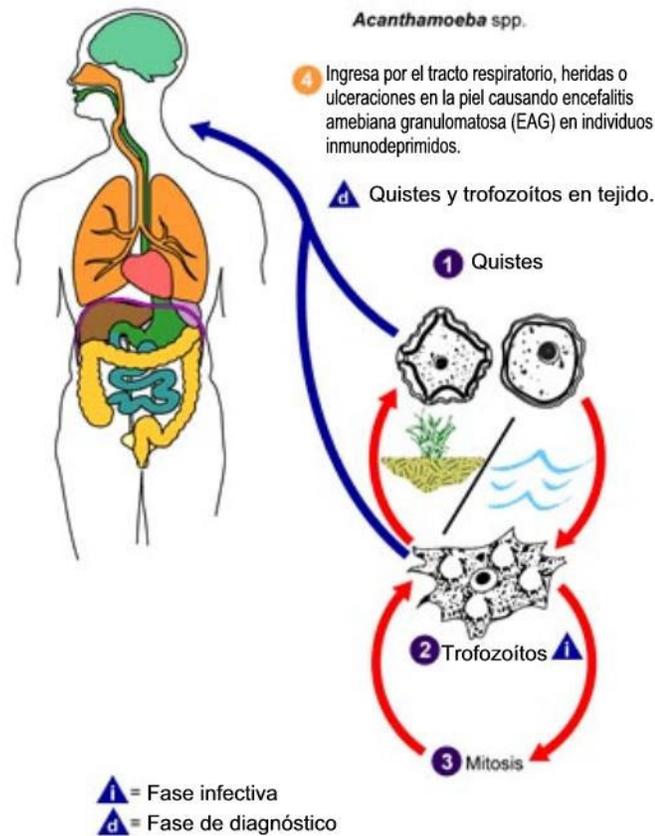


Figura 3. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. e infección humana.

## b) Taxonomía

Este género fue descrito en 1931 y actualmente existe una gran confusión acerca de su nomenclatura y estado taxonómico; sin embargo, en los últimos años el desarrollo en el campo de la investigación sobre microorganismos ha traído como consecuencia una amplia y basta cantidad de información, apoyándose principalmente en la microscopía electrónica, biología molecular, biología celular e inmunología, haciendo cada vez más compleja la clasificación de estos organismos (Visvesvara, 1991).

Se han propuesto varias clasificaciones, basadas principalmente en aspectos morfológicos del trofozoito y del quiste. Sin embargo, debido a que estas características morfológicas son comunes para muchas

amibas, en algunos casos se presentan dificultades de identificación. En ocasiones es necesario tomar en cuenta otros criterios tales como ultraestructura, pruebas de transformación o de virulencia, movilidad, requerimientos nutricionales, patrón de división nuclear, tolerancia a la temperatura y formas de crecimiento en cultivo (De Jonckheere, 1987; Ferrante, 1991; Kilvington, 1995).

Recientemente se han adoptado nuevas metodologías diagnósticas, como las pruebas inmunológicas, extractos crudos y sondas de DNA (De Jonckheere, 1984, 1987; Ferrante, 1991; Kilvington 1995). Otra propuesta no considerada es la patogenicidad, como un carácter distintivo para separar al género *Acanthamoeba* del género *Hartmannella*; en cambio se propone su separación por diferencias de locomoción, formación de acantópodos y morfología del quiste (Page, 1988). Sin embargo, el sistema taxonómico más aceptado y que describe con precisión el lugar que ocupan las amibas en el grupo de los protozoos corresponde a Lee y colaboradores (1985) (Tabla 2).

Reino **Protista** Haeckel, 1866  
Subreino **Protozoa** Goldfuss, 1818; emend. von Siebold, 1846  
Phylum **Sarcomastigophora** Honigberg y Balamuth, 1963  
Subphylum **Sarcodina** Schmarda, 1871  
Superclase **Rhizopodea** von Siebold, 1845  
Clase **Lobosea** Carpenter, 1861  
Subclase **Gymnamoebia** Haeckel, 1862  
Orden **Amoebida** Kent, 1880  
Suborden **Acanthopodina** Page, 1976  
Familia **Acanthamoebidae** Sawyer y Griffin, 1975  
Género **Acanthamoeba** Volkonsky, 1931; emend. Page, 1967

Tabla 2. Clasificación del género *Acanthamoeba* spp. (Lee *et al.*, 1985; Page, 1988).

Así, en 1988 De Jonckheere y Page apoyaron la clasificación para *Acanthamoeba* de Pussard y Pons (1977), con algunas modificaciones (Tabla 3), quedando como sigue:

**Grupo I.** Diámetro promedio del quiste • 18µm; El endoquiste y el ectoquiste están separados y solo se unen en puntos llamados poros u opérculos que están a nivel del ectoquiste, el número de poros y brazos es el mismo. El endoquiste es de una forma estrellada, rodeada por el ectoquiste que es más o menos redondeado. No tienen representantes patógenos, generalmente no crecen a 37°C y es difícil que se desarrollen en medios axénicos. Este grupo no es tan relevante ya que parece no tener importancia para la salud pública.

**Grupo II.** Formado por diez especies. El diámetro promedio del quiste es <18µm. Este grupo incluye las especies más comunes y ampliamente distribuidas. El endoquiste tiene una forma estrellada o poligonal, de tal manera que las dos paredes se unen en los brazos, el ectoquiste presenta una forma más o menos redondeada. En este grupo se encuentran las especies de mayor importancia médica que causan infecciones corneales en humanos.

**Grupo III.** El diámetro promedio del quiste es usualmente < 18µm. Presentan un exoquiste muy delgado, el endoquiste es redondeado y no presenta extensiones o brazos, ya que las paredes están muy juntas entre sí. Estos organismos son relativamente termófilos y menos comunes en ambientes naturales, pero los más comunes en infecciones cerebrales.

GRUPO	ESPECIES
I	<i>Acanthamoeba astronyxis</i> <i>A. comandoni</i> <i>A. tubiashi</i>
II	<i>A. polyphaga</i> <i>A. castellanii</i> <i>A. rhyodes</i> <i>A. griffini</i> <i>A. mauritaniensis</i> <i>A. lugdunensis</i> <i>A. quina</i> <i>A. divionensis</i> <i>A. triangularis</i> <i>A. hatchetti</i>
III	<i>A. palestinensis</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. lenticulata</i> <i>A. royreba</i>

Tabla 3. Clasificación de *Acanthamoeba* spp. de acuerdo con Page (1988).

**c) Diagnóstico**

Varias especies del género *Acanthamoeba* como son: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, y *A. rhyodes*, junto con otras amebas de vida libre están consideradas originalmente como microorganismos altamente patógenos para el hombre, capaces de provocar encefalitis amebiana granulomatosa (John, 1993).

La infección ocurre probablemente en el tracto respiratorio bajo, en mucosas o ulceraciones en la piel, por lo cual algunos pacientes pueden iniciar con infecciones respiratorias y síntomas similares a un absceso cerebral o tumor cerebral común, fotofobias, somnolencias, cefaleas, cambios de personalidad, irritación meníngea, náuseas, vomito, coma y la muerte (Martínez, 1991; Gordon, 1992; John, 1993).

La diseminación de *Acanthamoeba* es por vía hematológica de quistes y trofozoítos e invaden tejido subcutáneo, piel, hígado, pulmones, riñones, glándulas suprarrenales, páncreas, nódulos linfáticos, útero, huesos y músculo (Martínez, 1982; Alpuche, 1989; Pearl, 1990).

El cuadro clínico puede confundirse con tuberculosis cerebral, afecciones virales, meningitis bacteriana y absceso cerebral. Sin embargo, un interrogatorio de los antecedentes del paciente, así como un cuadro respiratorio bajo y la rebeldía al tratamiento, sugiere acantamebiosis (Gallegos, 1997).

En la actualidad se empiezan a utilizar algunas pruebas de fácil y rápido diagnóstico tales como: la técnica molecular llamada reacción en cadena de polimerasa (PCR) que se basa en la amplificación ( $10^{8-9}$  veces aproximadamente) de un segmento de DNA, a partir de secuencias cortas (alrededor de 20 nucleótidos) iniciadoras del segmento deseado, así como la presencia de nucleótidos y de la Taq polimerasa. Este método se lleva a cabo en ciclos de tres etapas que consisten en: a) desnaturalización del DNA, b) alineación de los iniciadores al segmento de DNA problema y c) síntesis del fragmento elegido. Esta técnica ha comenzado a utilizarse para detectar e identificar AVL en ambiente y muestras biológicas como córnea, cerebro, piel y líquido cefalorraquídeo (Byers *et al.*, 1990; Embley, 1991; Paule *et al.*, 1991; Vodkin *et al.*, 1992; John, 1993; Guisar, 1994).

Las técnicas inmunológicas como la inmunofluorescencia indirecta se basan en la técnica descrita por De Jonckheere (1984), usando antisueros obtenidos a partir de cepas de referencia. La técnica de ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima) se emplea para la cuantificación de antígenos o anticuerpos en muestras biológicas y se basa en la conjugación de una enzima a un antígeno o

anticuerpo conocido, haciendo reaccionar el conjugado con la muestra del paciente (Levinson, *et al.*, 1988).

#### **d) Tratamiento**

La infección producida por las AVL en particular por *Acanthamoeba*, resulta desafortunadamente con un curso de la enfermedad más prolongada, y aún con la aplicación del tratamiento, las probabilidades de sobrevivencia son bajas, por lo que son pocos los intentos por combatir esta infección, esto por la escasa cultura en la identificación de los brotes en la comunidad (Wang *et al.*, 1993).

Algunos antibióticos han sido probados *in vitro*, en contra de acantamebas aisladas de casos clínicos de los cuales se han obtenido diferentes grados de éxito, estos fármacos son: bencil penicilina, estreptomina, kanamicina, trimetoprim, ketaconazol, sulfadiazina, clotrimazol, miconazol, gentamicina y polimixina B (Schuster y Mandel, 1984; Feldman *et al.*, 1991; Martinez, 1991; Osato *et al.*, 1991; Tomlinson, 1991; Perrine *et al.*, 1992; Place *et al.*, 1993)

### 3. ANTECEDENTES

El estudio de las AVL, como agentes patógenos comenzó en 1899, cuando Schardinger encontró a *Naegleria gruberi* en heces de un paciente con disentería (Martinez, 1985; John, 1993), siendo esta la primera vez que se asoció la patogenicidad de las AVL con el hombre. Para 1931, Volkonsky establece a el género *Acanthamoeba*, al relacionar la formación de un uso mitótico durante la división celular y encontrar quistes de doble pared con una capa exterior irregular.

Culbertson y colaboradores, en 1958, describieron una encefalitis en ratón producida por una ameba que contaminó un cultivo celular durante el desarrollo de la vacuna de la polio; posteriormente, el análisis microscópico reveló amebas de vida libre identificadas como *Acanthamoeba* spp., capaces de causar neuropatogenicidad (Lares, 1990; Visvesvara, 1991; Martínez y Visvesvara, 1997).

Page, en 1967, después de estudiar varias cepas de *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y otras especies de AVL, consideró la presencia de seudópodos en forma de espina (acantópodos) y la estructura del quiste como distintivos a nivel genérico. Griffin, de igual manera, condujo experimentos de tolerancia de las amebas a temperaturas extremas superiores a los 37°C, estableciendo así la patogenicidad de las amebas.

Los primeros casos de meningoencefalitis en humanos, debidamente documentados, provienen de hace solo unas décadas (Carter, 1970). La enfermedad producida por *Acanthamoeba* en el SNC se llamó encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), este término fue propuesto por Martínez en 1980 para describir la morfología de las zonas del cerebro necrosadas.

Por otro lado, estas amebas también se identificaron en infecciones oculares produciendo queratitis amebiana; los dos primeros casos fueron registrados en Gran Bretaña por Nagington (1975), donde las amebas provocaron ulceraciones crónicas progresivas en córnea. Las amebas fueron identificadas como *A. polyphaga* y *A. castellanii*.

Los dos primeros casos de queratitis amebiana identificados en Estados Unidos fueron registrados en Texas por Jones y colaboradores (1975), el agente etiológico identificado fue *Acanthamoeba* sp. (Martínez y colaboradores 1977).

En la actualidad, la queratitis producida por *Acanthamoeba*, es estudiada exhaustivamente y ha adquirido gran importancia, debido al descubrimiento de su asociación con el uso de lentes de contacto blandos y soluciones salinas de limpieza que son manipulados con muy poca higiene (González, 1994).

Las primeras investigaciones sobre AVL, en México, se iniciaron en 1978 por Rivera y colaboradores al reportar amebas del género *Naegleria* sp. aisladas de piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce en la Ciudad de México; al siguiente año Rivera y colaboradores aislaron *N. gruberi*, *A. culbertsoni* y *A. Astronyxis*, en aguas de grifo de la Cd. de México; para 1981 Rivera y colaboradores, reportaron *N. gruberi* y *A. astronyxis* en agua mineral embotellada, y en 1993, se reportaron los tres primeros casos de queratitis amebiana en México (Omaña, 1997).

Recientemente se han incluido otros análisis para la identificación del género *Acanthamoeba*, tales como perfiles de isoenzimas, polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés, RFLPs) del DNA mitocondrial y reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés, PCR).

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Ante una gran cantidad de información generada sobre AVL potencialmente patógenas para el ser humano,( De Jonckheere, 1979, 1981,1987; Rivera *et al.*, 1979, 1981, 1983, 1984, 1987, 1989; Kaspizak *et al.*, 1982; John 1993 y De Jonckheere, 1985; Martínez, 1985; Rondanelli, 1987) podemos mencionar que resulta importante el estudio de los canales de riego de Mexicali, Baja California ya que anualmente se reportan brotes epidemiológicos causados muy probablemente por AVL y en particular las del género *Acanthamoeba*, causantes de la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) y queratitis amebiana, que si no son diagnosticadas y tratadas a tiempo, pueden desencadenar infecciones en piel y órganos e incluso causar la muerte (Martinez, 1983, 1985, 2001; Lares, 1993; Martinez y Visvesvara, 1997).

Es importante mencionar que poco se conoce sobre la ecología de estos sistemas de riego, por lo que esta investigación pretende impactar sobre el uso de estos canales que son fuente de contaminación y un posible riesgo de infección para bañistas y usuarios del agua de los canales.

Por tal motivo y debido a la poca información y bajo presupuesto con que cuentan los hospitales e instituciones de salud de la República Mexicana, ninguna está dedicada especialmente al estudio de AVL, por lo que es necesario realizar investigaciones para determinar y erradicar infecciones causadas por amebas del género *Acanthamoeba* que puedan ser consideradas como peligrosas.

Es importante considerar que en nuestro país los canales de agua de riego están regulados por la Norma Oficial Mexicana NOM-003-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en aguas residuales tratadas que se reciclen para servicios al público, con el objeto de proteger el medio ambiente y la salud de la población, la cual se encuentra en riesgo permanente debido a el aumento de contaminantes en los afluentes, es por esto que se establecieron los siguientes objetivos:

## 5. OBJETIVOS

### Objetivo General

Aislar e identificar amebas del género *Acanthamoeba* spp. en canales de riego del valle de Mexicali, Baja California.

### Objetivos Específicos

- a) Aislar y cultivar amebas del género *Acanthamoeba* extraídas del agua de los canales de riego de Mexicali, Baja California.
- b) Identificar taxonómicamente hasta género los aislados por criterios morfológicos.
- c) Determinar algunas consideraciones físicas y químicas del agua de los canales estudiados como temperatura, pH y oxígeno disuelto.

## 6. UBICACIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

El estado de Baja California está situado en la parte noroeste de la República Mexicana. Su capital es Mexicali, sus coordenadas son: 32° 43' y 28° 00' de latitud norte, 112° 47' y 117° 07' de latitud oeste. Limita al norte con los Estados Unidos de América, Sonora y el Golfo de California ó Mar de Cortes; al sur con Baja California Sur y el Océano Pacífico. El estado cuenta con una superficie de 71,546 Km<sup>2</sup>, lo que representa el 3.6% del territorio nacional (Figura 4).

El clima predominante de la zona es BW(h')hs(x') muy seco cálido con lluvias en invierno, lo que favorece la existencia de vegetación desértica. La temperatura media anual va de 22 a 23°C; el mes más cálido es julio, con valores de 32 a 33°C temperatura media; y el más frío es enero, con un rango de 12 a 14°C.

En cuanto a precipitación la mayor incidencia de lluvias se produce en enero, cuyo rango es de 8 a 10.5 mm, o en diciembre con 13.7 mm; el mes con menor precipitación es mayo, en él se registran de 0 a 0.3 mm, por lo que se considera como un clima extremo (Síntesis INEGI, 2001).

El delta del río Colorado nace en las montañas del estado de Colorado y viaja cerca de 2, 250km. en dirección sudoeste hacia el golfo de California. A lo largo de 32 kilómetros, forma la frontera entre Baja California en México y Arizona en Estados Unidos. La cantidad de precipitación y los suelos pobres en materia orgánica son insuficientes para el desarrollo de cultivos, pero el valle de Mexicali y el delta del Río Colorado son utilizados para la actividad agrícola de riego de más de 200 mil hectáreas. El delta que es rico en nutrientes, favorece el incremento de la productividad biológica del agua que distribuye a la región de Mexicali, donde muchos pobladores utilizan este cause para nadar y refrescarse del intenso calor de la zona, e incluso para consumo urbano e industrial.

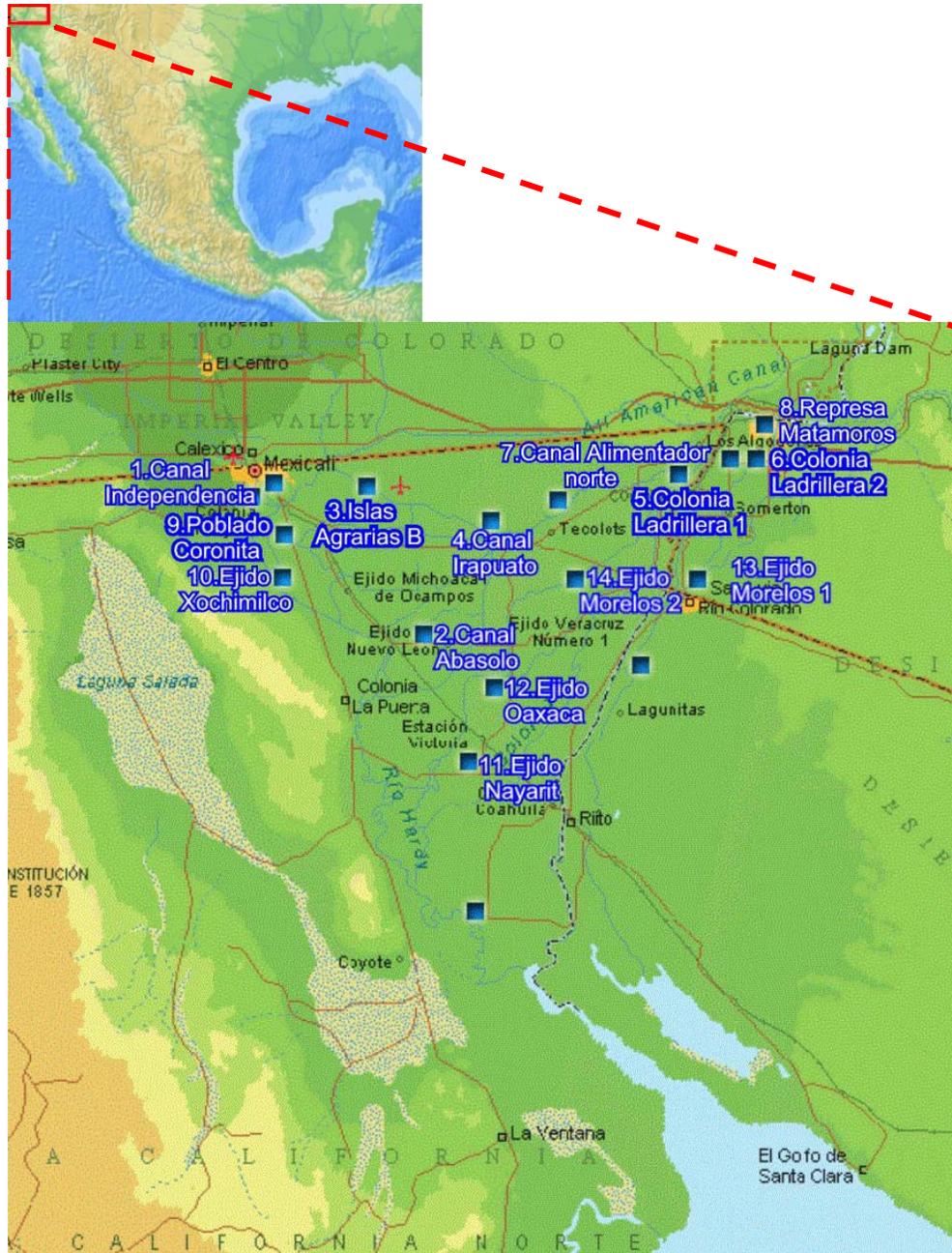


Figura 4. Ubicación de los canales de riego en Mexicali, Baja California.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### a) Recolecta y transporte de las muestras

Para la detección de *Acanthamoeba* spp. se realizaron 3 muestreos en los meses de marzo, junio y agosto de 2001, en 14 canales de riego en Mexicali, Baja California, siendo estos los más populares para nadar (Tabla 4).

No. De canal	Nombre del canal
1	Canal Independencia ley
2	Canal Abasolo
3	Islas Agrarias B
4	Canal Irapuato
5	Colonia ladrillera
6	Colonia ladrillera (2)
7	Canal alimentador del norte (Km. 3)
8	Represa Matamoros (Canal principal Presa Morelos)
9	Poblado Coronita
10	Ejido Xochimilco (Canal Reforma) Tulinchek
11	Ejido Nayarit
12	Ejido Oaxaca
13	Ejido Morelos (Canal Independencia)
14	Ejido Morelos (Chapoteadero)

Tabla 4. Canales de riego muestreados en Mexicali, Baja California.

Se midieron *in situ*, los parámetros físicos y químicos del agua con un termómetro digital (Radio shack), pH con un potenciómetro digital pH Tester2 (Oakton, USA), oxígeno disuelto (OD), con un oxímetro digital BWR Scientific mod. 4000.

Las muestras de agua se recolectaron por duplicado de cada sitio muestreado en frascos de polipropileno esterilizados de 1 litro de capacidad. Las muestras fueron recolectadas tomando tres profundidades de la columna de agua (superficie, parte media y fondo), tratando de tomar los cúmulos de algas y partículas flotantes que aumentan la probabilidad de aislar mayor número y diversidad de amebas (Kail, 1987).

Para el aislamiento de amebas del género *Acanthamoeba* las muestras de agua se transportaron vía aérea al laboratorio de biología molecular en la UIICSE del Campus Iztacala, a temperatura ambiente, donde se concentraron por centrifugación en tubos de polipropileno de 50 ml. a 1000 x g, en una centrífuga BECKMAN Mod. TJ-6 por 10 min., el sobrenadante se desechó y el sedimento se inoculó sobre placas con medio agar nutritivo (NNE) con *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor (65-70 °C durante 30 min.) (ANEXO A), que sirve como fuente de carbono para que las amebas se desarrollen (Rivera *et al.*, 1981; De Jonckheere, 1987; Kalinina y Page, 1992).

## **b) Aislamiento de las amebas de la especie *Acanthamoeba* spp.**

Las cajas Petri con NNE inoculadas para el aislamiento de *Acanthamoeba* spp. se mantuvieron en observación y cuando las muestras resultaron positivas a la presencia de AVL, se ubicaron con la ayuda de un microscopio invertido, las amebas que se encontraron solitarias o que estuvieran en pequeños grupos de características semejantes, se marcó su posición en las placas de Petri y se cortaron cuadritos de agar de aproximadamente 5mm<sup>2</sup> para ser transferidos a placas de NNE nuevas, para permitir el crecimiento de las amebas seleccionadas y eliminar otros posibles organismos contaminantes del medio de cultivo como bacterias y hongos.

## **c) Axenización**

Después de obtener los aislados positivos de *Acanthamoeba* en agar NNE, se seleccionó una zona con abundante crecimiento de amebas en forma trófica, cortándose el trozo de agar de la manera descrita anteriormente para el aislamiento de amebas y se depositó en un medio líquido axénico PBSGM, para evitar la contaminación microbiana, se agregó penicilina sódica y kanamicina en concentraciones de 200µg/ml. Este proceso, llamado axenización, produjo cultivos amebianos puros sin bacteria que se utilizaron para la identificación morfológica y morfométrica.

#### d) Identificación morfológica

La identificación morfológica de las AVL, se hizo observando las amebas sobre laminillas de vidrio con un microscopio de contraste de fases (ZEISS, estándar), se registro a un aumento de 40X la medida de 50 trofozoítos (largo y ancho) y 50 quistes (diámetro), para obtener posteriormente medidas de tendencia central (media, moda y mediana) y medidas de dispersión (desviación estándar y coeficiente de varianza) (ANEXO B), para así obtener la mejor aproximación a las medidas descritas por Page (1988). También se registraron las diferentes formas del trofozoíto, así como cualquier característica relevante (Page, 1988). Para la determinación taxonómica, se utilizaron las claves de Page (1988), guía ilustrada de Patterson (1992) y Robinson (1992) (Figura 7).

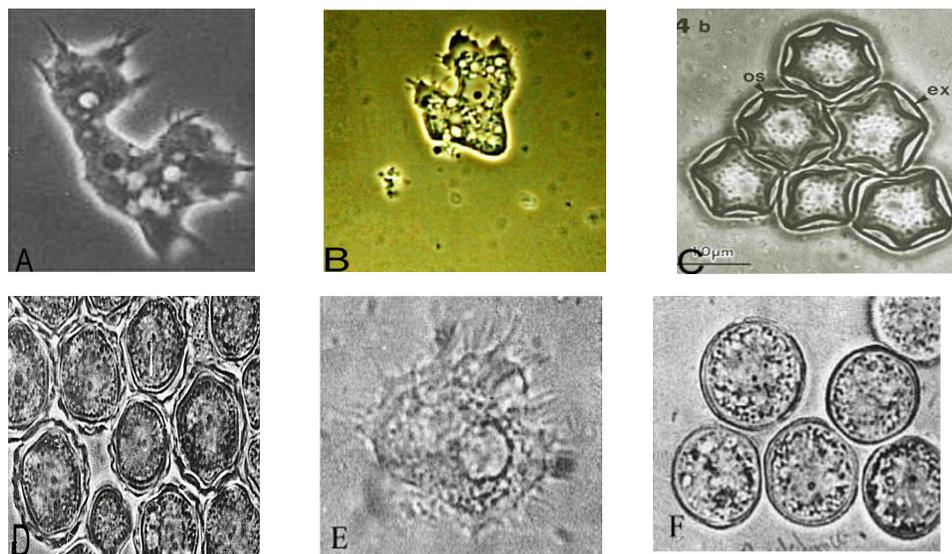


Figura 7. A-B trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. C quistes de *A. astronyxis*. D quistes de *A. castellanii* (Page, 1988) E trofozoíto de *Protacanthamoeba* spp. (Page, 1988) y F quiste de *Protacanthamoeba* spp. (Page, 1988).

#### e) Pruebas de tolerancia a la temperatura

Se realizó colocando simultáneamente copias de las placas de los aislados en una incubadora a diferentes temperaturas (37, 42 y 45°C) durante 48 horas, con la finalidad de conocer las temperaturas óptimas de crecimiento y tolerancia.

## 8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los tres muestreos realizados en los meses de marzo, junio y agosto de 2001, en 14 canales de riego en Mexicali, Baja California, se obtuvieron un total de 64 aislados amebianos (Tabla 5 y 6) pertenecientes a 10 géneros, describiéndose 6 especies para el género *Acanthamoeba* (Tabla 8).

Canal	Muestreo 1	Muestreo 2	Muestreo 3
1	<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Protacanthamoeba</i> sp.	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Protacanthamoeba</i> sp.	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
2	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Vahlkampfia</i> sp.	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Protacanthamoeba</i> sp.	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
3	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Willaertia</i> sp. <i>Leptomyxa</i> sp.	+++++	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
4	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Vahlkampfia</i> sp.
5	<i>Acanthamoeba griffini</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
6	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Saccamoeba</i> sp. <i>Protacanthamoeba</i> sp.	+++++	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
7	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Naegleria</i> sp.	+++++	+++++
8	<i>Thecamoeba</i> sp.	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
9	<i>Acanthamoeba hatchetti</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Echinamoeba</i> sp. <i>Naegleria</i> sp.	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Protacanthamoeba</i> sp.	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Vahlkampfia</i> sp.
10	+++++	<i>Acanthamoeba castellanii</i> .	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Thecamoeba</i> sp. <i>Rhizamoeba</i> sp.
11	+++++	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Protacanthamoeba</i> sp.	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Thecamoeba</i> sp. <i>Protacanthamoeba</i> sp.
12	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Vahlkampfia</i> sp.	<i>Acanthamoeba griffini</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
13	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
14	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba astronyxis</i> <i>Acanthamoeba castellanii</i>	+++++	<i>Acanthamoeba castellanii</i>

Tabla 5. Gimnamebas que se aislaron por canal de riego.

+++++ Cultivos que se contaminaron o no sobrevivieron desde el inicio.

En cuanto al número total de AVL aisladas, el 1er. muestreo correspondiente al mes de marzo se registro el mayor número de aislados; con 31 organismos, mientras que el segundo muestreo presentó solo 14 y por canal de riego, los canales 1, 3 y 9 del primer muestreo, registraron el mayor número de organismos aislados (Tabla 6, Figura 6).

Canal	1er. Muestreo	2do. muestreo	3er. muestreo	No. total de aislados por canal
1	3	2	1	6
2	2	2	1	5
3	5	----	1	6
4	1	1	2	4
5	1	1	1	3
6	4	----	1	5
7	3	----	----	3
8	1	1	1	3
9	5	2	2	9
10	----	1	3	4
11	----	2	3	5
12	2	1	1	4
13	1	1	1	3
14	3	----	1	4
<b>Total de aislados por Muestreo</b>	31	14	19	64

Tabla 6. Aislados totales obtenidos para los 14 canales de riego.

De los 10 géneros identificados *Acanthamoeba* fue el más abundante con un 60%, seguido por el género *Vahlkampfia* con 12% y *Protacanthamoeba* con 11%, mientras que en menor porcentaje se encontraron los géneros, *Thecamoeba*, *Naegleria*, *Willaertia*, *Leptomyxa*, *Saccamoeba*, *Echinamoeba* y *Rhizamoeba* (Tabla 7).

Género	Aislados	Porcentaje
<i>Acanthamoeba</i>	39	60%
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	7	11%
<i>Vahlkampfia</i> sp.	8	12%
<i>Thecamoeba</i> sp.	3	5%
<i>Naegleria</i> sp.	2	3%
Otros géneros	5	9%

Tabla 7. géneros de AVL aisladas en los canales de riego de Mexicali B. C.

Las 6 especies más abundantes durante los tres muestreos correspondieron a: *Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni* y *A. Polyphaga* con un 63%, 18% y 8% respectivamente (Tabla 8). Respecto al número total de aislados por muestreo, para el género *Acanthamoeba*, en los canales de riego, se observó que el primer

muestreo presentó una mayor abundancia de amebas con 16 aislados y en el segundo muestreo se obtuvieron 10 aislados (Tabla 8).

Aislado amebiano	Muestreo			Porcentaje
	I	II	III	
<i>A. polyphaga</i>	3	-	-	8 %
<i>A. castellanii</i>	6	8	11	63 %
<i>A. culbertsoni</i>	4	1	2	18 %
<i>A. griffini</i>	1	1	-	5 %
<i>A. hatchetti</i>	1	-	-	3 %
<i>A. astronyxis</i>	1	-	-	3 %
<b>Total de aislados para el género <i>Acanthamoeba</i></b>	16	10	13	100 %

Tabla 8. Total de aislados del género *Acanthamoeba* en canales de riego de Mexicali B. C.

El que la mayoría de las especies reportadas pertenecientes al género *Acanthamoeba* sean las más abundantes en la naturaleza, posiblemente se deba, a que su quiste le confiere gran resistencia a condiciones físicas y químicas adversas, esta resistencia se da principalmente por la doble pared de capa gruesa de celulosa y proteínas que rodea a la ameba y que le sirve como un medio de dispersión (Byers, 1979; Sleight, 1989). Además, el trofozoito tiene la capacidad de tolerar grandes variaciones en los ambientes acuáticos como cambios de temperatura, pH, disponibilidad de oxígeno disuelto y cambios de salinidad (John, 1993; Neil, 1997; Rodríguez, 1994). Por otra parte, se sabe también, que las especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* se presentan con mayor frecuencia en ambientes contaminados por materia orgánica (Martínez, 1985; Rodríguez, 1994).

El segundo género más abundante en los canales de riego fue *Vahlkampfia*, con un 12% (Tabla 7), estas amebas presentan un quiste con pared gelatinosa (Page, 1988) que disminuye la desecación, permitiéndoles un tiempo de viabilidad mayor.

Y el tercer género más abundante fue *Protacanthamoeba*, que presentó un 11% (Tabla 7), que al igual que el anterior, también forma un quiste que les confiere gran resistencia a condiciones adversas.

Los géneros restantes acumularon 10 aislados que significaron un porcentaje del 17% de todos los organismos amebianos reportados, entre los que se identificó a *Naegleria fowleri*, el organismo causante de la infección aguda conocida como MEAP.

Figura 6. No. de aislados totales para los 14 canales de riego del Valle de Mexicali B.C.



La obtención de todos estos organismos puede explicarse debido a que una gran área del estado se utiliza como superficie agrícola de riego, y la humedad constante de los cultivos, así como las elevadas temperaturas crean microhábitats que favorecen el desarrollo de una gran variedad de microorganismos como bacterias y hongos, que constituyen la principal fuente de alimento de las AVL's casi en cualquier época del año.

Con respecto a los parámetros físicos y químicos los resultados muestran que no tuvieron un efecto directo en el desarrollo de las AVL. En el caso de la temperatura del ambiente, pudimos apreciar que se tubo como valor más bajo 15°C para el canal 1 en el primer muestreo y el más alto de 46°C para el canal 5 en el segundo muestreo (Tabla 9 y 10), por lo tanto estos valores influyeron directamente en el aumento de la temperatura del agua, esto probablemente debido a la poca profundidad de los canales de agua cristalina y las paredes de concreto que recubren los canales, contribuyendo a un calentamiento más rápido del agua, que a su vez crea un sistema de disminución de competencia por alimento, capaz de desplazar a otras amebas que no son patógenas y termotolerantes (Rivera et al., 1983). En la literatura se reporta que la temperatura es uno de los factores más importantes que favorecen el crecimiento de las AVL, incluyendo los géneros con especies patógenas como *Naegleria* y *Acanthamoeba*.

Al tomar la temperatura del agua en cada uno de los canales de riego del Valle de Mexicali, el valor más bajo que se registro fue de 12°C para el canal 1 en el primer muestreo y los más alto de 31°C para los canales 4 y 11 del segundo muestreo (Tabla 9 y 10). Por lo tanto los valores de la temperatura del agua encontrados en los canales, contrastados contra los valores del número de aislados de *Acanthamoeba*, en estos cuerpos de agua, es que la temperatura no afectó directamente el desarrollo y abundancia de las AVL en el ambiente y esto se puede interpretar como la capacidad de las acantamebas para tolerar un ámbito de temperatura muy amplio, el cual no fue alcanzado en ninguno de los canales muestreados. Es decir, los valores de temperatura en todos los muestreos estuvieron dentro del rango tolerado y no hubo valores en el agua que fueran tan extremos que representaran un cambio drástico para el desarrollo de las amebas ya que pueden soportar temperaturas por debajo de los 4°C y algunas pueden sobrevivir a temperaturas mayores de 45°C (De Jonckheere, 1981).

El valor de pH registrado en los tres muestreos fue muy homogéneo, el valor máximo registrado fue de 8.4 para el canal 12 del primer muestreo y el mas bajo de 6.0 registrado en el canal 14 del segundo muestreo (Tabla 9 y 10), por lo tanto no son valores extremos que justifiquen a este factor como condicionante para el desarrollo de las AVL, recordemos que estas amebas pueden soportar un pH que puede variar de los 4.3-9.7 (Singh, 1975; Marciano-Cabral, 1988).

Uno de los parámetros más importantes fue, el oxígeno disuelto, que reporto valores altos, de 13.8 mg/L y otros más bajos de 3.9 mg/L (Tabla 10). Dadas las condiciones de temperatura tanto del ambiente como de la misma agua donde se midió el OD, se esperaba encontrar valores bajos, sin embargo, la alta oxigenación del agua puede interpretarse por la presencia de plantas hidrofitas como la *Hidrilla*, que representa un problema constante y costoso para erradicar estas plantas que representan una plaga en el sistema de los canales de riego. Se interpreta que las altas concentraciones de OD medidas en los canales, puedan atribuirse al intenso proceso fotosintético que se da cuando las las plantas acuáticas transforman la luz e inhalan anhídrido carbónico, separan el carbono y lo utilizan para procesar la materia orgánica y finalmente la planta desprende oxígeno, lo cual mejora las condiciones de oxígeno en el agua, beneficiando directamente a las AVL. También este parámetro pudo haber sido modificado por los constantes desniveles que ocasionan que el agua se agite violentamente y aumentar significativamente el oxígeno que se solubiliza.

Canal	Temp. ambiente °C	Temp. agua °C	pH	Oxígeno disuelto mg/L
1	15.3	12.1	8.3	6.4
2	17.2	17.0	7.7	7.9
3	23.0	18.4	7.8	9.5
4	23.0	18.1	6.9	3.9
5	22.7	21.6	7.8	6.2
6	21.0	19.4	7.3	5.6
7	20.5	18.1	7.8	5.9
8	19.1	17.4	8.1	6.7
9	21.8	19.3	8.2	9.6
10	25.2	19.3	8.1	9.2
11	24.6	20.4	8.0	9.7
12	27.3	19.5	8.4	12.8
13	22.7	22.4	8.3	7.9
14	21.2	20.9	8.3	11.5

Tabla 9. Valores *in situ* para el 1er. muestreo marzo 2001.

Canal	Temp. ambiente °C	Temp. agua °C	pH	Oxígeno disuelto mg/L
1	38.5	27.5	8.1	9.0
2	40.5	28.0	8.0	8.3
3	45.0	29.5	7.9	10.3
4	44.5	31.2	7.0	6.7
5	46.5	30.2	7.6	6.6
6	42.5	29.3	8.2	13.8
7	37.5	29.2	7.8	7.6
8	39.5	28.0	7.4	7.4
9	38.0	29.3	6.4	6.7
10	35.0	29.8	6.4	6.4
11	38.5	31.0	6.5	9.3
12	43.0	29.5	6.5	9.3
13	40.0	28.6	6.3	8.2
14	37.0	25.8	6.0	6.0

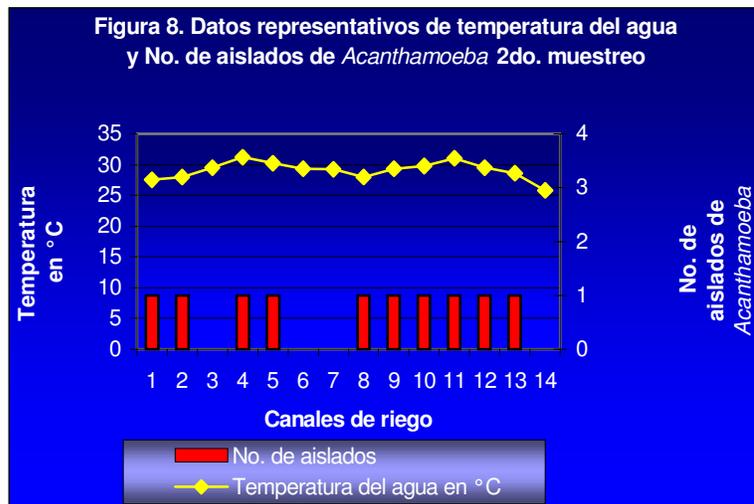
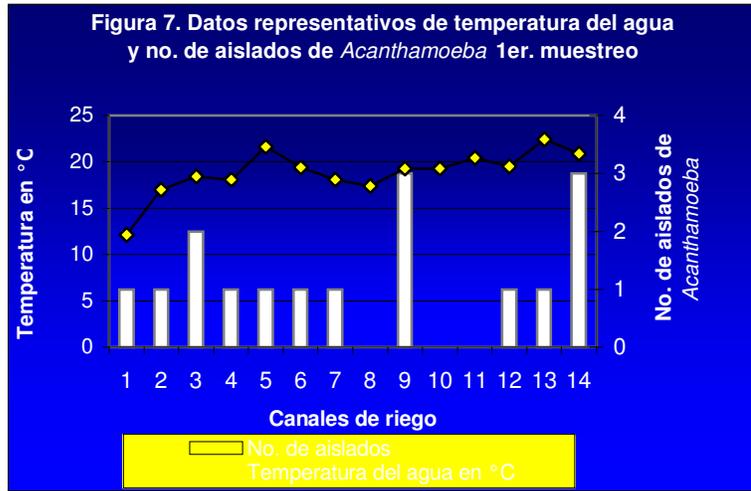
Tabla 10. Valores *in situ* para el 2do. Muestreo junio 2001.

Canal	Temp. ambiente °C	Temp. agua °C	pH	Oxígeno disuelto mg/L
1	30.3	20.1	7.3	9.2
2	32.1	20.5	7.7	8.8
3	35.4	21.7	8.3	9.1
4	37.2	25.6	8.1	5.3
5	39.7	27.1	7.6	5.2
6	33.2	21.0	8.0	7.8
7	35.3	27.2	7.3	5.8
8	35.0	23.8	6.5	7.1
9	31.3	18.7	6.8	5.2
10	35.2	23.2	6.9	7.8
11	31.2	25.7	7.2	9.9
12	34.2	25.9	6.8	12.2
13	33.2	28.1	7.2	9.3
14	31.2	24.8	7.1	7.5

Tabla 11. Valores *in situ* para el 3er. muestreo agosto 2001.

Para una mejor representación de los parámetros físicos y químicos se crearon gráficas de los resultados obtenidos de la temperatura del agua (Figuras 12, 13 y 14), pH (Figuras 15, 16 y 17) y oxígeno disuelto (Figuras 18, 19, 20), para cada muestreo, que fueron contrastados por

separado y para cada muestreo con los datos obtenidos del número de aislados del género *Acanthamoeba* para observar de manera gráfica el efecto de cada parámetro sobre la abundancia de las acantamebas identificadas.



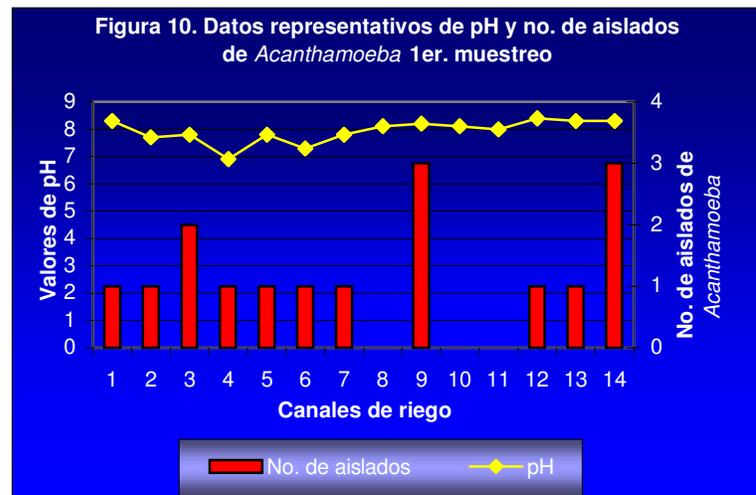
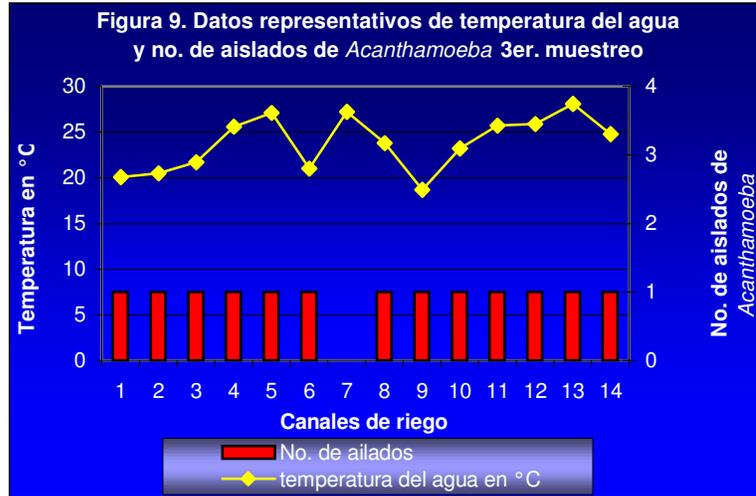


Figura 11. Datos representativos de pH y no. de aislados de *Acanthamoeba* 2do. muestreo

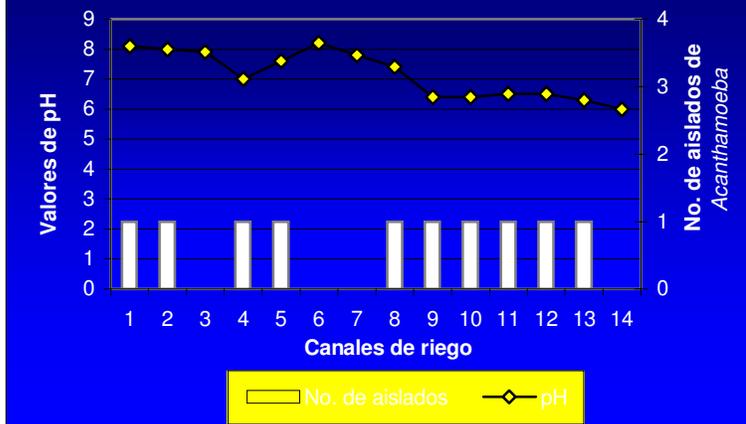


Figura 12. Datos representativos de pH y no. de aislados de *Acanthamoeba* 3er. muestreo

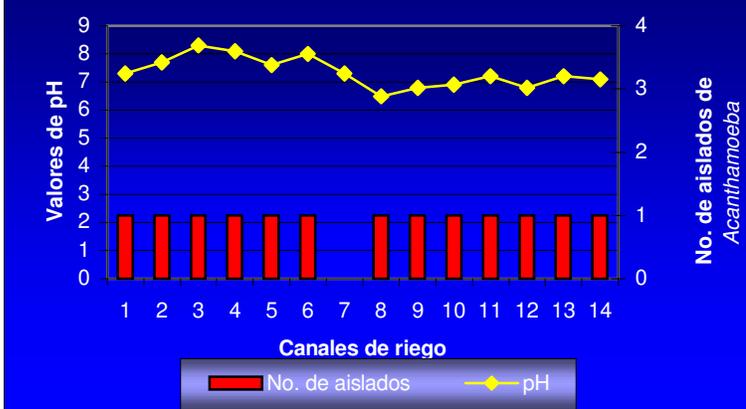


Figura 13. Datos representativos de oxígeno disuelto y no. de aislados de *Acanthamoeba* 1er. muestreo

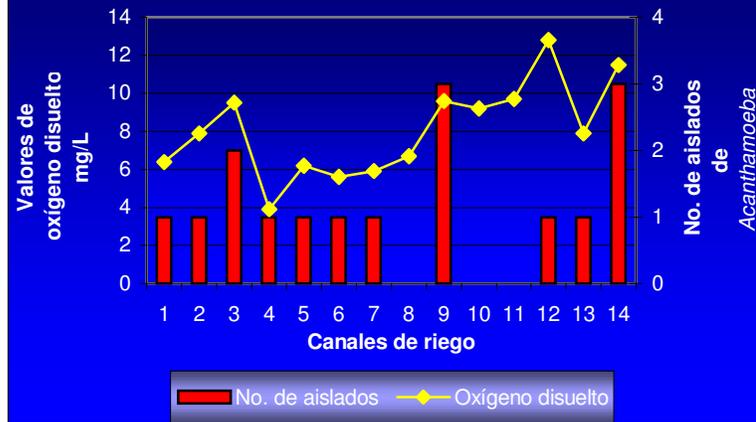
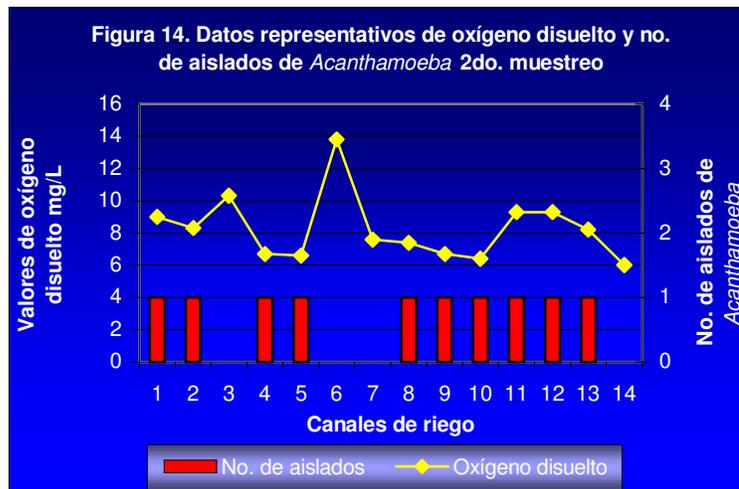
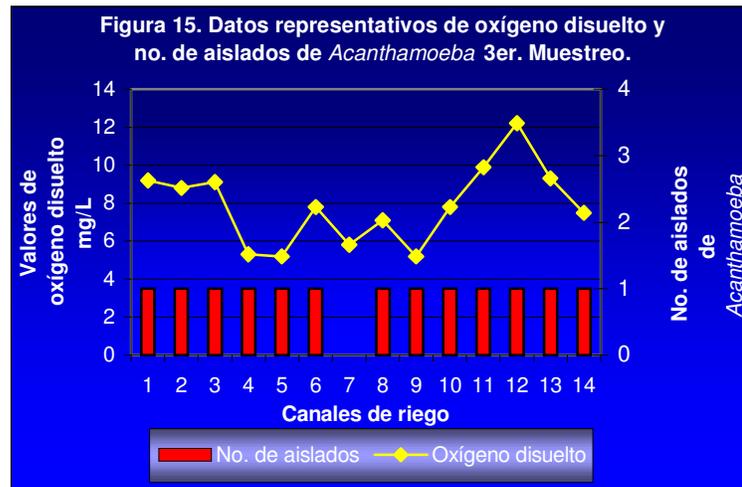


Figura 14. Datos representativos de oxígeno disuelto y no. de aislados de *Acanthamoeba* 2do. muestreo





Con los datos de las figuras anteriores de los parámetros físicos y químicos y el número de aislados del género *Acanthamoeba*, se aplicó un método estadístico que permitiera establecer de una manera válida las posibles relaciones entre los organismos aislados y los diferentes parámetros ambientales. Para este fin se obtuvieron los índices del coeficiente de correlación (obtenidos con el paquete Microsoft Excel 2000 y corroborado con una calculadora gráfica fx-8500G), entre dos grupos de datos para obtener el grado de intensidad de la posible relación lineal entre dos variables **X** y **Y**, en este caso **X** correspondió a el número de acantamebas obtenidas por canal de riego y **Y** a los valores *in situ*, de temperatura del agua, pH y oxígeno disuelto (Daniel, 2002), Los resultados obtenidos en la tabla 12, demuestran que no existió una correlación entre las amebas del género *Acanthamoeba* y los parámetros físicos y químicos, lo que nos demuestra una vez más que las amebas del género *Acanthamoeba*, no dependen de los factores físicos y químicos en el agua, esto por su alta resistencia y rápido enquistamiento a condiciones desfavorables.

El calculo del intervalo de confianza se hizo mediante la estimación de la media de la población, esto es: la estimación del 95% de confianza de la media de la población de todos los intervalos que puedan construirse (Daniel, 2002).

Muestreo	Temp. Agua	PH	Oxígeno disuelto
I	0.1304	0.1422	0.3285
II	0.2838	-0.2716	-0.3728
III	-0.3256	0.0230	0.2899

Tabla 12. Valores obtenidos del coeficiente de correlación.

En cuanto a las pruebas de tolerancia a la temperatura, se sometieron 64 aislados repartidos en 36 cultivos a tres temperaturas diferentes; el 91% de los aislados presentaron mayor crecimiento a 37°C, (Tabla 13) (que es casi la temperatura corporal), en un periodo de incubación de 48 horas según lo reportado por Scaglia *et al.*, (1987) quien señaló que algunas de las especies del género *Acanthamoeba* toleran temperaturas máximas de aislamiento y crecimiento de 37°C a excepción de *A. culbertsoni* que únicamente resiste temperaturas menores de 34°C. También afirman que algunas otras AVL pertenecientes a los géneros *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Mayorella* a pesar de no ser patógenas toleran temperaturas de 37°C, en tanto que el 33% fue capaz de crecer a 42°C, (Tabla 14) y solo un 11% toleró una temperatura máxima de crecimiento de 45°C (Tabla 15). Los organismos que fueron capaces de tolerar 42 y 45°C pueden considerarse como organismos probablemente patógenos.

canal	1er muestreo	2do. muestreo	3er. muestreo
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	**	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	**	+
7	+	**	**
8	+	-	+
9	+	+	+
10	**	+	+
11	**	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	-	-	+

Tabla 13. Prueba de tolerancia a la temperatura a 37°C en 48 horas.

- + Amebas que resultaron positivas a la prueba de tolerancia a al temperatura.
- Amebas que resultaron negativas a la prueba de tolerancia a la temperatura.
- \*\* cultivos que no sobrevivieron desde el inicio.

canal	1er muestreo	2do. muestreo	3er. muestreo
1	-	-	-
2	-	-	-
3	+	**	-
4	+	-	+
5	+	-	-
6	-	**	+
7	-	**	**
8	-	-	-
9	-	+	-
10	**	-	+
11	**	+	+
12	-	-	-
13	+	-	+
14	+	-	-

Tabla 14. Prueba de tolerancia a la temperatura a 42°C en 48 horas.

- + Amebas que resultaron positivas a la prueba de tolerancia a al temperatura.
- Amebas que resultaron negativas a la prueba de tolerancia a la temperatura.
- \*\* cultivos que no sobrevivieron desde el inicio.

canal	1er muestreo	2do. muestreo	3er. muestreo
1	-	-	-
2	-	-	-
3	+	**	-
4	-	-	-
5	-	-	-
6	-	**	-
7	-	**	**
8	-	-	-
9	-	+	-
10	**	-	-
11	**	-	+
12	-	-	-
13	+	-	-
14	-	-	-

Tabla 15. Prueba de tolerancia a la temperatura a 45°C en 48 horas.

- + Amebas que resultaron positivas a la prueba de tolerancia a al temperatura.
- Amebas que resultaron negativas a la prueba de tolerancia a la temperatura.
- \*\* cultivos que no sobrevivieron desde el inicio.

Finalmente es importante resaltar el papel ecológico que juegan las amebas pertenecientes al género *Acanthamoeba*, ya que están consideradas como consumidores primarios en la cadena alimenticia y a la vez sirven como medio de transporte para bacterias como *Legionella*, *Listeria* y *Vibrio* (Baker y Brown, 1994; Marciano-Cabral y colaboradores (2000), protegiéndolas de condiciones ambientales adversas, lo que les permite la supervivencia, replicación y diseminación de dichas bacterias en los ecosistemas naturales (lagos, ríos, acuíferos) y artificiales (estanques, tuberías, canales de irrigación y piscinas). También las amebas de este género son consideradas como indicadores biológicos, por encontrarse principalmente en lugares contaminados por materia orgánica.

## 9. CONCLUSIONES

Es positiva la existencia de AVL en canales de riego de Mexicali, Baja California.

El mayor número de aislados se presentó en el primer muestreo.

Los canales 1, 3 y 9 del primer muestreo ambos con 5 aislados, fueron los de mayor abundancia.

Se obtuvieron un total de 64 aislados amebianos pertenecientes a 10 géneros.

El género más abundante fue *Acanthamoeba* con un 60% del total de los aislados, esto por su gran capacidad de adaptación y tolerancia a condiciones ambientales desfavorables.

Se identificaron 6 especies para el género *Acanthamoeba* de las cuales la más abundante fue *A. castellanii*.

Los géneros más abundantes durante los tres muestreos fueron *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Protacanthamoeba*.

Los parámetros físicos y químicos no fueron obstáculo para que las AVL estuvieran presentes en los canales de riego.

Las elevadas temperaturas ambientales, trajeron como consecuencia una alta temperatura del agua que beneficio directamente a las amebas en su desarrollo.

El pH registrado en los 3 muestreos fue muy homogéneo, con valores dentro de la tolerancia, por lo que no es un factor de riesgo para las amebas.

Los altos valores de oxígeno disuelto pudieron ser provocados por los altos desniveles en los canales que agitan violentamente el paso del agua o por la presencia de la planta acuática *Hydrilla verticillata*, que puede modificar los niveles de oxígeno disuelto.

Según los datos obtenidos, la correlación de los factores físicos y químicos y el número de aislados para el género *Acanthamoeba* no mostraron una relación muy intensa.

La temperatura optima de crecimiento ,*in vitro*, para las amebas fue de 37°C.

Los canales de riego de Mexicali, Baja California representan un potencial foco de infección, principalmente para usuarios del agua de riego, uso domestico y actividades recreativas de contacto directo.

## 10. LITERATURA CITADA

Alpuche, A. 1989. Infección del sistema nervioso central de origen oscuro: encefalitis amebiana. Hospital Infantil de México. **46**: 583-585.

Baker, J. y Brown, M. 1984. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol.* **140**: 1253-1259.

Byers, T. 1979. *Int. Rev. Cytol.* **61**:283-338

Byers, T., Hugo, E. y Stewart, V. 1990. Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (A review). *J. Protozool.* **37**: 17S-25S.

Bonilla, L. 2000. *Heterogeneidad de las Amibas de Vida Libre con Potencial Patógeno Aisladas de la Atmósfera de la Ciudad de México*. Tesis Doctoral en Ciencias (Biología), Fac. de Ciencias. UNAM. México. 106pp

Carter, R. 1970. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental changes induced by it. *J. Pathol.* **100**: 217-244.

Cerva, L. 1989. *Acanthamoeba culbertsoni* and *Naegleria fowleri*: occurrence of antibodies in man. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* **33**:99-103.

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

Daniel, W. 2002. *Bioestadística. Base para el Análisis de las Ciencias de la Salud*. Ed. Limusa Wiley. 4a. Edición. México. 755pp.

De jonckheere, J. 1979. Occurrence of *Naegleria* and *Acanthamoeba* in aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 590-593

De Jonckheere, J. 1981. Pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* spp. Thermally polluted discharges and surfaces waters. *J. Protozool.* **28**: 56-59.

De Jonckheere, J. 1984. *Postgraduate Course on Biochemical Techniques for the Diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis*. UNAM, México. 70 pp.

De Jonckheere, J. 1987. Taxonomy. **En:** E.G. Rondanelli (ed). *Amphizoic Amoebae : Human Pathology Infectious Diseases*. Color Atlas Monograph. Piccin Nuova Libreria, Pavia, Italy. 25-48pp.

Embley, T. 1991. The linear PCR reaction: A simple and robust method for sequencing amplified rRNA genes. *Letters in Appl. Microbiol.* **13**: 171-174.

Feldman, S., Speaker, M., y Cleveland, P. 1991. Effect of maganins on *Acanthamoeba castellanii*. *Rev. Infect. Dis.* **13**:439.

Fenchel, T. 1987. *Ecology of Protozoa: The Biology of Free-living Phagotrophic Protists*. Springer Verlag, Wisconsin. 197 pp.

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

Gallegos, E. 1997. *Amibas de Vida Libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí*. Tesis Doctoral en Ciencias (Biología), Fac. de Ciencias. UNAM. México. 132 pp.

González, D. 1994. *Estudio Biomédico de Queratitis Producida por Acanthamoeba sp.* Tesis Licenciatura Biología. UNAM, México. FES Iztacala. 56 pp.

Gordon, M. 1992. Culture insolation of *Acanthamoeba* species and *Leptomyxid* amebs fron patients with amebic meningoencephalitis, including two patients with AIDS. *Clinical Infectious Diseases.* **15**: 1024-1030.

Guízar, J. 1994. *Genética Clínica, Diagnóstico y Manejo de las Enfermedades Hereditarias*. Ed. Manual moderno. 2a. Edición. México. 830 pp.

Gray, T., Gross, K., Curson, R. y Shewan, J. 1994. *Acanthamoeba queratitis: a sobering case and a promising new treatment.* *J. Oftamol.* **22**: 73-6

Griffin, J. 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecological interactions and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J. Protozool.* **30**:403-409.

Jager, V. y Stamm, P. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet.* 1343-1345

John, T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. **En:** Kreier J. P. y Baker J. R. (eds) *Parasitic Protozoa*. California: Academic Press. **2**: 143-246.

Jones, B. Visvesvara, S. y Robinson, M. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* **95**: 221-232.

Kadlec, V., Skvářová, J., Cerva, L. y Nebázniva, D. 1980. Virulent *Naegleria fowleri* in indoor swimming pool. *Folia Parasitol. Prague.* **27**: 11-17.

Kalinina, V. y Page, C. 1992. Culture and preservation of naked amoebae. *Acta Protozoologica.* **31**: 115-126.

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

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

Kyle, E. y Noblet P. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic Free-Living amoebae in freshwater lakes. *J. protozool.* **32**: 99-105

Kudo, R. 1969. *Protozoología*, Ed. Continental . Méx, D.F. 905 pp.

Lares-Villa, F. 1990. Biología y aspectos de patogenicidad de *Acanthamoeba*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **32**: 71-88

Lares- Villa, F., De Jonckheere, F., Moura, H., Rechi, A., Ferreira, E., Fernández, G., Ruíz, C. Y Visvesvara, S. 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, México: Studi of the insolates. *J. clin. Microbiol.* **31**:685-688

Lasman, M. 1982. the fine structure of *Acanthamoeba astronyxis* with special emphasis on encystment. *J. Protozool.* **29**:458-464.

Lee, J., Hunter, S. y Bovee, E. 1985. *An Illustrate Guide to the Protozoa*. Soc. of Prot. Allen Press, Inc., Kansas. USA. 622 pp.

Levinson, W., Jawetz, E. 1988. *Microbiología e Inmunología, Autoevaluación y Repaso.*, ed. Manual moderno. 2ª Ed. México D.F. 816 pp.

Marciano-Cabral, F., Cline, N., y Bradley, S. 1987. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria* species. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 692-697.

Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol. Rev.* **52**: 114-133

Marciano-Cabral, F., Puffenbarger, R., y Cabral, A. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47**:29-36

Martínez, A., Sotelo-Avila, C., García-Tamayo, J., Moron, T. y Stamm, P. 1977. Meningoencephalitis due to *Acanthamoeba* sp: pathogenesis and clinicopathological study. *Acta Neuropathol.* **37**:183-191

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

Martinez, A. 1983. Isolation of two strains of *Acanthamoeba culbertsoni* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 1405-1412.

Martínez, A. 1985. *Free-living Amebas: Natural History Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease*. CRC Press, Boca Ratón, Florida. 156 pp.

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

Martinez, A. y Visvesvara G. 1991. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba* and *Leptomyxid*. *Clin Lab. Med.* **4**: 861-872.

Martínez, A., 1993. Free living Amebas: infection of the central nervous system. *J. Med.* **60**:271-277.

Martinez, A. y Visvesvara G. 1997. Free living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain. Pathol.* **7**:583- 98.

Nagington, J. 1975. Isolation of amoebae from eye infections in England. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* **95**: 207-209.

Neil, T., Giancarlo B. y David, L. 1997. Anaerobiosis-induced differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *FEMS Microbiol. Letters.* **157**:149-153

Omaña, M. 1997. *Estudio Comparativo de Tres Cepas del Género Acanthamoeba Responsable de los Primeros Casos Detectados de Queratitis Amebiana en México*. Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM-FES Cuautitlán. Mexico.166 pp.

Osato, M., Robinson, N., Wilhelmus, K., y Jones, D. 1991. *In vitro* evaluation of antimicrobial compounds for cysticidal activity against *Acanthamoeba*. *Rev. of infec. Diseases.* **13**: 431-435.

Page, F. 1974. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae with descriptions of new species and a key to genera. *Arch. Protistenk.* **116**: 149-184.

Page, F. 1976. *An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 180 pp.

Page, F. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*. Freshwater Biological Association. Cumbria, England. 122pp.

Patterson, D. y Hedley S. 1992. *Free-living Freshwater Protozoa*. A color guide. Department of Zoology. Londres.

Paule, M., Bateman, E., Hoffman, L., Lida, C., Imboden, M., Kubaska, W., Kounin, P., Li, H., Lofquist, A., Risi, P., Yang, Q. y Zwick, M. 1991. Initiation and regulation mechanisms of ribosomal RNA transcription in the eukaryote *Acanthamoeba culbertsoni*. *Mol. Cell. Biochem.* **104**: 119-126

Pearl, M. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. *Rev. Infect. Dis.* **12**:490-513.

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

Pensacreta, G. 1988. Water chemistry from north Carolina Piedmont impoundments with *Hydrylla* (*Hydrylla verticillata* (L.F.) Royle). Ph.D. Dissertation, North Carolina State University. Raleigh, NC.

Perrine, D., Barbier, D. y Chenu, P., Georges, D. 1992. Comparative study of cysticidal effects of three diamidines on *Acanthamoeba* strain isolated from keratitis. Abstracts of the VIth International Conference on the Biology and Pathogenicity of Free-Living amoebae. *J. Protozool.* 40-48.

Place, D., Allen, S., y Culbertson, C. 1993. Antimicrobial susceptibility testing of free-living amoebae using a new assay system. Abstracts of the 93. Annual meeting. ASMC.

Pussard, M. y Pons, R. (1977). Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, **13**, 557-598.

Rivera, F., Galván, M., Robles, E., Leal, P., González, L. y Lacy, A. 1981. Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J. Protozool.* **28**: 54-56.

Rivera, F., Rosas, I., Castillo, M., Chávez, M., Gómez, R., Chio, R. e Islas, J. 1986. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients II. *J. Environ. Res.* **39**: 364-371.

Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P. y Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *J. Environ. Res.* **42**: 149-154.

Rivera, F., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ramírez, J., Xóchihua, L. y Guzmán, H. 1989. *Acanthamoeba* spp. En quemaduras infectadas y rinitis. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* **31**: 137-140.

Robinson, B. 1992. *Analytical Methods Manual*. Protozoology. State Water Laboratory Engineering and Water Supply Department. South. Report N. 90 pp.

Rodríguez, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Rev. Microbiol.* **20**: 225-241.

Rondanelli, G. 1987. *Infectious Diseases. 1. Amphizoic Amoebae Human Pathology*. Piccin Nuova Libreria, Padua, Italia. 279pp.

Scaglia, M., Rama, P., Gatti, S., Penso, G., Cevini, C., Bruno, A. y Visvesvara, G. 1998. *Acanthamoeba mauritanensis*: a new recognized agent of human keratitis. *Oral sessions. Parasitol. Inf.* **47**: 133-281.

Schardinger, 1899. Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa*: *Amoeba geuber*. *Sitzber. Akad. Wiss (Wienn) Math. Natur. Abt. J.* **108**: 713-734.

Schuster, F. y Mandel, N. 1984. Phenothiazine compounds inhibit *in vitro* growth of pathogenic free-living amoebae. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **25**: 109-112

Singh, B. 1975. *Pathogenic and Non-Pathogenic Amoebae*. John Wiley y Sons. New York, USA. 33 pp.

Sleigh, M. 1989. *Protozoa and other protists*. E. Arnold (ed.) London, England. 342pp.

Síntesis INEGI, 2001. Síntesis geográfica del estado de Baja California.

Tomlinson, G. 1991. Screening for chemical inhibitors of growth rate, encystment, and excystment in *Acanthamoeba castellanii*. *Rev. of Infec. Dis.* **13**: 436-438.

Tyndall, R., Ironside, K., Metler, P., Tan, E., Hazen, T. y Fliermans, C. 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 722-732.

Visvesvara, G. 1991. Clasification of *Acanthamoeba*. *Rev. Infec. Dis.* **13**:369-372.

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

Vodkin, H., Howe, K., Visvesvara, G. y McLaughlin, L. 1992. Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. *J. Protozool.* **39**: 378-385.

Wang, A., Kai, R., Poon, W. y Ng, H. 1993. Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a chinese living in Hong Kong. *J. Clin. Neurol. Neurosurg.* **95**: 249-252.

Wellings, F., Amuso, S., Lewis, A., Farmelo, M., Moody, D. y Osikowicz, C. 1979. *Pathogenic Naegleria, Distribution in Nature*. Publicación de la Environmental Protection Agency, Cincinnati, EPA/ 600/ 1-79-018.

# ANEXO A

## Medios de cultivo

### MEDIOS DE CULTIVO

Para aislar amibas de vida libre, se utilizaron placas de agar nutritivo con una capa de bacteria *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor. Este medio se conoce como NNE. El medio NNE proporciona las sales y la fuente de carbono, en forma de bacterias, necesarios para el sostenimiento de las amibas de vida libre. Se prepara con los componentes de la solución salina de Neff y agar bacteriológico a una concentración de 1.5 % (De Jonckheere, 1984).

#### Medio NNE

NaCl .....	0.120 g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O .....	0.004 g
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O .....	0.004 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0.142 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.136 g
Agar bacteriológico .....	15.0 g
Agua destilada .....	1000 ml

Mezclar en seco todos los ingredientes, agregar 500 ml de agua destilada y disolver, complementar el volumen de 1000 ml y se calienta la mezcla hasta ebullición hasta disolver completamente el agar. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Se vierte de 15 a 20 ml en cajas petri estériles. Cuando el agar se haya solidificado en las placas, se inocula con *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor. 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 min.

Las placas con agar se siembran con 0.5 ml de la solución de bacterias muertas la cual se distribuye homogéneamente por toda la superficie del medio con una varilla acodada. Las placas de NNE se dejan reposar una hora aproximadamente y se guardan en el refrigerador hasta que se requieran.

### 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

Biotriptasa .....	16.6 g
Dextrosa .....	2.7 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.9 g
Agua destilada.....	1000 ml

Los ingredientes se mezclan en seco y se disuelven en el agua destilada. Se envasan 2.7 ml de medio en tubos con tapón de rosca y se esterilizan a 121 °C durante 15 min. Frío el medio, se les agrega a 0.3 ml de suero fetal de ternera adicionado con penicilina sódica y kanamicina a una concentración de 200 mg/ml. Se guardan los tubos en refrigeración.

# ANEXO B

## IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Tabla 15. Medidas morfométricas del quiste obtenidas de las AVL aisladas en los canales de riego de Mexicali, B.C.

Aislado	M.	Media	Mo.	Med.	DS	C.V.	Max.	Min.	n
<i>A. polyphaga</i>	1M1	13.41	14.1	14.1	1.50	11.18	16.4	11.1	50
<i>Vahlkampfia</i>	1M1	12.58	14.1	14.1	2.23	17.72	16.4	9.1	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	1M1	15.43	14.1	14.1	1.93	12.50	18.8	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	1M2	15.61	16.4	16.4	1.90	12.17	21.1	14.2	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M2	13.60	14.1	14.1	1.20	8.82	16.4	11.7	50
<i>A. castellanii</i>	1M3	14.71	14.2	14.2	1.40	9.51	18.9	11.9	50
<i>A. culbertsoni</i>	1M3	17.78	16.5	17.7	1.55	8.71	21.3	16.5	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M3	12.82	14.1	14.1	2.08	16.22	16.4	9.1	50
<i>A. polyphaga</i>	1M4	13.92	14.1	14.1	1.74	12.5	18.8	11.7	50
<i>A. griffini</i>	1M5	13.33	14.1	14.1	1.08	8.10	14.1	11.7	50
<i>A. castellanii</i>	1M6	14.72	14.1	14.1	1.88	12.77	18.8	11.7	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M6	13.06	14.1	14.1	1.41	10.79	14.1	9.4	50
<i>Saccamoeba</i> sp.	1M6	45.47	47	47	2.33	5.12	49.35	39.95	20
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	1M6	14.87	14.1	14.1	1.70	11.43	18.8	14.1	30
<i>A. castellanii</i>	1M7	15.01	16.4	16.4	1.58	10.52	16.4	11.7	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M7	11.47	14.1	14.1	2.49	21.70	16.4	9.4	30

“Detección de *Acanthamoeba* spp. en canales de riego de Mexicali, Baja California”

<i>Naegleria</i> sp.	1M7	12.75	14.1	14.1	1.53	12	14.1	9.4	50
<i>A. hatchetti</i>	1M9	12.50	14.1	14.1	2.02	16.16	16.4	9.4	50
<i>A. culbertsoni</i>	1M9	15.53	16.4	16.4	1.52	9.78	18.8	14.1	50
<i>A. polyphaga</i>	1M9	13.49	14.1	14.1	1.48	10.97	16.4	11.7	50
<i>Naegleria</i> sp.	1M9	11.74	14.1	12.9	2.15	18.31	14.1	9.1	24
<i>Echinamoeba</i> sp.	1M9	10.35	11.7	11.7	1.89	18.26	14.1	7.5	20
<i>A. culbertsoni</i>	1M12	16.42	16.4	16.4	1.76	10.71	19.9	14.1	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M12	13.34	14.1	14.1	1.24	9.29	16.4	11.7	30
<i>A. castellanii</i>	1M13	16.14	16.4	16.4	1.92	11.89	21.1	11.7	50
<i>A. culbetsoni</i>	1M14	16.05	16.4	16.4	1.43	8.90	18.8	14.1	50
<i>A. astronyxis</i>	1M14	18.98	21.1	18.8	2.11	11.11	21.1	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	1M14	14.20	14.1	14.1	1.96	13.80	18.8	11.7	50
<i>A. castellanii</i>	2M1	15.31	14.1	14.1	1.76	11.49	18.8	14.1	50
<i>Protacanthamoeba</i>	2M1	15.57	14.1	14.1	2.27	14.57	18.8	14.1	20
<i>A. castellanii</i>	2M2	14.71	14.1	14.1	1.06	7.20	16.4	14.1	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	2M2	12.87	11.7	12.9	1.43	11.11	16.4	11.7	20
<i>A. castellanii</i>	2M4	14.67	14.1	14.1	1.04	7.08	16.4	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	2M5	15.37	16.4	16.4	1.32	8.58	18.8	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	2M8	14.47	14.1	14.1	0.67	4.75	17.6	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	2M9	14.39	14.1	14.1	0.81	5.62	16.4	12.9	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	2M9	13.56	14.1	14.1	1.61	11.87	16.7	11.7	30
<i>A. castellanii</i>	2M10	14.80	14.1	14.1	1.10	7.43	16.4	14.1	50
<i>A. culbertsoni</i>	2M11	15.92	16.4	16.4	1.53	9.61	18.8	14.1	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	2M11	13.53	14.1	14.1	2.27	16.77	18.8	11.7	30
<i>A. griffini</i>	2M12	13.80	14.1	14.1	1.47	10.65	16.4	11.7	50
<i>A. castellanii</i>	2M13	14.32	14.1	14.1	1.12	7.82	16.4	11.7	50
<i>A. culbertsoni</i>	3M1	15.75	16.4	16.4	1.58	10.03	18.8	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	3M2	14.74	14.1	14.1	0.81	5.49	16.4	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	3M3	14.78	14.1	14.1	1.07	7.23	16.4	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	3M4	15.24	16.4	16.4	1.25	8.20	18.8	14.1	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	3M4	12.27	14.1	14.1	1.90	15.48	14.1	9.1	36
<i>A. culbetsonii</i>	3M5	16.09	15.2	15.2	1.31	8.14	18.8	15.2	50
<i>A. castellanii</i>	3M6	14.94	14.1	14.1	1.03	6.89	16.4	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	3M8	15.32	16.4	16.4	1.09	7.11	16.4	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	3M9	15.02	14.1	14.1	1.15	7.65	16.4	14.1	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	3M9	12.27	14.1	11.7	1.73	14.09	14.1	9.1	17
<i>A. castellanii</i>	3M10	14.67	14.1	14.1	0.98	6.68	16.4	14.1	50
<i>Rhizamoeba</i> sp.	3M10	26.70	23.5	23.5	6.11	22.88	37.6	23.5	11
<i>A. castellanii</i>	3M11	15.34	16.4	16.4	1.14	7.43	16.4	14.1	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	3M11	13.20	14.1	14.1	1.71	12.95	16.4	9.1	15
<i>A. castellanii</i>	3M12	15.30	16.4	16.4	1.12	7.32	16.4	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	3M13	14.93	14.1	14.1	1.13	7.56	16.4	14.1	50
<i>A. castellanii</i>	3M14	14.98	14.1	14.1	1.14	7.61	16.4	14.1	50

Tabla 16. Medidas morfométricas del trofozoito obtenidas de las AVL aisladas en los canales de riego de Mexicali, B.C.

Aislado	M.	Media	Mo.	Med.	DS	C.V.	Max.	Min	N
<i>A. polyphaga</i>	1M1	22.70	20.7	20.7	3.34	14.71	30.5	18.8	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M1	24.35	21.15	23.5	5.15	21.14	35.25	16.45	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	1M1	31.65	28.2	28.2	4.94	15.60	39.95	28.2	50
<i>A. castellanii</i>	1M2	30.85	32.9	32.9	6.15	19.96	40.1	18.8	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M2	32.45	35.15	35.15	3.18	9.79	37.6	28.2	50
<i>A. castellanii</i>	1M3	32.32	30.81	30.81	5.10	15.7	40.29	21.33	50
<i>A. culbetsoni</i>	1M3	24.21	30.81	26.07	4.68	19.33	30.81	18.8	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M3	23.85	21.15	21.15	4.41	18.49	30.55	18.2	50

"Detección de *Acanthamoeba* spp. en canales de riego de Mexicali, Baja California"

<i>Willertia</i> sp.	1M3	51.75	71.1	71.1	14.78	28.58	87.69	6.37	30
<i>Leptomyxa</i> sp.	1M3	91.68	98.06	92.43	6.50	7.08	98.06	71.1	21
<i>A. polyphaga</i>	1M4	21.58	20.7	20.7	3.40	15.75	32.9	18.8	50
<i>A. griffini</i>	1M5	20.17	21.15	21.15	1.62	8.03	23.5	16.45	50
<i>A. castellanii</i>	1M6	21.47	21.15	21.15	5.14	23.94	32.9	16.4	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M6	21.91	21.15	21.15	5.27	24.05	32.9	14.1	50
<i>Saccamoeba</i> sp.	1M6	83.69	72.85	90.5	9.23	11.02	94	72.85	15
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	1M6	25.86	32.9	32.9	8.80	34.02	39.95	14.1	20
<i>A. castellanii</i>	1M7	27.31	32.9	32.9	5.69	20.83	35.25	18.8	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M7	19.87	18.8	18.8	1.47	7.39	23.5	18.8	30
<i>Naegleria</i> sp.	1M7	13.80	14.1	14.1	1.91	13.84	16.45	9.4	50
<i>Thecamoeba</i>	1M8	88.80	89.3	89.3	5	5.63	96	79.9	10
<i>A. hatchetti</i>	1M9	19.61	21.15	21.15	2.61	13.30	23.5	14.1	50
<i>A. culbetsoni</i>	1M9	23.75	23.7	23.7	3.04	12.8	30.81	21.33	50
<i>A. polyphaga</i>	1M9	22.72	20.7	20.7	3.88	17.07	30.55	18.8	50
<i>Naegleria</i> sp.	1M9	15.19	16.45	16.45	1.42	9.34	16.45	11.7	21
<i>Echinamoeba</i> sp.	1M9	13.53	14.1	14.1	1.49	11.01	16.45	11.75	18
<i>A. culbetsoni</i>	1M12	24.96	26.07	26.07	3.22	12.90	30.81	18.8	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1M12	30.76	30.55	30.55	3.48	11.31	37.6	28.2	30
<i>A. castellanii</i>	1M13	23.98	21.15	21.15	6.06	25.27	32.9	18.8	50
<i>A. culbetsoni</i>	1M14	24.37	21.33	21.33	4.45	18.26	30.81	18.8	50
<i>A. astronyxis</i>	1M14	28.45	26.07	26.07	3.54	12.44	35.7	26.07	50
<i>A. castellanii</i>	1M14	33.92	30.81	33.18	3.80	11.20	40.29	30.81	50
<i>A. castellanii</i>	2M1	15.31	14.1	14.1	1.76	11.49	33.88	19.36	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	2M1	34.84	39.95	39.95	5.47	15.70	39.95	28.2	20
<i>A. castellanii</i>	2M2	14.30	14.1	14.1	0.69	4.82	16.4	14.1	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	2M2	37.24	35.25	36.42	3.09	8.29	42.3	32.9	20
<i>A. castellanii</i>	2M4	14.06	14.1	14.1	1.51	10.73	16.4	11.75	50
<i>A. castellanii</i>	2M5	24.52	23.5	23.5	3.17	12.92	30.5	21.15	50
<i>A. castellanii</i>	2M8	25.45	28.2	28.2	3.35	13.16	30.5	21.15	50
<i>A. castellanii</i>	2M9	24.61	21.15	23.5	3.67	14.91	30.5	21.15	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	2M9	35.31	35.25	35.25	3.32	9.40	42.3	32.25	26
<i>A. castellanii</i>	2M10	25.49	28.2	28.2	3.69	14.47	30.55	21.15	50
<i>A. culbetsoni</i>	2M11	34.21	37.6	32.9	4.09	11.95	42	25.8	50
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	2M11	35.67	32.9	36.42	5.59	15.67	47	23.5	18
<i>A. griffini</i>	2M12	20.79	21.15	21.15	2.10	10.10	28.8	18.8	50
<i>A. castellanii</i>	2M13	26.39	28.2	28.2	3.57	13.52	30.5	21.15	50
<i>A. culbetsoni</i>	3M1	34.18	30.55	32.9	5.18	15.15	44.55	30.55	50
<i>A. castellanii</i>	2M2	28.70	30.5	30.5	3.79	13.20	42.3	21.15	50
<i>A. castellanii</i>	3M3	26.76	30.5	28.2	3.85	14.38	30.5	21.15	50
<i>A. castellanii</i>	3M4	27.82	28.2	28.2	4.78	17.18	42.3	21.15	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	3M4	24.85	21.15	28.2	4.29	17.26	30.81	21.15	50
<i>A. castellanii</i>	3M6	27.77	32.9	32.9	7.29	26.25	39.95	18.8	50
<i>A. castellanii</i>	3M8	31.17	32.9	32.9	6.29	20.17	39.95	18.8	50
<i>A. castellanii</i>	3M9	27.01	32.9	32.9	6.88	25.47	39.95	18.2	50
<i>Vahlkampfia</i> sp.	3M9	21.93	21.15	22.32	3.41	15.54	28.2	14.1	14
<i>A. castellanii</i>	3M10	28.44	30.5	30.5	5.83	20.49	42.3	21.15	50
<i>Thecamoeba</i> sp.	3M10	95.21	96.35	96.35	2.56	2.68	101.5	89	15
<i>Rhizamoeba</i> sp.	3M10	71.45	72.85	72.85	3.03	4.24	77.55	68.15	11
<i>A. castellanii</i>	3M11	31.69	32.9	32.9	5.72	18.04	39.95	18.8	50
<i>Thecamoeba</i> sp.	3M11	92.53	91.65	91.65	4.61	4.98	101.5	86.95	7
<i>Protacanthamoeba</i> sp.	3M11	39.96	42.3	42.3	3.89	9.73	42.3	28.2	15
<i>A. castellanii</i>	3M12	31.40	30.5	30.5	3.20	10.19	37.6	26.85	50
<i>A. castellanii</i>	3M13	33.05	32.9	32.9	3.40	10.28	37.6	25.85	50
<i>A. castellanii</i>	3M14	33.27	30.5	32.9	4.54	13.64	44.65	25.85	50

## ANEXO C

### COEFICIENTE DE CORRELACIÓN

El coeficiente de correlación  $r$  puede calcularse usando la siguiente formula:

$$r = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \cdot \sum y}{\sqrt{\{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2\} \{n \cdot \sum y^2 - (\sum y)^2\}}}$$

Canal	Temp. del agua	Aisl. de <i>Acanthamoeba</i>
1	12.1	1
2	17	1
3	18.4	2
4	18.1	1
5	21.6	1
6	19.4	1
7	18.1	1
8	17.4	0
9	19.3	3
10	19.3	0
11	20.4	0
12	19.5	1
13	22.4	1
14	20.9	3

Coef. corr. = 0.1304

Tabla 17. Coeficiente de correlación de la temperatura del agua y aislados de *Acanthamoeba* para el 1er. muestreo.

Canal	Temp. del agua	Aisl. de <i>Acanthamoeba</i>
1	27.5	1
2	28	1
3	29.5	0
4	31.2	1
5	30.2	1
6	29.3	0
7	29.2	0
8	28	1
9	29.3	1
10	29.8	1
11	31	1
12	29.5	1
13	28.6	1
14	25.8	0

Coef. corr. = 0.2838

Tabla 18. Coeficiente de correlación de la temperatura del agua y aislados de *Acanthamoeba* para el 2do. muestreo.

Canal	Temp. del agua	Aisl. de <i>Acanthamoeba</i>
1	20.1	1
2	20.5	1
3	21.7	1
4	25.6	1
5	27.1	1
6	21	1
7	27.2	0
8	23.8	1
9	18.7	1
10	23.2	1
11	25.7	1
12	25.9	1
13	28.1	1
14	24.8	1

Coef. corr. = -0.3256

Tabla 19. Coeficiente de correlación de la temperatura del agua y aislados de *Acanthamoeba* para el 3er. muestreo.

Canal	pH	Aisl. de <i>Acanthamoeba</i>
1	8.3	1
2	7.7	1
3	7.8	2
4	6.9	1
5	7.8	1
6	7.3	1
7	7.8	1
8	8.1	0
9	8.2	3
10	8.1	0
11	8	0
12	8.4	1
13	8.3	1
14	8.3	3

Coef. corr. = 0.1422

Tabla 20. Coeficiente de correlación de pH y aislados de *Acanthamoeba* para el 1er. muestreo.

Canal	PH	Aisl. de <i>Acanthamoeba</i>
1	8.1	1
2	8	1
3	7.9	0
4	7	1
5	7.6	1
6	8.2	0
7	7.8	0
8	7.4	1
9	6.4	1
10	6.4	1
11	6.5	1
12	6.5	1
13	6.3	1
14	6	0

Coef. corr. = -0.2716

Tabla 21. Coeficiente de correlación de pH y aislados de *Acanthamoeba* para el 2do. muestreo.

<b>Canal</b>	<b>pH</b>	<b>Aisl. de <i>Acanthamoeba</i></b>
1	7.3	1
2	7.7	1
3	8.3	1
4	8.1	1
5	7.6	1
6	8	1
7	7.3	0
8	6.5	1
9	6.8	1
10	6.9	1
11	7.2	1
12	6.8	1
13	7.2	1
14	7.1	1

Coef. corr. = 0.0230

Tabla 22. Coeficiente de correlación de pH y aislados de *Acanthamoeba* para el 3er. muestreo.

<b>Canal</b>	<b>Oxígeno disuelto</b>	<b>Aisl. de <i>Acanthamoeba</i></b>
1	6.4	1
2	7.9	1
3	9.5	2
4	3.9	1
5	6.2	1
6	5.6	1
7	5.9	1
8	6.7	0
9	9.6	3
10	9.2	0
11	9.7	0
12	12.8	1
13	7.9	1
14	11.5	3

Coef. corr. = 0.3728

Tabla 23. Coeficiente de correlación de Oxígeno disuelto y aislados de *Acanthamoeba* para el 1er. muestreo.

Canal	Oxígeno disuelto	Aisl. de <i>Acanthamoeba</i>
1	9	1
2	8.3	1
3	10.3	0
4	6.7	1
5	6.6	1
6	13.8	0
7	7.6	0
8	7.4	1
9	6.7	1
10	6.4	1
11	9.3	1
12	9.3	1
13	8.2	1
14	6	0

Coef. corr. = -0.3728

Tabla 24. Coeficiente de correlación de oxígeno disuelto y aislados de *Acanthamoeba* para el 2do. muestreo.

Canal	Oxígeno disuelto	Aisl. de <i>Acanthamoeba</i>
1	9.2	1
2	8.8	1
3	9.1	1
4	5.3	1
5	5.2	1
6	7.8	1
7	5.8	0
8	7.1	1
9	5.2	1
10	7.8	1
11	9.9	1
12	12.2	1
13	9.3	1
14	7.5	1

Coef. corr. = 0.0230

Tabla 25. Coeficiente de correlación de oxígeno disuelto y aislados de *Acanthamoeba* para el 3er. muestreo.