

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“AISLAMIENTO DE *Naegleria fowleri* DE UN BALNEARIO TERMAL
ALIMENTADO POR EL AGUA DE UN GÉISER EN EL
ESTADO DE HIDALGO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A:

KARELIA LILIANA RANGEL RUIZ

DIRECTOR DE TESIS: BIÓL. ARTURO CALDERÓN VEGA





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

**“Pienso que sentarnos a ver cómo
actúa la mano del destino sin
tratar de influir en él no es
la manera en que el hombre
está destinado a actuar”**

John Glenn

Agradecimientos

Al Biol. Arturo Calderón, Director de esta Tesis, por haberme ayudado a realizar una de mis mayores metas, por todo el tiempo y apoyo que me dedico y la paciencia que siempre tuvo conmigo, gracias por confiar en mí.

A la Dra. Elvia Gallegos, por toda la ayuda y el apoyo moral que me otorgo, por la confianza que siempre me hizo sentir y por compartir conmigo todos sus conocimientos y sus sabios consejos.

A mis revisores de tesis, por sus sugerencias y observaciones acerca de este trabajo, gracias por su ayuda y dedicación:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras
M. en C. María de los Angeles Sanabria Espinosa
M. en C. Laura Peralta Soriano

Al Dr. Alfonso Lugo y la Dra. María del Rosario Sánchez, por la asesoría que me brindaron en la realización de esta tesis y por la paciencia y atenciones que siempre tuvieron conmigo, mi más sincero agradecimiento.

Dedicatoria

A mi mamá, María del Carmen Ruiz Contreras, por ayudarme y darme su cariño, por su apoyo incondicional y la fe que siempre ha tenido en mí, por no dejarme desfallecer y escucharme siempre. Por enseñarme a amar a la naturaleza.

A mis hermanas, Laura y Katia, porque son mi mayor motivación y el motor de mi existencia. Por ser mis cómplices, mis confidentes y por que sé que entre nosotras hay una conexión que nos permite ir más allá de la solidaridad.

A mi papá, Armando Rangel, por ayudarme a cumplir esta meta y apoyarme en todos los proyectos que he decidido emprender por muy descabellados que parezcan. Por contagiarme las ganas de desentrañar los misterios del universo.

A mis abuelitas Juanita y Rafaela, por haberme enseñado a ser fuerte y valiente, a no dejarme vencer ante la adversidad y siempre serle fiel a mis ideales.

A toda mi familia, por el cariño, comprensión y apoyo que siempre me han demostrado.

A Lucía Jiménez, porque ser como una segunda madre para mí, por haberme incluido en su vida y enseñarme a ser una persona perseverante.

A mis amigos Karina Melo, Norma Beltrán, Paulina Romero, Claudia Gómez, Melisa Rito, Claudia Urbina, Carlos Chávez, Lorena Sánchez, Diana Gutiérrez, Margarita Zermeño, Luis Aragón, Ramón Rivero, Israel Nieves, y Juan Carlos Pérez por haber compartido conmigo tantas experiencias, por alimentar mi alma y apoyarme incondicionalmente en todas mis locuras aunque expusieran su integridad física ó emocional, muchísimas gracias por compartir nuestras vidas.

A la UNAM, a la FES Iztacala y a la Biología, por abrirme sus puertas y permitirme crecer como profesional y como persona, es un orgullo para mí tener sangre azul y piel dorada.

A Dios y al destino, por permitirme andar en este camino.

CONTENIDO

I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. <i>Naegleria</i> spp	3
2. <i>Naegleria fowleri</i>	4
2.1 TAXONOMÍA	5
2.2 CICLO DE VIDA	5
2.3 MORFOLOGÍA	6
A. Trofozoíto	6
B. Quiste	7
C. Forma Ameboflagelar	7
3. ECOLOGÍA	8
4. MENINGO ENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA	10
5. TRATAMIENTO	11
6. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD	11
6.1 PATOGENICIDAD	11
6.2 ADHESIÓN (“BESO DE LA MUERTE”)	12
6.3 MECANISMOS	12
A. Mecánico: Trogocitosis	12
B. Químico	12
I) Formación y liberación de cuerpos densos	12
II) Enzimas líticas	13
C. Tóxicas: Lisis dependiente de contacto	13
D. Material Citopatógeno de <i>Naegleria</i>	14
6.4 OTROS MECANISMOS	14
III. ANTECEDENTES	15
1. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS	18
1. GENERAL	18
2. PARTICULARES	18
V. ÁREA DE ESTUDIO	19
1. TECOZAUTLA, HIDALGO	19
2. BALNEARIO “EL GÉISER”	20
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	21
1. RECOLECTA	21
2. REGISTRO “ <i>IN SITU</i> ”	21
2.1 PARÁMETROS AMBIENTALES Y FÍSICOQUÍMICOS	22
A. Temperatura del agua	22
B. Temperatura atmosférica	22
C. Porcentaje de saturación de Oxígeno disuelto (OD)	22
D. pH	22
E. Conductividad	22
2.2 ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS	23
3. AISLAMIENTO DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE	23
3.1 CLONACIÓN	23
4. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	24
4.1 MEDICIONES DE QUISTES Y TROFOZOÍTOS	24
4.2 PRUEBAS DE TEMPERATURA	24

5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	25
5.1 COSECHA DE CÉLULAS Y EXTRACCIÓN DE ADN	25
5.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA	25
5.3 ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA	27
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
1. AISLADOS AMEBIANOS	29
2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	30
2.1 MEDICIÓN DE QUISTES Y TROFOZOÍTOS	33
2.2 PRUEBAS DE TEMPERATURA IDENTIFICADOS COMO <i>N. fowleri</i> , <i>N. gruberi</i> y <i>Naegleria spp</i>	34
3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS	35
3.1 TEMPERATURA DEL AGUA	35
3.2 TEMPERATURA ATMOSFÉRICA	36
3.3 pH	37
3.4 CONDUCTIVIDAD ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)	38
3.5 PORCENTAJE DE SATURACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO (% OD)	40
4. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS	41
4.1 COLIFORMES TOTALES	41
4.2 BACTERIAS TOTALES	42
5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	44
5.1 IDENTIFICACIÓN DE <i>Naegleria fowleri</i> POR PCR	44
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	47
VIII. CONCLUSIONES	50
IX. LITERATURA CITADA	51
X. ANEXOS	
ANEXO 1: Mediciones de los quistes y trofozoítos	58
ANEXO 2: Recetas para preparar diferentes reactivos utilizados en este trabajo	60
ANEXO 3: Aislados identificados	62
ANEXO 4: Datos de los parámetros	63

I. RESUMEN

Naegleria fowleri es considerada la ameba de vida libre más patógena actualmente conocida, por producir la enfermedad llamada Meningoencefalitis Amebiana Primaria, que por lo general, trae consecuencias fatales para quien la adquiere. A esta ameba se le encuentra con mayor frecuencia en cuerpos de agua que presentan temperaturas que sobrepasan los 37° C, ya que es termófila, factor que la favorece para poder infectar al humano. Presenta tres estadios morfológicos: quiste, trofozoíto y ameboflagelado. Por no ser considerado un parásito estricto, se le ha clasificado como un organismo anfizóico, es decir, tiene la capacidad de vivir en vida libre así como en forma de parásito. El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar amebas termotolerantes patógenas de la especie *Naegleria fowleri* a partir del agua de piscinas de un balneario de aguas termales en el estado de Hidalgo. El área de estudio fue el balneario llamado "El Géiser" que se encuentra en el municipio de Tecozautla, Hidalgo. Se midieron los siguientes parámetros *in situ*: temperatura del agua, temperatura atmosférica, pH, conductividad, porcentaje de saturación de oxígeno disuelto, número de coliformes totales y bacterias totales, además se colectaron muestras de las diferentes piscinas que se ubican dentro del balneario. De las muestras tomadas se efectuaron los aislamientos y las identificaciones morfológicas mediante microscopía, la cual se corroboró mediante una identificación molecular compuesta por una extracción de ADN, un PCR anidado y una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, de igual forma, se llevó a cabo un análisis de Coeficiente de Correlación por Jerarquías de Spearman, entre los parámetros tomados y la presencia ó ausencia de *N. fowleri* en cada una de los muestreos. En cuanto a los parámetros fisicoquímicos, el ámbito en que se encontraron las diferentes temperaturas del agua oscilaba entre 57.1 y 33.4°C.; respecto a la temperatura atmosférica la más alta encontrada fue de 33.9° C y la más baja de 21.4° C; el pH varió entre los 9.3 y 10; los valores de conductividad se presentaron entre los 3550 y 1897 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$; el porcentaje de saturación de oxígeno fluctuó entre 50 y 60%. El número de coliformes totales no sobrepasó las 5,000 UFC/100 ml y las bacterias totales fueron de más de 300,000 UFC/ml. Se tomaron 69 muestras, de las cuales se obtuvieron 82 aislados identificados, entre los que destaca el género *Naegleria*, el cual fue el más frecuentemente aislado (41%) con 24 aislados identificados de los cuales 7 se ubicaron como *Naegleria* spp., 4 como *N. gruberi* y 13 como *N. fowleri*. Estos 24 aislados, se sometieron a las pruebas moleculares, de los cuales, solo 5 aislados resultaron negativos, de manera que 19 aislados resultaron como positivos para *N. fowleri*, en comparación con los encontrados mediante microscopía. Solo en el muestreo II se encontró una correlación significativa entre los valores de los datos fisicoquímicos, bacteriológicos ó ambientales, y la presencia ó ausencia de *N. fowleri*. Por lo cual se concluye que *N. fowleri* se encuentra presente, en todas las albercas de este balneario, lo cual podría traer graves consecuencias a la salud de los bañistas que acuden a este centro recreativo, se recomienda implementar un sistema de desinfección del agua, para evitar futuros problemas en el parque acuático El Géiser.

II. INTRODUCCIÓN

Entre los protozoarios, se encuentra un grupo de organismos llamado “Amebas de Vida Libre (AVL)” que tiene importancia médica y ecológica (Gallegos, 1997), su principal característica es que puede subsistir y reproducirse en el ambiente, sin necesidad de un hospedero estricto como en el caso de *Entamoeba histolytica*.

Las AVL se pueden hallar en ambientes con temperaturas que varían entre los 4 y los 37° C, sin embargo, hay algunas que tienen la característica de soportar temperaturas de hasta 45° C, estas amebas son llamadas termófilas, y entre ellas destaca *Naegleria fowleri*, catalogada como la más patógena (Marciano-Cabral, 1988; Schuster y Visvesvara, 2004a). En general, las especies de amebas patógenas toleran temperaturas mayores a 40° C, sin embargo, no todas las amebas termófilas son patógenas (Gallegos, 1997; De Jonckheere, 2002).

Las AVL, se encuentran distribuidas alrededor de todo el mundo y se les localiza en todos los ambientes, terrestre, aéreo y acuático, en este último pueden ser localizadas desde el mar hasta en pequeñas charcas (Martínez y Janitschke, 1985), pero principalmente en las interfaces: agua-suelo, agua plantas, agua-aire, etc. (Rodríguez-Zaragoza, 1994), en donde juegan un papel importante dentro del control poblacional de las bacterias.

Las fuentes de alimentación para estos organismos son bacterias, hongos, levaduras y algas, de los cuales se alimentan mediante fagocitosis (engullendo células enteras), ya que dependen de compuestos específicos, encontrados en sus presas, para obtener una dieta balanceada en aminoácidos y otras sustancias, aunque usualmente tienen dietas muy flexibles (Marciano-Cabral, 1988).

En los ambientes acuáticos, las AVL viven sobre la superficie del agua en forma libre y flotando ó bien, adheridas a partículas de materia flotante, sin embargo, la mayor abundancia de microorganismos amebianos se encuentra en el sedimento. En la columna de agua las amebas pueden estar en una menor proporción que puede variar dependiendo de la cantidad de alimento que se encuentre en suspensión, esto se debe a que las AVL no son organismos libre nadadores, a excepción de los ameboflagelados, y necesitan de una superficie para completar su ciclo de vida. La diversidad de amebas decrece cuando el agua contiene sustancias tóxicas o el oxígeno disuelto es casi nulo pues son organismos aerobios (Kyle y Pittman, 1985).

Estudios previos han demostrado que cuando las concentraciones de bacterias son altas en la columna de agua, la presencia de amebas se incrementa de manera directamente proporcional (Kyle y Pittman, 1986), además de que las AVL son los únicos microorganismos que pueden crecer lo suficientemente rápido para causar una disminución en la población bacteriana (Clarholm, 2002). Kyle y Pittman (1987) en un estudio realizado sobre la distribución estacional de AVL en un estanque, encontraron que la supervivencia en la columna de agua dependía de la presencia del alga verde azul *Oscillatoria* como fuente de alimento. Las condiciones que determinan la presencia o ausencia de AVL en el medio acuático son pH, que puede oscilar entre 4.5 a 9.5, temperatura, osmolaridad, calidad microbiológica, conductividad y salinidad (Sykora *et al.*, 1983).

Respecto al ambiente edáfico, las AVL participan en el incremento de la tasa de transformación del fósforo a formas aprovechables para las plantas (Fenchel, 1987). En este ambiente la supervivencia de las amebas depende de varios factores, como la acidez o alcalinidad del suelo, la concentración de sales, la porosidad del suelo, la cantidad de agua y las fluctuaciones temporales de la humedad (Clarholm, 2002).

Las AVL han desarrollado una estrategia para soportar los cambios desfavorables en el medio: el enquistamiento, en la mayoría de las AVL les permite sobrevivir a las variaciones ambientales adversas (Bottone, 1993), así como asegurar su viabilidad durante las sequías, cambios de pH, falta casi total de oxígeno y escasez del alimento, además en algunos casos les permite su desplazamiento a través de corrientes de aire (Gallegos, 1997).

Dentro de este grupo se ha encontrado un reducido número de especies que tienen la capacidad de invadir animales, produciéndoles infecciones severas en la piel, los ojos y de manera muy importante en el sistema nervioso central (SNC), junto con *Acanthamoeba* y *Naegleria*, otros géneros de amebas de vida libre han sido relacionados con enfermedades en invertebrados, tales como: *Hartmannella*, *Paramoeba*, *Vexillifera* y *Nuclearia* (Visvesvara y Sther, 1990), mientras que *Acanthamoeba* spp, *Naegleria fowleri*, *Sappinia diploida* y *Balamuthia mandrillaris* se han encontrado con capacidad para infectar a humanos (Schuster y Visvesvara, 2004a). Estas especies amebianas merecen especial atención dentro del grupo de las amebas de vida libre dado que son causantes de algunas enfermedades del sistema nervioso central de los humanos como encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) (Shin e Im, 2004)

Se ha visto que algunas cepas colonizan drenajes, la pared y el techo de baños y las regaderas, aunque hasta el momento no se ha encontrado evidencia de que exista una correlación entre su presencia y una posible epidemia, sin embargo, desde el punto de vista higiénico, una infección puede ser posible por inhalación de agua aerolizada ó aire acondicionado contaminado con amebas (Rohr *et al.*, 1998).

1. *Naegleria*

El género *Naegleria* fue descrito en 1912 por Alexeieff, y hasta hace unas décadas cobró importancia, especialmente en biomedicina, debido a que una de las especies, *Naegleria fowleri*, causaba una infección mortal capaz de invadir totalmente el cerebro hasta destruirlo, esta infección es conocida como meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) y se han presentado casos en todo el mundo, desde Japón (Hara y Fukuma, 2005) hasta México (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005), sin que hasta el momento se haya encontrado un tratamiento efectivo (De Jonckheere, 2002).

Las amebas del género *Naegleria* presentan un trofozoíto en forma limax, que mide entre 15-28 μm de largo. Durante este estado morfológico pueden alimentarse, de bacterias, algas, hongos, levaduras, entre otras (Kyle y Noblet, 1987), siempre y cuando se encuentren adheridas a una superficie. Sí las condiciones ambientales son las adecuadas para la supervivencia de las poblaciones de *Naegleria*, estas amebas pueden llegar a reproducirse, en caso contrario tiene dos caminos: la formación de ameboflagelados, esta fase temporal es aparente cuando las amebas son puestas en contacto con agua destilada a 37° C después de 60 ó 90 minutos, en esta etapa se forma en uno de los extremos del trofozoíto de *Naegleria* de 1 a 2 flagelos acelerando

de esta manera el desplazamiento de la ameba por el movimiento flagelar (Gallegos, 1997), estos flagelos son utilizados para colonizar nuevos hábitat, donde se encuentren las condiciones más adecuadas para su establecimiento, en esta fase no pueden alimentarse, ni reproducirse (Page, 1988). El otro camino es la formación de estructuras de resistencia llamadas quistes.

El quiste de las AVL tiene forma esférica y varía de tamaño entre los 7 a 12 μm de ancho, cuando se les observa al microscopio de contraste de fases es visible una doble pared (Schuster y Visvesvara, 2004b) con uno o varios poros sobre la pared del quiste, los cuales son más conspicuos en quistes vacíos que en quistes maduros o prequistes, La pared interna llamada endoquiste es poco evidente, mientras que la pared externa llamada exoquiste es la más notoria y puede variar en la forma y textura dependiendo de la especie de *Naegleria*, de la que se trate (Page, 1988), esta etapa morfológica es transitoria y en cuando las amebas se encuentran en ella no pueden reproducirse ni alimentarse.

Las especies de este género se reproducen mediante fisión, pero, presentan un tipo de mitosis muy singular, llamada promitosis la cual tiene la particularidad de que el núcleo y la membrana nuclear persisten durante la división nuclear (cariocinesis). Esto es debido a que el núcleo se alarga formando una estructura con forma de reloj de arena y se divide en dos masas polares ó nucleolos, de manera que durante este proceso la membrana nuclear permanece intacta (Page, 1988).

Algunas especies del género, son termotolerantes y pueden ser encontradas en cuerpos de agua que hayan sido calentados de manera natural (Kyle y Noblet, 1986, 1987) ó artificial, como en las aguas utilizadas por los reactores nucleares (Huizinga *et al.*, 1990), en "spas", etc. Casi cualquier cuerpo de agua caliente puede albergar organismos de este género (Sheehan *et al.* 2003), sin embargo, un grupo de investigación del State Water Laboratory de Australia del Sur ha obtenido aislados de *Naegleria* de la Antártica (De Jonckheere, 2002).

Los organismos pertenecientes al género *Naegleria*, son muy resistentes a las condiciones adversas en el ambiente, en un estudio realizado por Kyle y Noblet (1987), se encontró una mayor presencia de *Naegleria* durante el mes de agosto, el hecho de que estas amebas aparezcan a finales del verano, es un indicativo de que resisten la anoxia y un ambiente altamente reducido.

2. *Naegleria fowleri*

Naegleria fowleri, pertenece a la familia Vahlkampfiidae, que cuenta con tres estadios morfológicos, trofozoíto, quiste y ameboflagelado, en vida libre se le puede hallar en cuerpos de agua que sobrepasan los 37° C de temperatura, en estos lugares se alimenta de las poblaciones de bacterias, un aspecto interesante es que debido a su capacidad de tolerar temperaturas de más de 37° C, puede llegar a parasitar al humano causándole una enfermedad conocida como Meningo Encefalitis Amebiana Primaria (MEAP), la cual generalmente trae consecuencias fatales para quien la adquiere.

2.1 TAXONOMIA

Anteriormente la clasificación de los organismos se basaba en la morfología, en las semejanzas y diferencias físicas entre los organismos, sin embargo, con los recientes avances en Biología Molecular, se han empezado a utilizar pruebas moleculares que relacionan y comparan los ácidos nucleicos de las diferentes especies para lograr así, una clasificación de una forma más precisa.

Adl y colaboradores (2005) propusieron una nueva clasificación para los eucariontes, haciendo especial énfasis en la taxonomía de los protozoarios, basada en la filogenia molecular. Tomando como base a esta clasificación, *N. fowleri*, se encuentra dentro del super grupo Excavata, junto a los oximonadas, los parabasalidos, diplomonados, jacobinos y varios otros géneros de flagelados heterótrofos incluyendo a los Euglenidos, debido a que todos ellos comparten la característica de tener un citostoma como estructura de alimentación, en *N. fowleri*, es el llamado amebostoma, en algunos otros grupos se ha perdido, y solo quedan sus vestigios.

N. fowleri, esta ubicada, dentro del primer subgrupo Heterolobosea (Cuadro 1), el cual se distingue por ser amebas heterotróficas con pseudópodos eruptivos, algunos con formas flageladas, usualmente con 2 ó 4 flagelos. Finalmente el segundo subgrupo al que pertenece es Vahlkampfiidae, su principal característica es que su nucleolo persiste a través de la mitosis.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Naegleria fowleri*, según Adl y colaboradores (2005)

POSICIÓN TAXONÓMICA	NOMBRE
SUPER GRUPO	EXCAVATA Cavalier-Smith, 2002, emend. Simpson, 2003
-PRIMER SUBGRUPO	Heterolobosea Page y Blanton, 1985
-SEGUNDO SUBGRUPO	Vahlkampfiidae Jollos, 1917
▪ GÉNERO	<i>Naegleria</i> Alexeieff, 1912; emend. Calkins, 1913
▪ ESPECIE	<i>Naegleria fowleri</i> Carter, 1970

2.2 CICLO DE VIDA

El ciclo de vida de *N. fowleri*, se puede dividir en 2 etapas: vida libre y parásito. De su ciclo de vida en estado libre se sabe muy poco; se conoce que tiene tres estadios morfológicos: ameba, flagelado y quiste (figura 1), que son reversibles dependiendo de las condiciones ambientales en las que se encuentre el organismo. El estadio mediante el cual se alimenta es el de trofozoíto, en esta etapa, *N. fowleri* se fija a un sustrato y puede utilizar su amebostoma (citostoma) ó la fagocitosis (Marciano-Cabral, 1988), para alimentarse de poblaciones de microorganismos que encuentre en su hábitat, su principal fuente de alimento son las bacterias, se cree que esta ameba puede estar relacionada con la regulación de las poblaciones bacterianas (Clarholm, 2002), posteriormente, cuando las condiciones son adversas, puede optar por dos opciones: la primera, es transformarse en flagelado para emigrar y buscar otros lugares donde las condiciones sean mejores para su desarrollo (Griffin, 1983), sí lo encuentra se establece y se revierte a su estado trófico, si no es el caso, se cambia a quiste (previa reversión a estado trófico), y quedar en estado de latencia hasta que las condiciones mejoren.

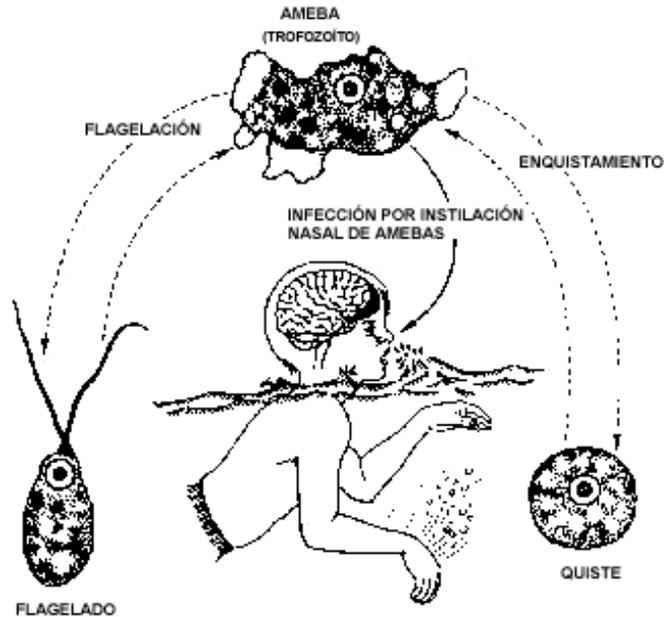


Figura 1. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*, se pueden observar las dos etapas: Infecciosa y en vida libre (John, 1993).

Como patógeno se sabe que la forma invasiva es el trofozoíto y la infección es adquirida por la instilación intranasal de la ameba (figura 1), que invade la mucosa nasal y migra a través del nervio olfatorio hasta el bulbo olfatorio (John, 1993). El contacto se da principalmente en nadadores y otras personas que realizan actividades acuáticas, la vía de entrada es a través de la nariz, debido al fácil acceso (Gallegos, 1997). En experimentos “*in vivo*” después de 24h, en ratones a los cuales se les inóculo *N. fowleri*, las amebas penetraron a través del epitelio olfatorio, y posteriormente se ubicaron en el Lumen de la cavidad nasal, para desplazarse, después, a través del nervio olfatorio hasta la placa cribosa. Pasadas 96 horas las amebas empiezan a reproducirse dentro del cerebro de su hospedero (Rojas *et al.*, 2004). Debido a su proximidad con el punto de entrada, los lóbulos frontal y olfatorio son los blancos iniciales de destrucción de la ameba (Schuster y Visvesvara, 2004b).

2.3 MORFOLOGIA

Como se ha descrito anteriormente, existen en *N. fowleri*, tres fases morfológicas, trofozoíto, flagelado y quiste. Estas fases son empleadas para poder identificar morfológicamente a esta especie.

A. Trofozoíto

Según Smirnov y Goodkov (1999), *Naegleria fowleri*, se ubicaría en el tipo Monotáctico, los organismos establecidos dentro de este grupo se describen como monopodiales, por su cuerpo subcilíndrico con una sección circular cruzada, sin surcos laterales y sin un uroide adhesivo, otras amebas pertenecientes a este morfotipos son *Trichamoeba sinuosa*, *Hydramoeba hydroxena*, *Saccamoeba limax*, entre otras.

Los trofozoítos de *N. fowleri*, son alargados y cuando se encuentran en movimiento miden entre 15 y 30 μm de largo; inactivos, se redondean y miden de 9 a 15 μm de

diámetro (John, 1993). En la parte terminal cuenta con un amebostoma, que es una estructura de alimentación (Marciano-Cabral *et al.*, 1990), no aglutina con concanavalina A (Page, 1988). Los trofozoítos son sensibles a la desecación y a temperaturas menores de 4° C. Pueden crecer bien a temperaturas de entre 42 y 45° C, con una cantidad considerable de materia orgánica y con concentraciones bajas o nulas de cloro libre residual en el ambiente (Marshall *et al.*, 1997)

La forma invasiva para el ser humano y otros animales es el trofozoíto que se alimenta con voracidad debido a su composición enzimática y producción de toxinas lo que favorecen la digestión y destrucción sobre todo del tejido nervioso, a 37° C tienen una locomoción rápida (Bottone, 1993).

B. Quiste

Naegleria fowleri se enquistas cuando las condiciones ambientales no son las adecuadas para su crecimiento (John, 1993), a través de una serie de complejos eventos bioquímicos (Bottone, 1993). Las bajas temperaturas tienen un efecto especialmente negativo en los quistes, cuando se les somete a temperaturas por debajo del congelamiento, su tiempo de supervivencia se acorta, Biddick y colaboradores (1984) realizaron un estudio en donde se comparaba la viabilidad de los quistes de *N. gruberi* y *N. fowleri*, a diferentes temperaturas, se reportó que a temperaturas por debajo del punto de congelación del agua, la supervivencia de *N. gruberi* fue de 3.5 a 4 meses, mientras que la de *N. fowleri* fue de 1 a 1.5 horas.

Los quistes de *N. fowleri*, son esféricos y miden entre 7 y 15 μm (John, 1993), presenta una doble pared notablemente delgada, la pared interna, endoquiste, es muy delgada y por lo tanto poco evidente, mientras que la pared externa, exoquiste, es lisa, refractante (Marshall *et al.*, 1997) y presenta múltiples poros u ostiolas, que forman un collar (Page, 1988; Schuster y Visvesvara, 2004b) por los que la ameba puede exquistar, (Rodríguez-Zaragoza, 1994), se vuelven no viables cuando se desecan y sus proteínas se desnaturalizan (Biddick *et al.*, 1984). Cuando las amebas son mantenidas en cultivo axénico empiezan a producir cada vez menos quistes hasta que la formación de estos desaparece (John, 1993).

C. Forma ameboflagelar

Cuando los trofozoítos de *N. fowleri* son puestos en agua destilada ó algún amortiguador, se transforman a un estado transitorio de flagelado, adquiriendo forma de pera y le brotan dos flagelos terminales con tamaños que varían entre los 10 y 20 μm , la ameba no se alimenta en este estadio (Hara y Fukuma, 2005); se cree que en vida libre este estado le es útil a la ameba cuando hay condiciones adversas para su supervivencia por lo cual se transforma y emigra a otros lugares, (Schuster y Visvesvara, 2004a) mediante las corrientes de agua, donde las condiciones sean más apropiadas para después de un tiempo regresar a su estado ameboideo (John, 1993). La transformación de estado trofozoíto a ameboflagelado tarda entre 30 a 60 minutos (De Jonckheere *et al.*, 2001).

Aunque para *N. fowleri* la formación de flagelos es una constante, algunas cepas que fueron colectadas en una localidad de Francia no formaron flagelos bajo las condiciones normales de laboratorio, para corroborar que correspondieran a la especie, los investigadores, llevaron a cabo una comparación de la secuencia de su ADNr,

encontrando que los aislados franceses corresponden al tipo de *N. fowleri* que se encuentran en Europa y EUA, por lo que postularon que no todas las especies del género *Naegleria* pueden ser inducidas para transformarse en flagelados (De Jonckheere *et al.*, 2001).

Existe una hipótesis llamada “hipótesis del nicho vacío del flagelado” y sugiere que una probable interacción competitiva en ciertos ambientes le confiere temporalmente una ventaja a los amebo-flagelados; la intervención humana y/o los eventos naturales eliminan a los competidores y la habilidad de formar en flagelos le confiere a ciertos organismos, como *N. fowleri*, una ventaja en la recolonización (Griffin, 1983).

Sí tomamos en cuenta que actualmente las condiciones ambientales contribuyen para aumentar la temperatura de ríos, lagos y algunos otros cuerpos de agua, y que, de acuerdo con los pronósticos del grupo de asesores científicos de las Naciones Unidas quienes aseguran que la temperatura global subirá entre 0.8° y 3.5° C para el año 2100, es factible que dadas estas condiciones los nichos que podría ocupar *N. fowleri* aumentarán y que esto favorecerá la proliferación de esta ameba, lo cual podría crear el riesgo de una epidemia de MEAP a nivel mundial (Cogo *et al.*, 2004).

3. ECOLOGÍA

Naegleria fowleri es considerada como cosmopolita y su distribución no está restringida a ningún tipo de desecho industrial ó contaminación química (De Jonckheere y Van de Voorde, 1977), es termófila, lo cual es aprovechado para realizar una prueba de aislamiento donde las muestras de agua se incuban a 42 y 45° C, evitando el crecimiento de otras amebas no termófilas (Griffin, 1983). Son aerobios estrictos aunque pueden tolerar condiciones anaeróbicas por poco tiempo (Schuster y Visvesvara, 2004a).

A *N. fowleri* generalmente se le aísla, en convivencia con *N. lovaniensis*, quien es, también, una ameba termofílica, aunque es más abundante en la naturaleza y hasta el momento no se ha reportado que cause alguna patología en el humano, de hecho, su presencia ha sido tomada como un indicador de que las condiciones son adecuadas para el crecimiento de *N. fowleri* (De Jonckheere, 2002).

Naegleria fowleri, puede llegar a sobrevivir en ambientes acuáticos con temperaturas superiores a los 45° C (Tiewchaloren y Junnu, 1999), sí tomamos en cuenta que soporta temperaturas superiores a los 37° C, es claro que esta ameba pueda sobrevivir mejor durante los meses más calurosos del año, y que se encuentre en menor proporción en invierno, lo cual puede ser atribuido a las bajas temperaturas que se presentan en esa estación (De Jonckheere y Van de Voorde, 1977).

Las personas que nadan, pescan o realizan cualquier otra actividad en piscinas o en cuerpos de agua naturales corren el riesgo de estar en contacto con *N. fowleri* y contraer MEAP (Cogo *et al.*, 2004), el riesgo se aumenta cuando hay contacto humano con las aguas termales (Tiewchaloren y Junnu, 1999), sin embargo, no se ha encontrado una correlación entre la temperatura del agua y la presencia de *N. fowleri*, lo que si se sabe es que el contacto con superficies calientes es muy importante para su presencia (Delattre y Oger, 1981).

Naegleria fowleri tiene la capacidad de tolerar valores de pH en el ámbito de 2.1 a 8.1 (Sykora *et al.*, 1983), aunque algunos especialistas (Tiewchaloren y Junnu, 1999), sostienen que los niveles de tolerancia del pH varían de 5 a 12, sin embargo, se ha notado que mientras el pH se acerca más a 5 ó 12, algunas amebas se desintegraban o comenzaban a redondearse, encogerse, a perder su adherencia, de igual manera el movimiento granular citoplasmático cesó.

En cuanto a los niveles tolerables de salinidad por *N. fowleri*, se sabe que soporta de 0.2 a 4% de cloruro de sodio, aunque, la mayoría de los trofozoítos mostraban niveles altos de morbilidad, mortalidad y decremento en el crecimiento de la población (Tiewchaloren y Junnu, 1999), por lo que no pueden sobrevivir en el mar.

Respecto a los agentes desinfectantes, como el cloro, las concentraciones mayores de 0.75 ppm de cloro, son suficientes para actuar como amebicida, una concentración de 0.5 ppm de cloro libre residual a un pH 7 es suficiente para matar a cerca del 99% de los trofozoítos en menos de 30 minutos (Tiewchaloren y Junnu, 1999) pero, Muñoz y colaboradores, (2003) en un estudio realizado en piscinas donde se buscaba la presencia de AVL, descubrieron que en 7 de las 8 piscinas que muestrearon se utilizaba cloro y en 5 de ellas se aislaron AVL.

Otro desinfectante que se utiliza comúnmente es la luz ultravioleta (UV), Tiewchaloren y Junnu, (1999), realizaron un estudio colocando cultivos de *N. fowleri* a 25 y 35 cm de distancia de la luz UV, encontrando que este tipo de luz no es efectiva como desinfectante por sí sola, también, utilizaron Formalina, demostrando que a concentraciones de 0.05%, la ameba mostraba algunas anormalidades, su número decrecía y algunas morían. A concentraciones mayores del 0.05%, las amebas eran eliminadas.

Naegleria fowleri ha sido aislada en una amplia variedad de hábitat, por ejemplo: lagos, lagunas (Gallegos, 1997), aguas termales, "spas", piscinas (Rivera *et al.*, 1983), piscinas de hidroterapia, acuarios, descargas (Sykora *et al.*, 1983) y del suelo (Visvesvara y Sther, 1990).

En vida libre, las poblaciones naturales de *N. fowleri* se ven influenciadas por:

1. La fisiología de la ameba: tolerancia a la temperatura, ritmo de crecimiento, estados flagelares
2. Disponibilidad de alimento
3. Factores ambientales: salinidad, concentración de oxígeno disuelto, temperatura, depredadores
4. Competidores termotolerantes que forman flagelos
5. Competidores termotolerantes no formadores de flagelo
6. Otras amebas (Griffin, 1983)

En el laboratorio y contrario a otras naeglerias, *N. fowleri*, se adapta fácilmente al medio axénico, haciendo de este método, una manera rápida para separar a esta ameba de otras de su mismo género, pero de diferente especie (De Jonckheere, 2002).

4. MENINGOENCEFALITIS AMEBIANA PRIMARIA

La infección por *N. fowleri*, es rara, menos de 200 casos de MEAP han sido reportados en todo el mundo (Cogo *et al.*, 2004), sin embargo, el número de casos se va incrementando cada año, con un desenlace fatal en casi todos los casos (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005) En México se han reportado cerca de 29 casos, la mayoría de ellos en el noroeste del país (Lares-Villa, 2001), la presencia de AVL en esta región puede deberse a las condiciones presentes en el lugar, tales como: temperaturas extremas, la existencia de canales de irrigación, piscinas, balnearios y cuerpos de agua artificiales, que presentan una amplia variedad de estos organismos (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005).

Naegleria fowleri, ha sido aislada frecuentemente en Australia, América del Norte, Europa y Asia (Robinson *et al.*, 2004), a partir de casos de MEAP (Bottone, 1993; Schuster y Visvesvara, 2004b), enfermedad que afecta al sistema nervioso central (SNC) tanto en humanos como en ratones, causando casi siempre la muerte después de 7 ó 10 días (Sykora *et al.*, 1983; Huizinga *et al.*, 1990; Visvesvara y Sther, 1990; Robinson *et al.*, 2004). Muchos de los pacientes con MEAP, mueren incluso, antes de producir niveles detectables de anticuerpos (Visvesvara y Sther, 1990).

La mayoría de los casos han ocurrido en niños ó adultos jóvenes con buena salud durante los meses de verano, los pacientes mostraban un historial de haber nadado o estado en contacto con agua contaminada con *N. fowleri* antes de contraer la enfermedad (Visvesvara y Sther, 1990).

Naegleria fowleri encuentra un hábitat vacío y libre de depredadores en el cerebro de los mamíferos, la comida esta disponible, es cálido y las células blancas son demasiado lentas en su reacción, en este caso, la forma ameboflagelar le puede conferir una ventaja en este hábitat tan rico (Griffin, 1983).

Los signos y síntomas que son presentados por los pacientes que contraen esta enfermedad van desde dolor de cabeza, náusea, vómito, fiebre arriba de los 39° C, meningitis, anorexia, estupor y agitación (Visvesvara y Sther, 1990). La infección ocurre cuando la mucosa nasal se pone en contacto con la forma trófica de la ameba, el trofozoíto penetra la mucosa nasofaríngea y migra por el nervio olfatorio, e invade el cerebro a través de la placa cribiforme (Bottone, 1993) llegando hasta los lóbulos olfatorio y frontal, en donde los trofozoítos comienzan a producir efectos citopáticos sobre los tejidos, a la vez que las defensas del paciente comienzan a actuar, sin embargo, el organismo comienza a producir niveles grandes de leucocitos (29,000 leucocitos/mm³, Vargas-Zepeda *et al.*, 2005) no obstante, la ameba empieza a reproducirse y llega a superar las defensas del cuerpo del paciente, invadiendo otros tejidos cerebrales como el tallo cerebral y el cerebelo, produciendo daños irreversibles en el cerebro e inflamando las meninges (Vargas-Zepeda *et al.*, 2005). Al ir engullendo, la ameba, los tejidos cerebrales, los pacientes van perdiendo sus capacidades, hasta llegar a caer en el coma, que en la mayoría de los casos deriva en la muerte (Cogo *et al.*, 2004; Schuster y Visvesvara, 2004b; Vargas-Zepeda *et al.*, 2005). Al hacer una punción lumbar se observa que los trofozoítos de *N. fowleri*, son abundantes en tejido cerebral y fluido cerebroespinal, pero nunca se han aislado en forma quística (Bottone, 1993).

5. TRATAMIENTO

De las drogas que han sido evaluadas contra *N. fowleri*, la anfotericina B es el agente de mayor uso médico, sin embargo, la utilización de este antifúngico se ha asociado con toxicidad renal, anemia, fiebre, náusea y vómito (Goswick y Brenner, 2003), sí bien existen otras drogas antifúngicas que surten efecto, en *N. fowleri*, el problema, no es el hecho de que no haya medicamentos o drogas para su tratamiento, si no, que no hay un método para un diagnóstico temprano y eficaz (Rodríguez- Zaragoza, 1994).

Un tratamiento en las primeras etapas de MEAP con la administración de anfotericina B y fluconazole vía intravenosa, y la administración oral de rifampicina pueden ofrecer un recurso en el tratamiento de esta enfermedad, como en un caso reportado en Sonora, México, donde un niño de 10 años, logró recuperarse de esta patología, con anfotericina B y fluconazole vía intravenosa (Vargas-Zepeda, *et. al.*, 2005).

Otra sustancia que ha demostrado tener poder inhibitorio sobre *N. fowleri* es el trifluralin (TFL), que es un herbicida que rompe los microtúbulos de la mitosis. Este herbicida inhibe el crecimiento y la transformación ameboflagelar en una concentración de 10 mM de una manera irreversible, también los tripanosómidos son sensibles a este herbicida, no así los mamíferos. Se sugiere que su mecanismo de acción consiste en bloquear la tubulina β de *Naegleria*, ya que esta más relacionada con la tubulina presente en plantas y tripanosómidos que la de mamíferos. El TFL puede combinarse bien con la anfotericina B ya que tienen diferentes mecanismos de acción (Wang *et al.*, 1995).

En un estudio realizado por Goswick y Brenner (2003), se comparó la eficacia del antibiótico azitromicina, respecto, a la anfotericina B y se encontró que la azitromicina con una dosis de 75 mg/ kg/ día durante 5 días curaba al 100% de los ratones que se usaron para esta prueba, mientras que la anfotericina B curaba solo al 50% de los ratones con una dosis de 7.5 mg/ kg/ día por 5 días, por lo que se concluyó que la azitromicina puede ser utilizado eficazmente en la terapia contra la MEAP, además de que los efectos secundarios son prácticamente nulos en los pacientes. Se cree que la azitromicina actúa inhibiendo la síntesis de proteínas, mediante un proceso semejante al que sucede con bacterias, en las cuales la azitromicina, bloquea la formación de cadenas de péptidos y la translocación, pero estos mecanismos aún necesitan ser estudiados en *N. fowleri*.

6. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

6.1 PATOGENICIDAD

Patogenicidad se define como la capacidad de un organismo de causar enfermedad en el huésped, el grado de patogenicidad de un organismo es denominado como virulencia. En el caso de *N. fowleri*, este mecanismo se trata de un fenómeno complejo multifactorial y no necesariamente ordenado en una secuencia específica y definida (Gallegos, 1997).

Una de las características que le confieren alta patogenicidad a *N. fowleri* es la alta capacidad locomotora que tiene (quimiotaxis), además, de la marcada migración direccional que manifiesta hacia los fosfolípidos (quimiotaxis) (Brinkley y Marciano, 1992). Una vez establecido el contacto entre una y otra célula (ameba - célula blanco),

las amebas tocan a las células, pero no se aferran a ellas, fenómeno denominado "hit and run", este, es necesario para comenzar con la siguiente fase.

6.2 ADHESIÓN "BESO DE LA MUERTE"

Este es el primer paso, en el complejo proceso citopatogénico de este microorganismo, los trofozoítos se adhieren a casi todas las células, por la presencia o ausencia de receptores celulares complementarios con los diversos tejidos del huésped; la adhesión entre el patógeno y el huésped se lleva a cabo mediante glucoproteínas o lipoproteína de superficie de la membrana del patógeno llamadas andhesinas, además, estudios bioquímicos han mostrado la presencia de una lectina amebiana que reconoce carbohidratos específicos en la superficie de las células blanco (Marciano-Cabral, 1988).

6.3 MECANISMOS

Existen 2 clases de mecanismos de citopatogenicidad para esta ameba:

- Mecánicos: dependiente de la motilidad como la Trogocitosis y fagocitosis
- Químicos: Formación y liberación de cuerpos densos como:
 - Enzimas líticas: Fosfolipasa A y C, la proteasa, la esfingomielasa, la lisofosfolipasa, tripsina, hidrolasas, hemolisinas, colagenasa, leucocidinas y lipasa.
 - Toxinas: Lisis dependiente de contacto (ameboporinas) material citopatogénico de *Naegleria* (MACN).

A. Mecánicos: Trogocitosis

El proceso de trogocitosis, consiste en que la célula amebiana rodea a la célula blanco y mediante el amebostoma, crea un tipo de succión, mediante el cual, parte de las células entra al interior de la ameba, posteriormente el canal se cierra y la célula se rompe, de manera que el material citoplasmático de la célula se derrama y se crea un desbalance iónico ocasionando la muerte celular, de esta forma, va arrancado pedazos de célula, que después, asimilan sus vacuolas (Marciano-Cabral *et al.*, 1990).

Se cree que la trogocitosis se lleva a cabo por la concentración y ordenamiento de moléculas contráctiles como la actina, sin embargo, este proceso, aún no esta claro, se cree que para poderse llevar a cabo, *N. fowleri* tendría que haber vertido previamente algunas enzimas a las célula blanco (Marciano-Cabral, 1988).

B. Químicos

i) Formación y liberación de cuerpos densos

El contacto con sustratos naturales (células) provoca la formación y liberación de cuerpos densos, es un mecanismo de concentración y liberación de sustancias tóxicas en forma condensada.

ii) Enzimas líticas

La producción de enzimas de degradación y otras proteínas líticas son un mecanismo que poseen *N. fowleri* para invadir al huésped y le confiere su capacidad infectiva y patógena (García, 2000).

Como podemos observar en el cuadro 2, *N. fowleri*, cuenta con una amplia variedad de enzimas que le auxilian a degradar los fosfolípidos, atacar a los neutrófilos, entre otros, por lo tanto, le ayudan a soportar el ataque del sistema inmune humano, de ahí que resulta tan virulenta y mortal la enfermedad que produce. Además se protege a sí misma mediante un complejo de ataque lítico a la membrana de la célula blanco que esta compuesto por proteínas de superficie (Chu *et al.*, 2000).

Cuadro 2. Enzimas líticas de *N. fowleri* y el efecto que producen en el sistema inmune humano.

ENZIMAS	EFEECTO
Proteasa, esfingomielasa, lisofosfolipasa fosfolipasa c	Degradación de fosfolípidos, como la mielina humana
Fosfolipasa a	Factor citolítico
Leucocidinas	Tienen la capacidad de destruir los neutrófilos (un tipo de glóbulo blanco) y macrófagos, lo cual disminuye la capacidad de resistencia del huésped.
Hemolisinas	Grupo de enzimas capaces de degradar a los eritrocitos (glóbulos rojos)
Colagenasa	Enzima capaz de romper el colágeno que forma al tejido conectivo de los músculos y algunos órganos
Proteasas	Enzimas capaces de degradar proteínas, especialmente las del tejido muscular.
Hidrolasa	Enzimas que ayudan a desdoblar biomoléculas complejas como proteínas, grasas y carbohidratos, con lo cual ayudan a la digestión de estas sustancias
Lipasas	Atacan los enlaces éster y los ácidos grasos

C. Tóxicas: Lisis dependiente de contacto (ameboporinas)

Se han estudiado extractos de *N. fowleri* que son citotóxicos, confirmando que la fagocitosis o trogocitosis no son los únicos mecanismos de citopatogenicidad (Marciano-Cabral, 1988).

La actividad hemolítica de *N. fowleri* se debe a la formación de una proteína formadora de poros, un eficiente mecanismo para dañar a las células blanco mediante el cual se insertan poros en su membrana. Esta proteína de 6.6 kDa, (N-PFP) que forma canales iónicos en la membrana, con mayor permeabilidad a los cationes que a los aniones, lisa eritrocitos y es citotóxica. Es capaz de resistir hasta 75° C. Un contacto íntimo entre la ameba y las células del hospedero es necesario para causar el daño.

En un estudio realizado por Marciano-Cabral y colaboradores., en 1990, se muestra que cepas que han estado recientemente involucradas en procesos infecciosos tienden a utilizar este tipo de mecanismo en comparación con cepas que han estado mucho tiempo en cultivo monoaxénico las cuales utilizan el proceso de trogocitosis. También se explica que las cantidades de ameba respecto a células blanco (B103 neuroblastomas de rata) tienen que ser 1 a 1 para que la lisis mediada por contacto sea efectiva.

D. Material citopatogénico de *Naegleria*

El material citopatogénico de *Naegleria* (MACN) fue reportado por primera vez por Dunnebacke en 1977, y es una pequeña proteína ácida, con un peso molecular de 36,000kDa, es altamente específica, resiste la inactivación por irradiación, nucleasas y un gran número de proteasas, mientras es inactivada por la proteinasa K y temperaturas elevadas (De Jonckheere, 2002).y su dispersión es de célula a célula, se le atribuyen efectos citopáticos por lo que es capaz de matar gran diversidad de células de aves y mamíferos (Marciano-Cabral, 1988). Estudios con fluorescencia han demostrado que el MACN, se encuentra en la punta de los pseudópodos y en el citoplasma periférico (Marciano-Cabral, 1988).

6.4 OTROS MECANISMOS

El suero humano normal, estimula la producción de proteína cinasa en *N. fowleri*, el cual puede ser efectivo para destruir al complemento (del suero humano), y proteger la ameba de un ataque a su membrana por el sistema inmune humano (Chu *et al.*, 2000).

Los anticuerpos secretados IgA (SIgA) protegen a los humanos contra infecciones bacterianas y virales, Rivera- Aguilar y colaboradores (2000) demostraron la existencia de anticuerpos IgA que reconocen los antígenos de *N. fowleri* en la saliva y el suero de pacientes con enfermedades respiratorias, como rinitis o bronquitis y en individuos sanos que no tienen antecedentes de amebiasis pero viven en un área endémica de *N. fowleri*.

El origen de los anticuerpo IgA que reconocen a *N. fowleri*, es desconocido. Estos anticuerpos pueden participar en la resistencia contra una invasión amebiana, probablemente inhibiendo la adherencia de los trofozoítos a la mucosa nasal (Rivera-Aguilar *et al.*, 2000).

III. ANTECEDENTES

En 1978, se iniciaron en México los primeros estudios sobre AVL, con el trabajo de Rivera y colaboradores (1978), quienes encontraron amebas del género *Naegleria* en muestras tomadas de piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la ciudad de México, a partir de este estudio se llevaron a cabo varios más, la mayoría de ellos realizados en la ciudad de México y su periferia, también en 1983, estos mismos autores realizaron un estudio amebológico en las piscinas de 6 centros recreativos de la ciudad de México, en donde encontraron en mayor abundancia a *N. gruberi* (59.02%) y *N. fowleri* (16.77%), además de encontrarse *Acanthamoeba castellanii* y *Thecamoeba verrucosa*, de igual forma, Rivera y colaboradores (1992), hicieron un estudio en 11 piscinas y 3 tubos de fisioterapia en la ciudad de México, en donde reportaron amebas de los géneros *Vahlkampfia*, *Hartmannella* y *Naegleria*.

De igual modo, Sykora y su equipo en 1983, detectaron a *N. fowleri*, en la Bahía de la Isla Presque, cerca de la planta Erie, en Pensilvania, EUA. En 1995, Hernández de Alba, realizó un estudio para estandarizar la técnica de ELISA en la identificación del género *Naegleria*, donde se expuso el título a punto final equivalente a la concentración de anticuerpos totales, lo que permitió comparar entre muestras, el aumento significativo del nivel de inmunoglobulinas totales; en este mismo año, Kilvington y Beeching (1995), desarrollaron una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) especie-específico para la identificación de *N. fowleri*, con una sensibilidad para detectar, 1 trofozoito ó quiste después de 45 ciclos, obtenidos de cultivos primarios de muestras ambientales.

Se llevó a cabo un estudio en la Huasteca Potosina en el estado de San Luis Potosí, sobre amebas potencialmente patógena (Gallegos, 1997) encontrándose amebas de 6 diferentes géneros: *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Willaertia*. En Alemania Rohr y colaboradores (1998), realizaron un estudio en los sistemas de agua caliente de hospitales y áreas comunes encontrando a los géneros, *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Vanella*.

Muñoz y colaboradores, (2003) realizaron un estudio en Santiago de Chile, sobre la presencia de amebas de vida libre en 8 piscinas públicas, encontrando a *Naegleria* y *Acanthamoeba* en un 7.8% y un 4.7%, respectivamente, utilizando pruebas bioquímicas y microscopia.

La identificación de *N. fowleri* generalmente se ha venido realizando mediante microscopia, sin embargo, los procedimientos normales de aislamiento y cultivo consumen mucho tiempo en la identificación de los organismos, y solo se puede realizar con medios de cultivo específicos para su crecimiento, además la morfología de esta ameba puede ser fácilmente confundida con la de *N. gruberi* ó *N. lovaniensis*, con las que se encuentra continuamente asociada en vida libre, e inclusive con la de leucocitos en fluido cerebro espinal (Schuster y Visvesvara, 2004b) por lo que es hasta épocas recientes cuando las herramientas proporcionadas por la biología molecular tales como PCR, el análisis de las subunidades del RNAr, lisozimas, entre otras han permitido una identificación rápida y precisa para la detección e identificación de microorganismos que no son fácilmente distinguibles por métodos microscópicos, ni por cultivos convencionales (Sheehan *et al.*, 2003), además de proporcionar una manera efectiva y

costeable de detectar organismos patógenos para los hospitales y clínicas de salud, en poco tiempo (Toze, 1999).

Para 1991, McLaughlin y colaboradores, diseñaron un par de primers, basados en una secuencia repetitiva de ADN denominada Nf9, la cual probablemente es de origen mitocondrial y se cree esta relacionada con la patogenicidad, se utilizaron dos diferentes temperaturas de alineación para los iniciadores, una de ellas le confería especificidad para *N. fowleri*, debido a que la secuencia repetitiva era reconocida.

Hu y colaboradores (1992) construyeron una biblioteca de ADNc usando RNAm de un gen que se encuentra relacionado con la virulencia de *N. fowleri*, este gen se inactiva después de que un aislado ha estado por algún tiempo en cultivo de laboratorio. Para construir la biblioteca de ADNc, estos investigadores sintetizaron un par de iniciadores, que en 1993, Sparagano utilizó, en este caso, para identificar a *N. fowleri* y los comparó con los diseñados por, McLaughlin y colaboradores (1991), encontrando que los primeros eran altamente específicos para *N. fowleri* y que su límite de detección era de un trofozoíto ó quiste después de 40 ciclos, mientras que el segundo par sintetizado por McLaughlin y colaboradores (1991), detecto secuencias de otras especies de *Naegleria* e inclusive de *Acanthamoeba*.

Sparagano y colaboradores (1993), utilizaron 2 tipos de anticuerpos monoclonales (3 A4 y 5D12) para identificar mediante ELISA, los 3 diferentes estados morfológicos de *N. fowleri* encontrando una amplia eficacia y especificidad en la detección de este organismo con ambos anticuerpos, posteriormente, Réveiller y colaboradores (2000) estudiaron la especie-especificidad del anticuerpo monoclonal 5D12 y caracterizaron parcialmente su antígeno, encontrando que este se ubicaba en la membrana celular de la ameba y que era altamente específico, después, Réveiller y colaboradores (2001), reportaron que el antígeno que se había intentado caracterizar en 2000, se trataba de una proteína llamada *Mp2CL5*, que probablemente juega un papel determinante en la patogenicidad de *N. fowleri*, siendo un factor de virulencia y que además no se presentaba en ningún otro organismo, para 2002, Réveiller y colaboradores desarrollaron un PCR anidado en base a esta proteína, siendo este, rápido y eficaz, capaz de detectar 5 pg de ADN de *N. fowleri* ó 5 células intactas, sin previa extracción, diseñando 2 pares de iniciadores, el primero de ellos detecta una región de 166 pares de bases (pb) y el segundo, una región, dentro de la anterior, de 110 pb.

Por su parte Marciano y colaboradores (2003) probaron el PCR anidado desarrollado por Réveiller y colaboradores (2002), identificando a *N. fowleri* en agua potable proveniente de algunos hogares de Arizona, obteniendo resultados muy rápidos y confiables, de igual modo MacClean y colaboradores (2004) identificaron a esta ameba en muestras tomadas de agua y suelo de Connecticut, EUA, mediante estos 2 pares de iniciadores.

Cogo y colaboradores (2004), reportaron el caso de un niño que después de 10 días de haber nadado en el Río Po, Italia, fue diagnosticado con MEAP, el agente causal fue *N. fowleri*, el diagnóstico se hizo mediante PCR e inmunofluorescencia, desgraciadamente, el niño murió. Un método similar de diagnóstico utilizó Hara y Fukuma (2005), en un caso reportado en Japón.

1. HIPÓTESIS

Se ha destacado que *N. fowleri* crece y se multiplica bien en ambientes acuáticos con temperaturas elevadas incluyendo sistemas que reciben, tanto, aguas templadas de plantas termoeléctricas, como aguas termales naturales (Kyle y Noblet, 1986). Diversos autores han demostrado que la probabilidad de aislar amebas patógenas del género y especie *N. fowleri* en el agua es mayor cuando la temperatura supera los 35° C y las concentraciones bacterianas son adecuadas para servir como fuente de carbono para el mantenimiento de las amebas termófilas (Schuster y Visvesvara, 2004b).

En México existen diversos sistemas acuáticos que son calentados naturalmente y muchos de ellos son aprovechados como centros recreativos por el confinamiento de las aguas termales en piscinas. En el municipio de Tecozautla, situado en el estado de Hidalgo existe un balneario termal popular que se alimenta del agua proveniente de un géiser, esta agua se distribuye a través de canales a cielo abierto directamente a 4 piscinas y la temperatura del agua oscila entre los 36 y 50° C.

Con estos antecedentes se propone la hipótesis de que sí las condiciones de temperatura del agua, densidad bacteriana y las características ambientales y fisicoquímicas son las adecuadas para el establecimiento de amebas termotolerantes del género y especie *Naegleria*, entonces habría la posibilidad de aislar estas amebas patógenas termotolerantes a partir del agua de las piscinas artificiales alimentadas por el géiser del balneario en Tecozautla, estado de Hidalgo.

IV. OBJETIVOS

1. GENERAL

Aislar e identificar amebas termotolerantes patógenas del género y especie *Naegleria fowleri* a partir del agua de piscinas de un balneario de aguas termales en el Estado de Hidalgo.

2. PARTICULARES

Identificar los aislados amebianos a nivel de género por microscopía en contraste de fases.

Utilizar la técnica de PCR como una herramienta para la identificación y confirmación de la identidad taxonómica de *Naegleria fowleri* a partir de muestras de agua y de cultivos amebianos.

Correlacionar los valores de los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos del agua con la presencia/ausencia de *Naegleria fowleri*.

V. ÁREA DE ESTUDIO

1. TECOZAUTLA, HIDALGO

Tecoautla, es un municipio del estado de Hidalgo (figura 2), que es famoso por tener un corredor turístico de balnearios de aguas termales a las cuales acuden personas de toda la república, en busca de las propiedades medicinales que se dice contienen estas aguas.



Figura 2. Mapa de la localización del municipio de Tecoautla en el estado de Hidalgo. Tomado de Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002.

Tecoautla se ubica en las coordenadas geográficas 20°31'58" de latitud Norte, 99°37'57" de longitud Oeste con una altitud de 1700 m.s.n.m. Tiene una superficie de 537.83 km², colinda al norte con el municipio de Zimapán, al sur con el municipio de Huichapan, al oeste con el estado de Querétaro y al este con los municipios de Tasquillo y Alfajayucan (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002).

Se presenta un clima templado-semifrío con una temperatura media anual de 17° C y una precipitación total anual de 517 mm. Cuenta con una amplia variedad orográfica, una parte del municipio se localiza en la provincia del Eje Neovolcánico y la otra parte se ubica en la provincia de la Sierra Madre Oriental (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002).

Las principales fuentes hidrológicas de este municipio son: la cuenca del río Panuco, el río Tecoautla, el río San Francisco y el río Moctezuma, este último es muy importante no solo por su afluencia de agua sino porque también sirve como límite político estatal. Cuenta además con pozos y manantiales. Tecoautla está ubicado en una zona rica en manantiales de aguas termales, situación que lo coloca como un importante municipio turístico de Hidalgo, con una veintena de balnearios con aguas termales, cuya temperatura oscila entre 30° y 40°C. Taxhidó, Gandhó, Uxdejhe y Carrizal del Lago son

algunos de los balnearios más visitados (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002).

Cerca de Tecozautla se encuentra el géiser de Taxhidó, famoso, en los años 50 por ser el primer pozo del cual se explotó el vapor proveniente del interior de la tierra —planta geotermoeléctrica—, que en la actualidad ya no funge como tal, en cambio, se usa como balneario de aguas termales.

2. BALNEARIO “EL GÉISER”

El Géiser es un balneario muy popular en la zona, se encuentra ubicado en una pequeña depresión rodeado de cerros, en el lugar hay un géiser natural de donde brota agua sulfurosa con vapor a 95° C, las aguas termales no cloradas de este sistema alimentan un sistema de piscinas artificiales que son muy apreciadas como sitio de recreo por infinidad de bañistas.

Se encuentra a las faldas de un cerro y lo conforman seis piscinas (figura 3), conformadas de la siguiente manera: chapoteadero, dos piscinas de 1.60 m de profundidad, una fosa que tiene 5 metros de profundidad y dos piscinas para enjabonarse. Todas las piscinas son alimentadas por una serie de canales aéreos, que transportan el agua desde un receptáculo donde se condensa el vapor del agua que emana del géiser.

Estos canales están contruidos de cantera y se encuentran a aproximadamente 2 metros de la superficie del suelo, es importante destacar que estos canales pueden transportar el agua desde el géiser hasta las albercas, favorecidos por el desnivel. La distancia que tiene que recorrer el agua a las diferentes piscinas provoca en ellas un gradiente de temperatura, el agua más caliente se encuentra en las piscinas más cercanas al géiser y el agua más templada en la piscina más lejana.

Igualmente, se encuentran dos canales subterráneos, que toman agua del receptáculo del géiser y la llevan hasta el río, que se ubica unos metros abajo del balneario, cuando las piscinas son lavadas, toda el agua que se desecha es enviada al río.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevaron a cabo 4 muestreos en el balneario “El Géiser”, abarcando las diferentes temporadas del año, los muestreos de lluvias se realizaron en los meses de septiembre y octubre de 2004 y los de secas en febrero y mayo de 2005 respectivamente.

1. RECOLECTA

Se recolectaron muestras de agua en volúmenes de 1 L en frascos de polipropileno de boca ancha (NALGENE), esterilizados; se tomaron, de tres a cuatro muestras de cada alberca dependiendo del tamaño y tomando en cuenta, los sitios donde las personas frecuentaban para nadar, si había presencia de materia flotante (hojas, troncos, ramas, basura, etc.) y la entrada de agua a la alberca (Rivera *et al.*, 1983). Las estaciones 16 y 17 se añadieron a partir del 3er muestreo y la estación 18 y 19 solo se recolectaron en el 4º muestreo, esto debido a la disponibilidad de agua en las albercas y a su temperatura.

Las muestras se transportaron a temperatura ambiente, desde el balneario “El Géiser” hasta el Laboratorio de Biología Molecular (LBM) de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE), en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), UNAM, para su procesamiento.

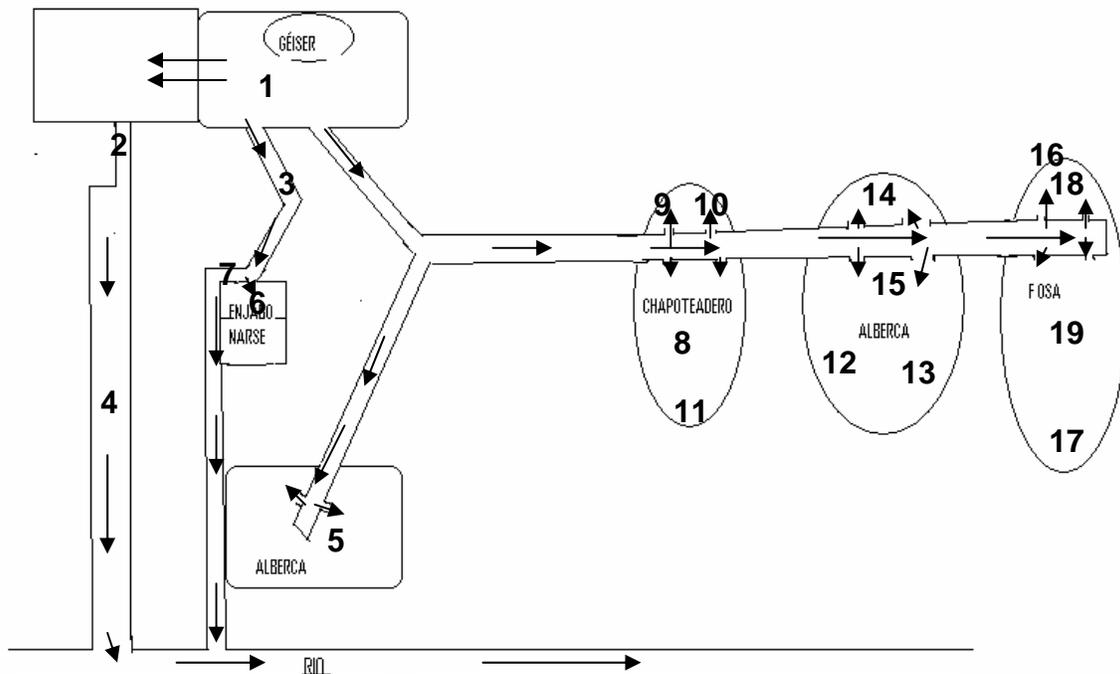


Figura 3. Estaciones de muestreo del balneario “El Géiser”. Las flechas indican la dirección del agua. Los números las estaciones de muestreo.

2. REGISTROS “IN SITU”

Se registraron “*in situ*” parámetros ambientales, fisicoquímicos y bacteriológicos para comprobar si las condiciones que existen en las albercas son las necesarias para

sustentar la presencia de AVL, particularmente de *N. fowleri*. Los parámetros que se midieron fueron, temperatura del agua, temperatura atmosférica, porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (% OD), pH, conductividad, bacterias totales (BT) y coliformes totales (CT).

2.1 PARÁMETROS AMBIENTALES Y FISICOQUÍMICOS

A. Temperatura del agua 8 (°C)

Este parámetro se midió con un termómetro digital Hanna H 19040, se tomaron los valores de la temperatura del agua para conocer si es que existía, la temperatura adecuada en cada estación para la prevalecencia de *N. fowleri* y también para saber si había algún gradiente de temperaturas en las albercas y percatarse posteriormente, si es que este gradiente afectaba la presencia de AVL.

B. Temperatura atmosférica

Se midió con un termómetro digital Hanna H 19040, en este caso el electrodo se expuso al ambiente. Este valor se determinó pues algunos autores (Sykora *et al.*, 1983; Kyle y Pittman, 1985, 1986, 1987), reportan que la distribución de las cepas termófilas de *Naegleria* están limitadas por las temporadas del año y que su incidencia se incrementa en temporada de lluvias y para conocer si la temperatura de la atmósfera afectaba en algo a la temperatura del agua ó a la presencia de *N. fowleri*.

C. Porcentaje de Saturación de Oxígeno disuelto (% OD)

Se midió con un oxímetro digital Hanna H19143. Para realizar las mediciones de OD, pH y conductividad cuando los valores de la temperatura del agua superaron los 40° C, se procedió a tomar muestras de agua en tubos de polipropileno de 250 ml (NALGENE). Estas muestras se tomaron sumergiendo totalmente el frasco dentro del agua y cerrándolo bajo la superficie de la misma, para evitar que se crearan burbujas de aire que pudieran crear error al hacer las mediciones del porcentaje de saturación de OD, posteriormente se esperó hasta que la temperatura bajara y se pudieran sumergir los electrodos dentro del frasco, para hacer las mediciones. Se tomó el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto, para conocer si el oxígeno que existían en cada estación de muestreo, era el adecuado para la supervivencia y presencia de *N. fowleri*, ya que la diversidad de amebas decrece cuando en el agua, el porcentaje de oxígeno disuelto es casi nulo (Kyle y Pittman, 1985).

D. pH

Se midió con un potenciómetro digital de campo pH Testr2. En este caso se tomaron los valores del pH en las estaciones, para conocer si era posible, con los valores encontrados, que *N. fowleri*, pudiera estar presente ya que tiene la capacidad de tolerar valores de pH en el ámbito de 2.1 a 10 (Tiewchaloren y Junnu, 1999).

E. Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)

Se midió con un conductímetro digital de Trans Instruments. Este parámetro depende mucho de la temperatura a la que se realizó el registro por lo cual se tuvo que ajustar mediante un factor de corrección a 25° C y los resultados se expresaron como

conductividad a K 25° C (K_{25}) (Arredondo y Ponce, 1998), el factor de corrección es diferente para cada valor dependiendo de la temperatura a la que se haya tomado.

2.2 ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS

Se llevó a cabo la determinación de la concentración de bacterias totales (BT) y de coliformes totales (CT) en el agua de las piscinas del balneario “El Géiser”, con los kits Total Count Sampler MT0010025 para Bacterias Totales (BT) y Coli Count MC0010025 para Coliformes Totales (CT) (Millipore, MA, EUA). Estos kits están constituidos por muestreadores en los cuales se encuentra una cuadrícula: Los frascos se llenaban con 10 ml de agua y se incubaron durante 48 h, las mediciones del número de colonias crecidas se realizaron cada 24 h; para el caso de BT las colonias aparecían en varios colores y formas y se contaban dependiendo de la abundancia en que se presentaran, si eran muy pocas eran contabilizadas una por una, si, eran demasiadas se hacia una comparación con gráficos presentados en los instructivos del producto y se tomaron los parámetros ahí sugeridos. Las colonias se reportaron en unidades formadoras de colonias por ml (UFC/ml).

En el caso de CT, el procedimiento que se siguió fue el mismo que en el anterior, solo que el número de colonias contadas se multiplicaba por 100 y para poder ser reportadas como UFC en 100 ml (UFC/100ml). Los parámetros bacteriológicos se midieron para conocer, si estando en vida libre dentro de este sistema recreativo, las poblaciones de *N. fowleri*, contaba con alimento disponible para continuar con su ciclo de vida.

3. AISLAMIENTO DE LAS AMEBAS DE VIDA LIBRE

En el laboratorio, se llevó a cabo un tratamiento primario, para concentrar y cosechar todas las células amebianas existentes en la muestra, y posteriormente aislarlas y cultivarlas para su identificación posterior.

Para el tratamiento se tomaron muestras de 50 ml, se centrifugaron en una centrifuga BOECO U-32 a 1500 x g durante 10 minutos (Pernil *et al.*, 1998) después, el sobrenadante se desechó y la pastilla fue sembrada sobre placas de agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE, por sus siglas en inglés, ver anexo 2), a 45° C durante 72h para evitar el crecimiento de otras amebas y asegurarse que las amebas que se estaban aislando eran termotolerantes como *N. fowleri* (De Jonckheere, 1978; Griffin, 1983).

3.1 CLONACIÓN

Transcurrido el tiempo de incubación, las placas de agar NNE sembradas con las muestras del balneario, se revisaron en un microscopio invertido Nikon Eclipse TS 100, con el objetivo de 20x, para observar la presencia de trofozoítos ó quistes amebianos. Los aislados que resultaron positivos fueron resembrados individualmente en placas con agar NNE, transfiriendo una porción del agar NNE donde se encontraran trofozoítos en crecimiento, ó quistes en abundancia a otra placa con agar NNE, poniendo en contacto la superficie donde se encontrara el crecimiento amebiano con la superficie de la nueva placa y se incubó a 37° C (De Jonckheere y Van de Voorde, 1977).

Esta resiembra se llevó acabo para aislar las diferentes especies de amebas que se encontraban en el cultivo, pues en una sola estación de muestreo, por lo general, se

encontraban más de una sola especie amebiana. Posteriormente se hicieron nuevas resiembras, para separar totalmente un aislado de otro, para llevar a cabo la identificación morfológica y molecular.

4. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Para efectuar la identificación morfológica, se aseguró que las placas de NNE tuvieran amebas en estado trofozoíto y quiste, y de que no tuviera ningún tipo de contaminación, ya que las placas de NNE pueden ser fácilmente contaminadas con hongos y bacterias.

Una vez crecidas las amebas en las placas, éstas se cosecharon siguiendo el procedimiento estándar para la identificación, en condiciones de esterilidad, se vertió 1 ml de agua destilada previamente esterilizada sobre la placa y con un asa acodada de vidrio se realizó un barrido sobre la placa del cultivo, concentrando la suspensión acuosa con amebas en la placa, este líquido, fue transferido con una pipeta Pasteur a un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos para su observación al microscopio de contraste de fases.

La identificación morfológica se hizo con un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse TS 100) utilizando las claves taxonómicas de Page (1966, 1975, 1976 y 1988), tomando en cuenta la morfología de los organismos, por ejemplo, forma del quiste, presencia o ausencia de gránulos perinucleares, forma del trofozoíto y forma del uroide (John y De Jonckheere, 1985).

4.1 MEDICIONES DE QUISTES Y TROFOZOÍTOS

Para llegar a un diagnóstico morfológico, se midió el largo y ancho de 50 trofozoítos y se registró el diámetro de 50 quistes por aislado (De Jonckheere, 1984), para comprobar que el promedio de las medidas presentadas por los organismos concordaran con las reportadas en la literatura para *N. fowleri*. Con los datos obtenidos se hizo el análisis estadístico descriptivo para obtener la media, mediana, máximos, mínimos y desviación estándar de los valores morfométricos de los aislados y a partir de ellos se elaboró una tabla donde se consolidó esta la información.

4.2 PRUEBAS DE TEMPERATURA

Debido a que *N. fowleri* es considerada como una ameba termofílica pues tiene la habilidad de crecer a temperaturas mayores ó iguales a 40° C (De Jonckheere, 2002), se realizó una prueba de temperatura para corroborar que los aislados identificados anteriormente por métodos morfométricos como pertenecientes al género *Naegleria* fueran resistentes a una temperatura de 45° C, ya que la termofilia es una característica importante para diferenciar a *N. fowleri*, de otras amebas. Los aislados se sometieron a esta prueba para corroborar que los aislados identificados como otro tipo de naeglerias pertenecieran a dicha especie, dado no todas las especies del género son termotolerantes (Page, 1988).

Los aislados identificados como del género *Naegleria* se resembraron en placas de agar NNE y se incubaron durante 48 horas a 45° C, haciendo observaciones cada 24 horas para ver su supervivencia y crecimiento, los aislados se consideraban termotolerantes después de haber sobrevivido a 45° C durante 48h sin enquistarse (De Jonckheere, 1979).

5. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

5.1 COSECHA DE CÉLULAS Y EXTRACCIÓN DE ADN

A los aislados identificados por morfología microscópica como pertenecientes al género *Naegleria*, se les realizó una extracción y purificación de ADN genómico, mediante el siguiente procedimiento: se resembraron de todos los aislados del género *Naegleria* y cuando hubo un crecimiento de aproximadamente el 75%, las células amebianas fueron cosechadas colocando 1 ml de agua destilada estéril en las placas, realizando un barrido a través de toda la placa, posteriormente, se extrajo la suspensión amebiana y se depositó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml.

Los tubos Eppendorf con la suspensión de amebas se centrifugaron en una microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5415C) a 3000 x g durante 10 min., para concentrar las células amebianas. Se desechó el sobrenadante en cloruro de benzalconio al 10% y la pastilla, que contenía a las amebas se lavó dos veces en Solución Salina en amortiguador de Fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) (Anexo 2).

La pastilla de células resultante fue utilizada para la extracción de ADN con el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI) con el cual se obtuvo ADN genómico de alta pureza. Para ello, se lavaron las células amebianas con PBS y se les añadió solución de lisis para romper los sistemas membranales celulares y así poder liberar el ADN nuclear, posteriormente se agregó RNAasa en solución para eliminar el ARN, para no crear falsos positivos al realizar el ensayo de la PCR debido a que el ARN podría mostrar similitudes entre la secuencia de nucleótidos presentes en su estructura y la secuencia específica de ADN que se busca para poder identificar a *N. fowleri*, también se le adicionó una solución para precipitar las proteínas con el fin de que la extracción de ADN de los aislados no presentara impurezas.

Las muestras tratadas, se centrifugaron y el sobrenadante (en el cual se encontraba el ADN) fue transferido a otro tubo, agregándole alcohol isopropílico, para precipitar el ADN extraído y posteriormente fue lavado con etanol al 70% y nuevamente con alcohol isopropílico. Al término de este tratamiento, se retiró todo el alcohol colocando la muestra en un desecador para permitir que en el tubo quedara solamente con el ADN amebiano, el cual fue rehidratado con un amortiguador y se almacenó a -20° C, hasta su análisis.

5.2 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

Con el ADN puro obtenido de los aislados se realizó la técnica PCR anidado, según el procedimiento descrito por Réveiller y colaboradores (2002) con el kit PCR Master Mix, PROMEGA (WI, USA). El PCR anidado consiste en realizar dos reacciones de PCR subsecuentes y dependientes una de la otra, pues, del primer PCR se obtiene un segmento de 166 pb, y es sometido a un segundo PCR donde, se amplifica un segmento de 110 pb, esta última secuencia es específica de una proteína ubicada en la membrana celular de *N. fowleri* quien se cree, esta implicada en la patogenicidad del organismo (Réveiller *et al.*, 2001).

En este trabajo, el primer PCR se realizó utilizando el ADN de los aislados identificados morfológicamente como pertenecientes al género *Naegleria* que previamente había sido extraído (ver cosecha y extracción de ADN). En un tubo se mezclaron 10 µl del

ADN extraído a una concentración de 10ng, 3 μ l de cada uno de los cebadores a 0.6 μ M (sus secuencias son descritas abajo) y con 34 μ l de los componentes del kit de los cuales 25 μ l correspondían a la "Master Mix" (mezcla de *Taq* polimerasa (enzima), dideoxínucleótidos trifosfatados (dNTP's) y cloruro de magnesio (amortiguador), y 9 μ l al agua libre de nucleasas, que incluía el kit, teniendo un volumen de reacción final de 50 μ l.

La "Master Mix" que incluye el kit es una mezcla elaborada a base de tres componentes principales: *Taq* polimerasa, la cual es la enzima que se encarga de aparear los nucleótidos complementarios al segmento de ADN que se quiere amplificar; el segundo componente son los dNTP's, los cuales son los nucleótidos que va a utilizar *Taq* polimerasa para poder construir la cadena complementaria del segmento, estos nucleótidos incluyen adenina, timina, guanina y citosina, y por último el cloruro de magnesio (MgCl₂) que es utilizado como un amortiguador que cataliza y mantiene el pH estable mientras las reacciones se llevan a cabo. Otro componente importante para poder realizar la PCR, son los cebadores los cuales son secuencias de nucleótidos que delimitan el segmento de ADN que se desea amplificar, por ello es que se utilizan en pares, el de inicio ("forward") y el de término ("reverse") (Alberts *et al.*, 1994).

El programa de temperaturas que se utilizó fue de 1 min a 95° C, 1 min a 65° C y 2 min a 72° C durante 35 ciclos, en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400. Los cebadores utilizados en este primer PCR, amplificaron un segmento de 166 pb y su secuencia fue la siguiente:

Forward 5'-TCCAGGGTTCGAAGCTTATCC-3'
Reverse 5'-AGTCTAGTTCATGGTACATTCC3'

Para incrementar la sensibilidad del PCR se hizo una segunda corrida, donde, se utilizó el ADN templado resultado de la primera reacción, de este ADN se mezclaron 15 μ l con 3 μ l de cada cebador a una concentración de 0.6 μ M y 29 μ l de los componentes del kit (25 μ l correspondían a la "Master Mix" y 4 μ l al agua libre de nucleasas), con lo que se obtenía un volumen final de reacción de 50 μ l.

El programa de temperaturas fue de 1 min a 95° C, 1 min. a 55° C y 1 min a 72° C durante 35 ciclos en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400. En la segunda reacción de PCR realizada se amplificó un segmento de 110 pb con los siguientes cebadores:

Forward 5'-GTACATGTTTTTAATTTTCC-3'
Reverse 5'-GTCTTTGTGAAAACATCACC3'

Esta técnica fue utilizada anteriormente (Marciano-Cabral *et al.*, 2003; MacLean *et al.*, 2004), para identificar a *N. fowleri*, de muestras obtenidas directamente del ambiente, que no habían sido sometidas a una extracción previa de ADN, por lo cual en el presente trabajo, se utilizó esta técnica con el propósito de corroborar el diagnóstico morfológico de los aislados.

5.3 ELECTROFORESIS DE ADN EN GEL DE AGAROSA

Para observar la amplificación del segmento de 110pb del segundo PCR (anidado), se preparo un gel de agarosa (Sigma Genosys, TX, USA) al 1.5 % (ver anexo 2) en solución amortiguadora de Tris Borato EDTA (TBE) a una concentración de 0.89 M: 0.89 M: 0.025 M respectivamente, ajustando su pH a 8.2 ó 8.3 si era necesario, teniendo una concentración final de 0.5 X (Anexo 2) y se agregaron 5 µl de bromuro de etidio. Se vertió el gel en forma líquida (50° C) sobre un molde y se colocó un peine de 15 carriles, para formar los pozos donde las muestras serían depositadas, se dejó madurar por 10 min. a temperatura ambiente y otros 10 min. en refrigeración, una vez que el gel solidificó se monto dentro de una cámara submarina, con amortiguador TBE 0.5X en cantidad suficiente para que cubriera al gel unos 5 mm sobre su superficie. Debido al número de muestras que se manejaron para esta prueba, se utilizaron dos geles de agarosa al 1.5 %, cada uno con 12 muestras de ADN templado.

Las muestras de ADN amplificado (ADN templado) que se obtuvieron del segundo PCR y los marcadores moleculares GeneRuler 1kb ADN Ladder #SM0311/2/3, MBI Fermentas (MD, EUA), fueron preparados con colorante (Sigma, TX, USA) para ponerlos dentro de los pozos como se especifica en el anexo 2. En este caso los marcadores moleculares fueron utilizados para conocer el tamaño (en número de pb) del segmento que se amplificó en las muestras de ADN templado que se sometieron al PCR anidado, pues, cada una de las bandas que muestran al revelarlos son de un tamaño ya conocido y especificado por el fabricante, se escogieron estos marcadores debido a que las bandas que se identifican van de 250 pb a 10,000.

Los marcadores (GeneRuler 1kb ADN Ladder MBI Fermentas, MD, USA) fueron colocados (Sigma, TX, USA) en los pozos 1 y 15 y las muestras preparadas de ADN templado en los pozos del 2 al 13 de cada gel. Se conecto la cámara submarina conteniendo el gel con las muestras y los marcadores moleculares a la fuente de poder aplicándoles 45 voltios, la carga de corriente eléctrica se detuvo hasta que la marca del colorante hubiera recorrido el 75% del gel. Posteriormente se revelaron los geles con una cámara de luz ultravioleta (Cole-Parmer, Ill, USA), la banda perteneciente a *N. fowleri* aparece a la altura de 110 pb. Se hizo el registro fotográfico con una cámara Polaroid MP4, utilizando un filtro anaranjado Wratten 23A y un filtro Wratten 2A UV y película instantánea Polaroid 665. La exposición fue tomada con apertura de lente de 4.5 f por 30 segundos.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo un análisis estadístico para conocer si era posible concluir que los parámetros ambientales (temperatura del atmosférica, temperatura del agua, conductividad, porcentaje de saturación de oxígeno disuelto, pH) y bacteriológicos (UFC de Bacterias Totales y Coliformes Totales) estaban relacionados ó no con la presencia ó ausencia de amebas del género *Naegleria* y con el número de aislados encontrados por estación y por muestreo.

Dado que los valores que se necesitaba utilizar para este análisis eran no paramétricos, es decir estaban combinados datos alfanuméricos y datos cualitativos, y además eran menos de treinta, se utilizó el Análisis de Coeficiente de Correlación por Jerarquías de Spearman (Daniel, 2002).

Se realizó un análisis por muestreo para conocer si algunos de los parámetros había sido determinante para la presencia ó ausencia de *N. fowleri* en alguno de los cuatro muestreos realizados, esto, se calculó obteniendo los logaritmos naturales de los valores conseguidos en cada una de las estaciones de muestreo y comparándolos entre sí. El análisis se llevo a cabo en el programa Statistical Package Social Science (SPSS).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. AISLADOS AMEBIANOS

Se llevaron a cabo 4 muestreos en los meses de: septiembre y octubre de 2004 y en enero y mayo de 2005, de los cuales se obtuvieron 69 muestras de agua: 16 fueron recolectadas en el primer y segundo muestreo, 18 en el tercero y 19 en el cuarto, las diferencias en el número de la muestras se debe a la disponibilidad de agua en los sitios seleccionados para la realización de este estudio en las albercas. Del total de muestras de agua obtenidas se aislaron e identificaron 84 organismos amebianos, 30 en el Muestreo I, 9 en Muestreo II, 18 en el Muestreo III y 27 en Muestreo IV, los cuales pertenecieron a 12 géneros y 23 especies (ver anexo 3, cuadro A). Las diferencias en la abundancia de las amebas aisladas e identificadas en los muestreos se puede atribuir al constante mantenimiento de las piscinas (que son generalmente lavadas con cloro) y al cambio de agua que proviene directamente del géiser, proporcionando una inestabilidad en las poblaciones amebianas en las estaciones de muestreo.

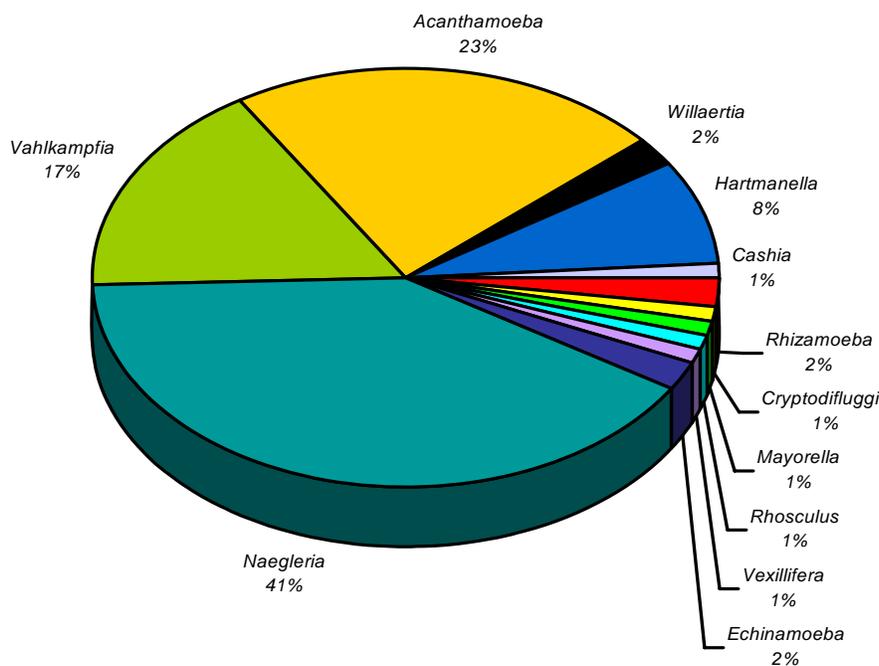


Figura 4. Porcentaje la presencia de los géneros encontrados en los cuatro muestreos.

Entre los géneros amebianos encontrados destaca la presencia de *Naegleria*, quien fue el más frecuentemente aislado (41%) con 24 aislados identificados, pertenecientes a dos especies: *N. gruberi* y *N. fowleri*, seguido del género *Acanthamoeba* (23%) y *Vahlkampfia* (17%) (figura 4). Es importante desde el punto de vista epidemiológico la presencia de aislados del género *Naegleria* y *Acanthamoeba* en las aguas de las piscinas muestreadas porque albergan especies reportadas como patógenas para el humano, como *N. fowleri*, *A. castellanii* y *A. polyphaga*, las cuales pueden provocar enfermedades como la MEAP, EAGP y la queratitis amebiana (Lehman *et al.*, 1998; Mathers *et al.*, 2000; Muñoz *et al.*, 2003; Hara, y Fukuma, 2005).

En este estudio no se evaluó el impacto o la existencia de competidores para *N. fowleri*, sin embargo, y dado que este ambiente es considerado extremo por la temperatura (57.1° C, en el géiser), pH (hasta 10) y la conductividad en el agua (la mayor fue de 3550 μ S), es probable que este sistema se encuentra libre de organismos que rivalicen con esta ameba por alimento y por lo tanto las poblaciones de *N. fowleri*, sean estables y no estén limitadas en su crecimiento (Griffin, 1983), esto pudo ser un factor que determinó el aislamiento de *N. fowleri* durante todos los muestreos.

2. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

Con las claves dicotómicas de Page (1966, 1975, 1976 y 1988) para la identificación de gimnamebas, se identificaron 24 aislados del género *Naegleria* de los cuales trece corresponden a la especie *N. fowleri*, cuatro fueron ubicados como *N. gruberi* y siete pudieron ser identificados solo hasta nivel de género (*Naegleria* spp.) (cuadro 3).

Cuadro 3. Aislados identificados como *N. fowleri*, *N. gruberi* y *Naegleria* spp. y temperatura del agua a la que fueron aislados.

Género y especie	Clave del aislado	T° del agua (°C)	Género y especie	Clave del aislado	T° del agua (°C)	
<i>Naegleria fowleri</i>	K(I)11	38.3	<i>Naegleria</i> spp.	K(I)8B	43.7	
	K(II)13	36.1		K(II)12	36.7	
	K(III)8	34.1		K(III)7	44.5	
	K(III)14	36.5		K(III)9	35.9	
	K(IV)4	52.4		K(III)15	36.7	
	K(IV)6	48.2		K(IV)11	33.5	
	K(IV)8	41.9		K(IV)12	33.4	
	K(IV)10	33.6				
	C(I)5s	41.4				
	C(I)11A	38.3		<i>N. gruberi</i>	K(I)5S	41.4
	C(II)8	43.9			K(I)10	38.3
	C(II)15	36.1			K(III)11	35.5
	C(III)13	36.6			K(IV)13	37.7

K y C: Nombre del recolector; I, II, III y IV: Número de muestreo; S: sedimento; A y B: Clave del tipo de aislado

La identificación morfológica de los aislados se realizó mediante microscopia de luz en contraste de fases, en cada una de las preparaciones para determinar la presencia de *Naegleria fowleri* se buscó la forma limax en el trofozoíto (figura 5), con un solo pseudópodo de avance, de citoplasma hialino (sin gránulos aparentes), con un núcleo muy evidente, un uroide no muy aparente (la parte de arrastre de la ameba). En el caso del quiste, la forma que se observó, fue redonda con los bordes del exoquiste lisos, sin endoquiste aparente, y la presencia de gránulos perinucleares en forma de anillo alrededor del núcleo. Adicionalmente, durante la identificación de los aislados se tomaron microfotografías, en la figura 5 se muestran las formas tróficas y quísticas de *Naegleria fowleri*.

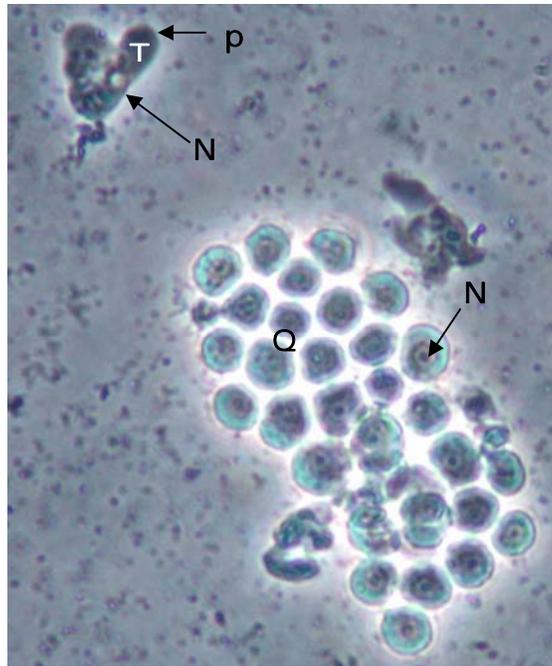


Figura 5. Vista de un conglomerado de quistes y varios trofozoítos de *N. fowleri*. Q: estado quístico de la ameba en donde se puede observar el núcleo (N) bordeado por los gránulos perinucleares acomodados en forma de anillo. T: trofozoíto de *N. fowleri*, se puede observar la forma limax de la ameba, el pseudópodo (P) de avance. Fotografía tomada en un microscopio invertido Nikon Eclipse TS100 a 40x.

Por otra parte, la identificación de *N. gruberi*, se hizo por la observación detallada de la forma quística de los organismos amebianos aislados, el quiste de *N. gruberi*, se caracteriza por ser ovoide con paredes irregulares y más grande que el quiste de *N. fowleri* (de 6 a 18 μm , Page, 1988), sin embargo, las medidas mostradas por los quistes de los aislados identificados como *N. gruberi* hallados en este estudio, no eran las comúnmente encontradas para esta especie, y no diferían a las mostradas por los quistes de *N. fowleri*, lo cual hizo considerar la necesidad de aplicar una prueba de identificación más específica como PCR. Un caso similar se presentó con los aislados identificados como *Naegleria* spp., los cuales tenían, medidas muy similares a las reportadas para *N. fowleri*. Las medidas del largo y el ancho del trofozoíto y diámetro del quiste de las amebas en los aislados identificados mediante morfología como pertenecientes al género *Naegleria*, se presentan más abajo en el apartado 2.1 "Medición de trofozoítos y quistes".

Como se puede observar en el cuadro 3, las temperaturas a las cuales se recolectaron los aislados identificados como *N. fowleri*, *N. gruberi* y *Naegleria* spp., varían de entre los 33.4° C y hasta los 52.4° C con una temperatura promedio de 38.8°C, Sykora y colaboradores (1983), reportan que la temperatura óptima para aislar a *N. fowleri* puede estar entre 27° C hasta los 35° C, estas temperaturas fueron menores a las obtenidas en este trabajo, sin embargo, Kyle y Pittman (1986), lograron aislar a *N. fowleri*, a 45° C, de igual manera, Sheehan y colaboradores (2003) consiguieron aislar a *N. fowleri*, a temperaturas superiores a 35° C (38 y 40° C), estos reportes coinciden con las temperaturas de aislamiento aquí presentadas. No obstante se halló un aislado que fue colectado a una temperatura de aislamiento que no ha sido reportada para *N. fowleri*, hasta el momento (52.4° C), Tiewchaloren y Junnu (1999) señalan que *N. fowleri* no

sobrevive a temperaturas mayores de 50° C por 24 h, por lo que se cree, que este aislado fue colectado en forma de quística y por lo tanto, había sido recientemente inoculado en la estación de muestreo antes de ser colectado, y que al estar en cultivo en laboratorio, se transformo al estado trofozoíto.

Los cuatro aislados identificados como *N. gruberi*, se aislaron también a temperaturas no típicas de este organismo (35.5°C- 41.4° C) ya que esta no es una ameba termófila, aunque si termotolerante debido a que es capaz de sobrevivir a temperaturas mayores de 40° C, pero no crece, ni se alimenta (Page, 1988); se cree que esto pudo haberse presentado una situación semejante a la causada con el aislado de *N. fowleri* colectado a 52.4°C. De igual forma, los siete aislados a los que solo se les identificó hasta el nivel taxonómico de género, fueron colectados en temperaturas de entre los 33.4° C hasta los 44.5°C, por lo que existía la posibilidad de que alguno de estos aislados pudiera corresponder a *N. fowleri*.

Cuadro 4. Lugares donde se identifico la presencia de *N. gruberi* *N. fowleri* y *Naegleria* spp.

LUGAR	ESTACIÓN	NÚMERO DE AISLADOS	ESPECIE
Géiser	01	0	Otras
Acueducto subterráneo 1	02	0	Otras
Acueducto aéreo	03	0	Otras
Acueducto subterráneo 2	04	1	<i>N. fowleri</i>
Alberca cercana al río	05	2	<i>N. fowleri</i> y <i>N. gruberi</i>
Alberca para enjabonar	06	1	<i>N. fowleri</i>
Acueducto subterráneo 3	07	1	<i>Naegleria</i> spp.
Chapoteadero	08	4	<i>N. fowleri</i> (3) y <i>Naegleria</i> spp.
	09	1	<i>Naegleria</i> spp.
	10	1	<i>N. fowleri</i>
	11	5	<i>N. fowleri</i> (3), <i>N. gruberi</i> y <i>Naegleria</i> spp.
Alberca grande	12	2	<i>Naegleria</i> spp.
	13	3	<i>N. fowleri</i> (2) y <i>N. gruberi</i>
	14	1	<i>N. fowleri</i>
	15	2	<i>N. fowleri</i> y <i>Naegleria</i> spp.
Fosa	16	0	Otras
	17	0	Otras
	18	0	Otras
	19	0	Otras

Los números entre paréntesis representan el número de muestreos en los que apareció el aislado.

Otro punto importante, es que los 24 aislados identificados, según el diagnóstico morfológico, como *N. fowleri*, *N. gruberi* ó *Naegleria* spp. (cuadro 4) se concentran en 4 de las 5 piscinas que conforman este centro recreativo y en 2 acueductos subterráneos que desembocan en el río, esto pudo deberse a factores tales como: abastecimiento de las piscinas por agua contaminada (Kyle y Pittman, 1986; Hoffman y Michael, 2001), ausencia de techo ó protección contra el viento ó lluvia en las piscinas, en este sentido autores como Kingston (1969), señalan que quistes de AVL pueden llegar a las aguas de las piscinas por el aire, en este caso cualquiera de los dos factores anteriormente descritos son fuentes difíciles de controlar, especialmente en el sitio de estudio del presente trabajo. Otros factores de inoculación de amebas en los sitios de muestreo pueden ser debidos a la caída de ramas ó insectos dentro del agua, tierra suelta en los

alrededores de las piscinas, etc., además, se observó que hay algunas actividades que realizan los bañistas que ayudan a la proliferación de AVL en las piscinas como: no lavarse los pies antes de entrar a las piscinas, introducir objetos diversos y no bañarse antes de nadar entre otras. La ausencia de *N. fowleri*, en algunas estaciones probablemente se haya debido a que estas estaciones presentaban las temperaturas más altas (ver anexo 4) durante los muestreos ya que habían sido recientemente llenadas de agua termal y por lo tanto no habían sido inoculadas de AVL por los bañistas ó el aire.

2.1 MEDICIÓN DE TROFOZOÍTOS Y QUISTES

Para poder realizar una adecuada identificación morfológica, se llevaron a cabo mediciones morfométricas de cincuenta células amebianas en forma quística y cincuenta en forma de trofozoíto, los valores de las medidas del diámetro de los quistes y los valores del ancho y el largo de los trofozoítos se presentan en el anexo 1 (cuadros A, B y C).

Las medidas del diámetro del quiste, de los aislados correspondientes a *N. fowleri*, se encontraron entre 7.28 y 12.20 μm con una media total de 9.27 μm . coincidiendo con el ámbito establecido por John (1993), para el diámetro del quiste de *N. fowleri*, el cual, es de 7 a 15 μm . En el caso de los quistes de los aislados identificados como *N. gruberi* las medidas variaron entre 9.05 y 9.28 μm con una media de 9.18 μm , para los aislados identificados como *Naegleria* spp. sus medidas oscilaron entre 8.01 y 10.92 μm con una media de 8.81 μm , como se puede observar las medidas de los quistes de *N. gruberi* y *Naegleria* spp., se encuentran dentro del ámbito de los valores promedio de los quistes de *N. fowleri* reportados en la literatura (Page, 1988; Schuster y Visvesvara, 2004b).

Respecto al trofozoíto, las mediciones del ancho de los aislados identificados morfológicamente como *N. fowleri* oscilaron entre los 2.95 y 12.79 μm con una media de 7.18 μm ; y de largo los valores van de 14.02 μm hasta los 21.45 μm con una media de 17.71 μm , estos valores concuerdan con lo descrito por John (1993), quien dice que el trofozoíto mide cerca de 15 a 30 μm de largo mientras se encuentra activo; cuando se encuentra en reposo se redondea y mide entre 9 a 15 μm de diámetro, los valores dados en este trabajo son, en su mayoría, de trofozoítos activos, sin embargo, no se encontró en la literatura valores con los cuales comparar el ancho del trofozoíto Para los aislados de *Naegleria* spp., el largo del trofozoíto va de 17.45 a 23.51 μm con una media de 20.56 μm y el ancho va de 4.13 a 5.36 μm con una media de 4.60 μm , en el caso de los aislados correspondientes a *N. gruberi*, el largo fluctúa entre los 16.13 y 25.76 μm con una media de 20.94 μm y el ancho se ubica entre los 4.97 y 6.89 μm con una media de 5.93 μm .

Para los trofozoítos ocurrió un caso similar al de los quistes, las medidas del largo de los trofozoítos de los aislados de *Naegleria* spp. y *N. gruberi*, están dentro del ámbito en el que se reportan (Page, 1988; Schuster y Visvesvara, 2004b) las medidas del largo del trofozoíto para *N. fowleri*.

2.2 PRUEBA DE TEMPERATURA DE LOS AISLADOS IDENTIFICADOS COMO *N. fowleri*, *N. gruberi* Y *Naegleria* spp

Como parte del diagnóstico morfológico, se realizó una prueba de temperatura, utilizada como una característica de identificación y también de aislamiento de *N. fowleri* a partir de muestras de agua (De Jonckheere y Van de Voorde, 1977; Rivera *et al.*, 1983; Tyndall *et al.*, 1989). En el cuadro 5, se puede observar que de los 24 aislados que se ensayaron para tolerancia a la temperatura, 23 fueron termotolerantes, es decir, permanecieron en forma de trofozoíto después de 48h a 45° C.

En el caso de *N. fowleri*, 12 de los 13 aislados, que se habían identificado por morfología como pertenecientes a esta especie, resultaron positivos en esta prueba, excepto, el aislado K(III)14 que formo quistes antes de transcurrido el tiempo de la prueba, esto pudo deberse, a que la cantidad de trofozoítos presentes en el cultivo no fue suficiente para soportar la prueba, otra opción es que, este aislado no pertenezca a *N. fowleri* pues resulta improbable que haya perdido la capacidad de soportar 45° C, pues, ya que hasta el momento no se han reportado casos en los que debido al cultivo en laboratorio los organismos amebianos pierdan la capacidad de soportar altas temperaturas.

Cabe resaltar que todos los aislados correspondientes a *N. gruberi* (K(I)5S, K(I)10, K(III)11 y K(IV)13), crecieron bien a la temperatura de 45° C, poniendo en duda, el diagnóstico obtenido por microscopia, debido a que la máxima temperatura de cultivo para *N. gruberi* es de 39° C, en una de sus variantes, a la cual De Jonckheere (2002) llama *N. gruberi sensu stricto*, y los aislados presentados en este trabajo, toleraron temperaturas de 45° C durante 48h. De la misma manera, todos los aislados identificados como *Naegleria* spp. (K(I)8B, K(I)12, K(III)7, K(III)9, K(III)15, K(IV)11 y K(IV)12) toleraron la temperatura de 45°, indicándonos que las especies a las que corresponden estos aislados son termófilas.

Estos resultados, pusieron de manifiesto la necesidad de realizar otro análisis para comprobar o descartar la identificación morfológica que se había hecho previamente, optando, por una prueba molecular, llamada PCR anidado que fue desarrollada por Réveiller y colaboradores (2001), de la cual, sus resultados se presentan más adelante.

Cuadro 5. Resultados de la prueba de temperatura a las 24h y 48h a 45° C.

AISLADO	24h	48h	AISLADO	24h	48h
K(I)5S	+	+	K(IV)4	+	+
K(I)8B	+	+	K(IV)6	+	+
K(I)10	+	+	K(IV)8	+	+
K(I)11	+	+	K(IV)10	+	+
K(I)12	+	+	K(IV)11	+	+
K(II)13	+	+	K(IV)12	+	+
K(III)7	+	+	K(IV)13	+	+
K(III)8	+	+	C(I)5s	+	+
K(III)9	+	+	C(I)11a	+	+
K(III)11	+	+	C(II)8	+	+
K(III)14	-	-	C(II)15	+	+
K(III)15	+	+	C(III)13	+	+

El signo de (“+”) indica supervivencia y crecimiento, mientras que el de (“-“), enquistamiento.

3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

3.1 TEMPERATURA DEL AGUA (°C)

Durante los muestreos se pudo distinguir la formación de un gradiente de temperaturas en las aguas de las estaciones de muestreo que se utilizaron para este estudio (figura 6), como se puede observar en la figura 3, las albercas, en donde se situaron las estaciones, son alimentadas mediante acueductos aéreos que transportan el agua termal desde su origen, el géiser, hasta las albercas. Estos acueductos cuentan con salidas hacia cada una de las albercas que pueden ser selectiva e individualmente bloqueados, permitiendo que mientras una alberca se este llenando la otra pueda permanecer vacía. Sin importar el orden en que fueron muestreadas las albercas para este trabajo, la temperatura del agua va disminuyendo a medida que el agua tarda más tiempo en llegar desde el origen hasta la piscina, de manera que, por ejemplo, en la estación 6 (Alberca para enjabonarse) se presentan temperaturas superiores a las encontradas en la estación 5 (Alberca cercana al río)(anexo 4, cuadro A) esto se debe a que hay una mayor distancia que el agua tiene que recorrer para poder llegar a la estación 5 que a la estación 6, este gradiente de temperaturas se observa en los cuatro muestreos realizados.

Sin embargo las estaciones 7, 13, 14, 15, 16 y 17 del Muestreo IV presentaron temperaturas superiores a las registradas en las estaciones de muestreo anteriores, este fenómeno se debió a que las albercas donde se ubican estas estaciones habían sido recientemente llenadas con agua termal en comparación con las demás estaciones, las cuales ya tenían algunas horas de haber sido ocupadas con agua, lo que le dio oportunidad al agua para templarse.

Como se muestra en el anexo 4, el ámbito en que se encontraron las diferentes temperaturas durante los cuatro muestreos oscilaba entre 57.1° hasta 33.4° C (anexo 4, cuadro A), mostrando siempre las temperaturas más altas en las primeras estaciones (géiser) y las más bajas en las piscinas en las que el agua llegaba hasta el final, para el Muestreo I la temperatura más alta fue de 56° C y la más baja de 36.7°C, en el Muestreo II los rangos oscilaban de entre 57.1° a 36.2°C, para el Muestreo III la temperatura del agua fluctuó entre 56° y 34.1° C, y en el Muestreo IV vario de entre 53.8° a 33.4°C, las temperaturas más altas se presentaron en el Muestreo II, realizado en el mes de octubre y las más bajas en el Muestreo IV, efectuado en mayo.

Es notable que en algunas estaciones donde el agua contaba con temperaturas mayores de 45°C, no se encontrara, ninguna ameba, incluyendo *N. fowleri*, lo cual puede ser un indicativo, de que existen limitantes, diferentes a la temperatura, para el crecimiento de las AVL, dentro de este sistema y dado que la temperatura atmosférica y la temperatura del agua permanecieron estables a lo largo de este estudio, no se cree que estos valores sean una limitante para la presencia ó ausencia de *N. fowleri*, Tyndall y colaboradores (1989) sugieren que la temperatura del agua no es el principal factor que afecta la distribución de *N. fowleri* ya que se ha aislado desde los 16° C hasta los 45° C, además, MacLean y colaboradores (2004), proponen que la temperatura del agua y la presencia de bacterias coliformes no son los únicos factores que influyen la distribución de *N. fowleri*, también Sykora y colaboradores (1983), señalan que la relación entre las elevadas temperaturas del agua y la presencia de *Naegleria*, no esta siempre bien definida, por lo cual, probablemente la temperatura del agua no sea un factor limitante para el establecimiento y crecimiento de *N. fowleri*.

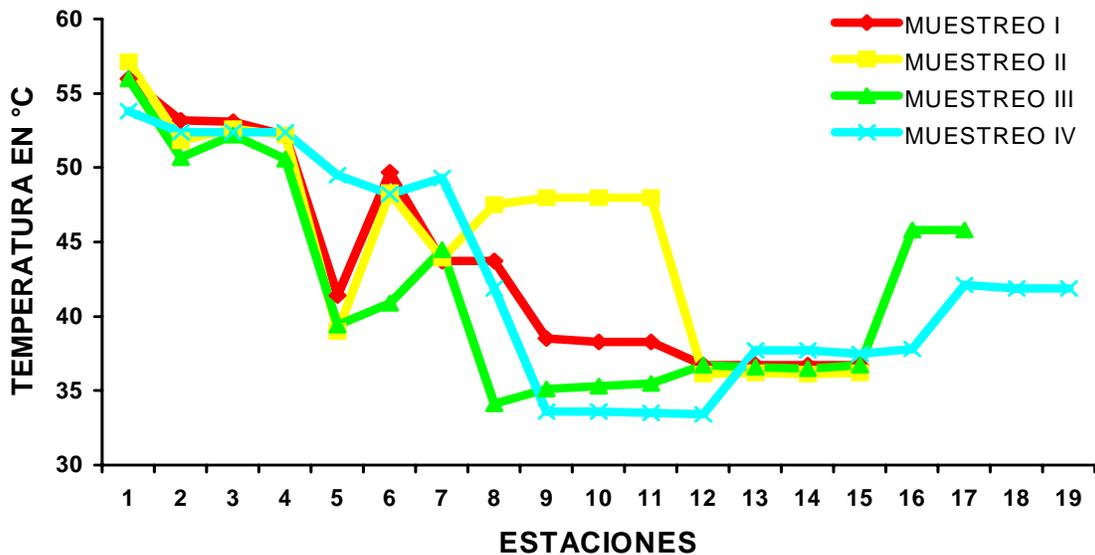


Figura 6. Comportamiento de los valores de la temperatura del agua a lo largo de los cuatro muestreos.

3.2 TEMPERATURA ATMOSFÉRICA (°C)

Para este trabajo era necesario conocer la temperatura atmosférica pues se quería conocer si afectaba en algo a la temperatura del agua ó a la presencia y aislamiento de *N. fowleri*, en las aguas del balneario. Como se puede observar la temperatura atmosférica permaneció constante entre los diferentes muestreos, a excepción del Muestreo III (figura 7), esto se debió a que el muestreo se realizó en el mes de Enero, en temporada de secas. Respecto a la temperatura en las diferentes estaciones también permanecieron estables siendo la más alta de 33.9° C en la estación 8, Muestreo II y la más baja de 21.4° C estación 3, Muestreo III (anexo 4, cuadro B). Para el Muestreo I las temperaturas atmosféricas oscilan entre 25.1° C y 33° C, en el Muestreo II las temperaturas van de 24.8° C a 33.9°C, el Muestreo III presentó temperaturas de entre 21.4° C a 25.9° C y finalmente en el Muestreo IV, las temperaturas fluctuaron entre 21.1° C y 30.6° C.

Aunque por lo general la temperatura ambiente es un factor limitante en la distribución de las especies, en realidad no es más importante que otros factores en la adaptación total de la especie (Margalef, 1995). Huizinga y McLaughlin (1990) realizaron un estudio amebológico en el Lago Clinton, EUA durante una temporada donde la temperatura atmosférica era particularmente elevada debido una sequía, y encontraron que ninguna *N. fowleri* había sido aislada en el lago durante ese periodo de tiempo, en contraste con los aislamientos que habían realizado antes de esa temporada, por lo cual propusieron que las temperatura atmosférica no era determinante para el aislamiento de *N. fowleri*.

No obstante, Kyle y Pittman (1984 y 1985) señalan que en la primavera se presentaba un incremento gradual en las poblaciones de *Naegleria*, de manera que, durante la temporada de lluvias, *Naegleria* era la ameba más comúnmente aislada, sin embargo, esta tendencia no se observa en este trabajo, quizás debido a que el sistema que se estudio no es un lago, sino un cuerpo de agua artificial creado y mantenido por el hombre.

Sykora y colaboradores (1983), aseguran que la distribución de las cepas termófilas de *Naegleria* están limitadas por la temporada del año y que su incidencia se incrementa en temporada de lluvias, sin embargo, en este trabajo el incremento en la incidencia de *Naegleria* se percibió pero en temporada de secas, esto quizás, a que en el área de estudio todo el año la temperatura permanece constante, pero en temporada de secas, hay una mayor cantidad de visitantes.

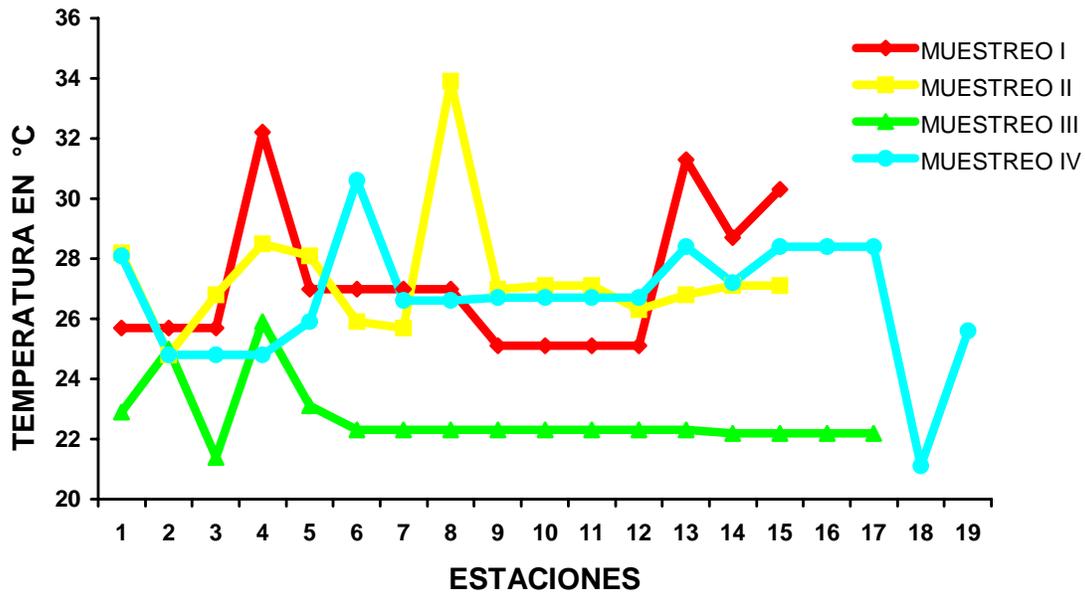


Figura 7. Comportamiento de los valores de la temperatura atmosférica a los largo del los muestreos.

3.3 pH

Una de las condiciones que puede llegar a determinar la presencia o ausencia de AVL en el medio acuático es que el cuerpo de agua en donde se encuentren debe tener un pH, de entre 4.5 a 9.5 (Rodríguez- Zaragoza, 1994), en el caso de *N. fowleri*, esta puede proliferar en cuerpos de agua mantenidos y creados por el hombre a pH de entre 7.4 y 11.4 (De Jonckheere y Van de Voorde, 1977).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los valores del pH en las diferentes estaciones y entre los muestreos permaneció muy estable, ya que los valores máximos y mínimos fueron de 9.3 y 10 respectivamente (anexo 4, cuadro C), a lo largo de los cuatro muestreos, estos valores concuerdan con los ámbitos mencionados por la literatura para cuerpos de agua artificiales además, Kyle y Pittman, en los estudios que realizaron en 1985 y 1986, en los lagos de aguas termales Willard's Pond y lago Issaqueena, en EUA y pudieron recolectar AVL en un ámbito de pH de 6.3 a 8.8, por su parte, Tiewchaloren y Junnu (1999) reportan que a pH's de 5 a 12 los trofozoítos de *N. fowleri*, pueden sobrevivir y ser viables, y consideraron que el pH no es un factor limitante en la distribución y presencia de AVL.

Como se puede observar en la figura 8, los valores del pH para el Muestreo I oscilaban entre 9.3 y 9.5, en el Muestreo II estos valores variaban entre 9.4 y 9.5, el Muestreo III

presentó valores de 9.5 a 9.8 y el Muestreo IV mostró valores que iban desde 9.4 hasta 10.

La presencia de valores de pH tan básicos en el agua quizás es debido al tipo de suelo del lugar que es Feozem el cual se caracteriza por tener un pH básico (7-8) (INEGI, 1992), En el caso de la estación 8, del Muestreo IV (que se realizó en mayo), donde se presentó el valor más alto de pH (10), pudo haberse debido a algún incremento de los carbonatos y los bicarbonatos, lo que pudo derivar en el incremento del pH hasta un valor de 10, este fenómeno se da principalmente en los meses cálidos como, en este caso, mayo (Arredondo y Ponce, 1998).

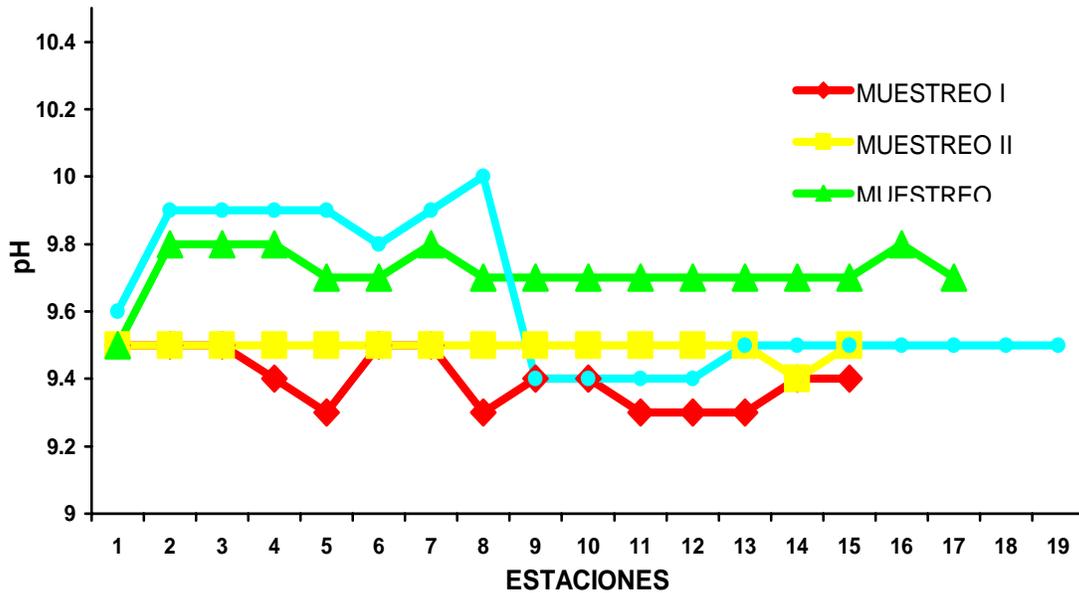


Figura 8. Valores de pH de las diferentes estaciones a lo largo de los muestreos.

Sin embargo, y a pesar de que estos rangos de pH son tolerados por *N. fowleri*; según el Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-000-SSA1-2005, los valores permisibles para el pH de albercas de contacto primario con el hombre son de 7.2 a 7.6 (Secretaría de Salud, 2005), valores que están por debajo de los aquí presentados, por lo cual se recomienda buscar un método que ayude a disminuir el pH de las albercas que a la par reduzca también las poblaciones amebianas.

3.4 CONDUCTIVIDAD ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)

En los cuerpos de agua dulce naturales, por lo general se registran valores de entre 20 a 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ (Arredondo y Ponce, 1998), sin embargo, en este trabajo se encontraron valores de conductividad de entre los 1897 y los 3550 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ (anexo 4, cuadro D), valores elevados respecto a los ya mencionados, aunque, debemos tomar en cuenta que en este trabajo se estudiaron cuerpos de agua (albercas) abastecidos por aguas naturales (provenientes de un géiser), pero creados y mantenidos por el hombre, además de que se ven afectados por el contacto que tienen con los humanos, ya que son utilizados para la recreación, lo cual puede afectar los valores de conductividad que presenten.

A través de los cuatro muestreos los valores permanecieron estables (figura 9), encontrándose los más elevados en el Muestreo III y los más bajos en el Muestreo IV. La conductividad encontrada en el Muestreo I fue de entre 2500 a 2800 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, para el Muestreo II, los resultados obtenidos fueron de entre 2710 y 3050 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, el Muestreo III presento valores que oscilaban entre 2880 y 3520 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ y finalmente en el Muestreo IV los valores fluctuaron entre 1897 y 2963 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ (anexo 4, cuadro D).

De hecho la presencia de estas medidas de conductividad nos aseguran la presencia de suficientes partículas disueltas en el agua como para que *N. fowleri*, pueda adherirse y mantenerse en la superficie del agua (Kyle y Pittman, 1985) cuando se encuentre en estado trofozoíto, donde la cantidad de oxígeno es abundante y no en los sedimentos donde hay ambientes anóxicos (Tyndall *et al.*, 1981).

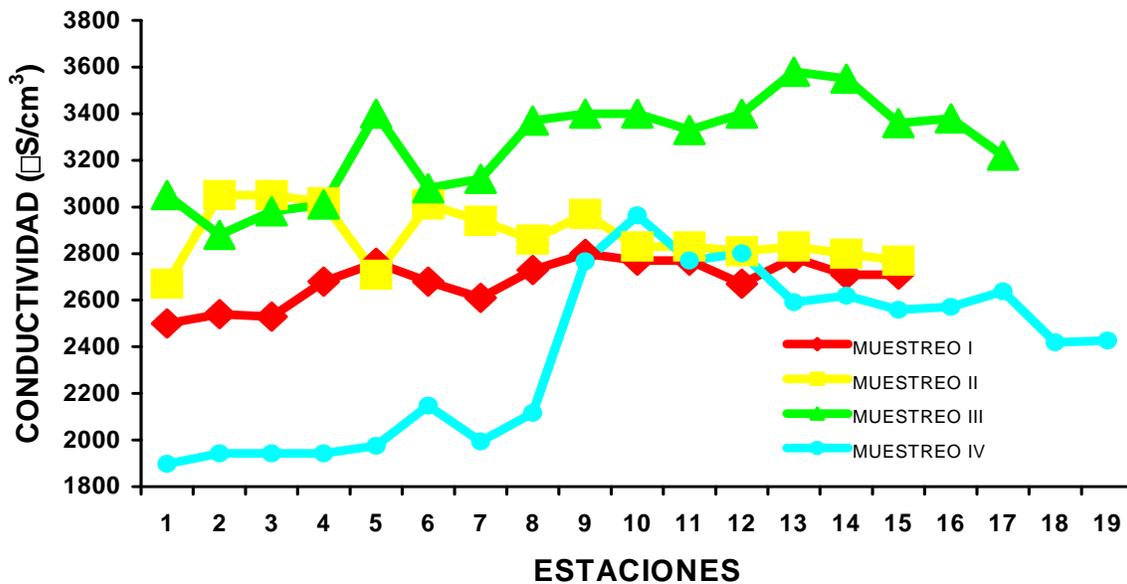


Figura 9. Valores de conductividad a lo largo de los muestreos

Algunas veces al adherirse a estas partículas, con la ausencia de corriente en el cuerpo de agua y de manera fortuita en ambientes naturales, las amebas, forman microagregados compuestos por cantidades variables de organismos, los cuales al ser inhalados por algún usuario de las albercas, pueden provocar una inoculación de *N. fowleri*, que podría desatar un episodio de MEAP, en quien la haya inhalado, esto, siempre y cuando la dosis infectiva sea suficiente para desatar una infección. La formación de microagregados se puede observar inclusive en cultivos axénicos (Cabanés *et al.*, 2001).

Además la presencia de iones disueltos en el agua podría servir para explicar las cantidades de UFC de coliformes totales y de UFC de bacterias totales pues estos iones le proporcionan los nutrientes inorgánicos esenciales para su crecimiento y sobrevivencia y a su vez, estas bacterias podrían servir a las poblaciones de amebas existentes en las albercas como alimento (Rodríguez- Zaragoza, 1994).

3.5 OXÍGENO DISUELTO: PORCENTAJE DE SATURACIÓN DE OXÍGENO DISUELTO (%).

El porcentaje de saturación de oxígeno disuelto es un parámetro muy importante para poder mantener las poblaciones amebianas, ya que la diversidad de amebas decrece cuando en el agua, las cantidades de oxígeno disuelto son casi nulas pues las amebas son organismos aerobios (Kyle y Pittman, 1985). Los valores, en esta prueba fisicoquímica variaron entre 40 y 60% (figura 10), a lo largo de los cuatro muestreos, lo que nos indica una baja variabilidad en los porcentajes, En el caso del Muestreo I las cantidades del porcentaje de saturación oxígeno disuelto variaron entre 45.6 y 66.2%, en el Muestreo II las cantidades oscilaron entre 41.3 y 81.2%, para el Muestreo III los porcentajes de saturación de oxígeno fluctuaron entre 20.1 y 60.5%, mientras que en el Muestreo IV variaron entre 42.1 y 78%.

Como se puede observar la mayoría de los valores se encuentra estables entre 40 y 60%, sin embargo hay algunos valores que exceden estos límites como 20.1% en la Estación 6 Muestreo III y 81.2% en las Estaciones 10 y 11 en el Muestreo II (anexo 4, cuadro E), estos valores quizás se debieron, a la temperatura a la que se realizaron las mediciones.

La razón para los valores del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto presentes en las demás estaciones de muestreo podría ser la tasa de transferencia de oxígeno, que se encuentra afectada por la temperatura, puesto que la actividad metabólica de los organismos y el consumo de oxígeno son función de la temperatura, el agotamiento de oxígeno en situaciones de aislamiento es más rápido bajo una temperatura elevada (Margalef, 1995) y tomando en cuenta las altas temperaturas en este sistema, probablemente esta tasa se vea afectada por la temperatura de las estaciones sin embargo, el impacto de este fenómeno se ve disminuido debido a varios factores entre ellos, la presencia de bañistas dentro de las estaciones de muestreo (albercas) que mantiene en constante movimiento al agua, proporcionándole aireación, otro factor podría ser la disminución gradual de la temperatura en las estaciones de muestreo debido al gradiente de temperaturas del cual se hablo anteriormente, lo que haría más fácil la disolución del oxígeno en el agua, esto puede ilustrarse con lo sucedido en el Muestreo II, que se realizó en temporada de secas, en el cual, la afluencia de visitantes a el parque recreativo “El Géiser” aumentó, y al haber mayor cantidad de visitantes que llevaban a cabo diferentes actividades en las albercas, le proporcionaban mayor recirculación mecánica al agua.

Otro factor que probablemente incremente las concentraciones del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto sea la turbulencia debida al transporte del agua desde la primera estación de muestro (el géiser) hasta las demás estaciones de muestreo, dado que el transporte de oxígeno es más rápido cuando el agua se encuentra en movimiento, pues pequeños volúmenes de agua se mueven en uno y otro sentido, acelerando la difusión y favoreciendo así el intercambio de gases del agua con la atmósfera(Arredondo y Ponce, 1998) y por último, la poca profundidad de las albercas, pues se facilita la difusión del oxígeno a través de esta capa delgada de agua.

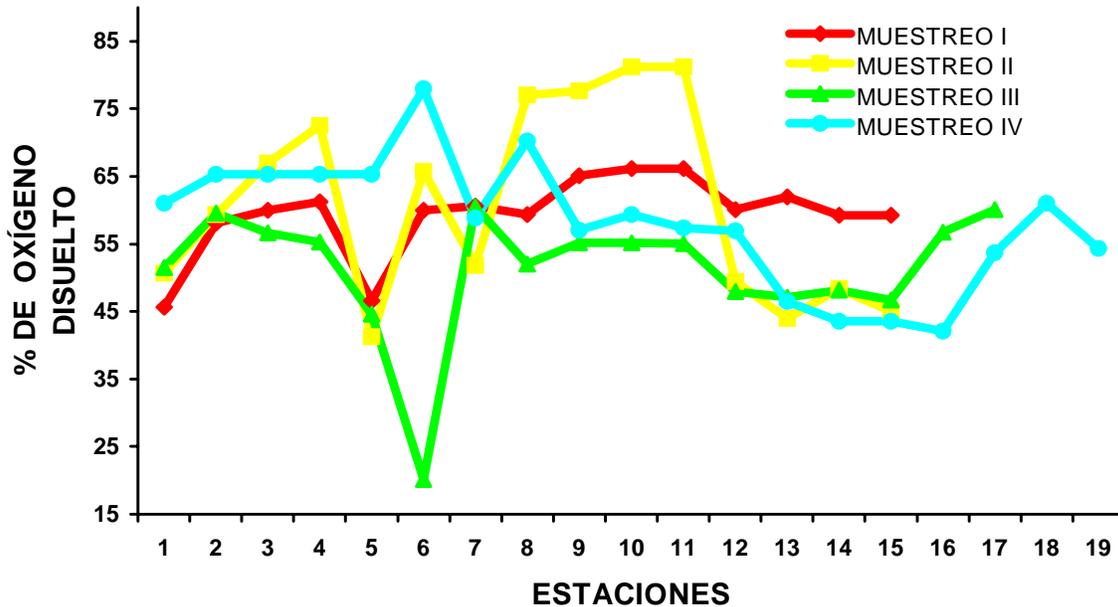


Figura 10. Valores del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto a lo largo de los muestreos.

4. ANÁLISIS BACTERIOLÓGICOS

4.1 COLIFORMES TOTALES

Este parámetro resultaba importante para este trabajo debido a la existencia de reportes que afirman que *N. fowleri* puede aparecer más frecuentemente en agua contaminada con elevadas concentraciones de coliformes totales (Sykora *et al.*, 1983; Marshall *et al.*, 1997), sin embargo, las cantidades de UFC que se encontraron para coliformes totales no sobrepasaron las 5000 UFC/100 ml (cuadro 6), durante los cuatro muestreos, además las cantidades de Coliformes totales que aparecen en las estaciones donde se colectaron los aislados que fueron identificados como *N. fowleri*, *N. gruberi* y *Naegleria* spp. son bajas (250 UFC/100ml) respecto a las reportadas en el trabajo de Sykora y colaboradores (1983) que van de 326 a 5934 UFC/100ml, quizás las amebas de este sistema compensan la falta de Coliformes con bacterias de otro tipo, esto podría ser posible si observamos los valores presentados en el cuadro 8, donde las cantidades de bacterias totales, que se presentan en las estaciones, donde se aislaron especies del género *Naegleria*, son más de 300,000 UFC/ml (TMTC, por su nombre en inglés Too Much To Count), según el Kit que se utilizó para medir estos parámetros.

Las UFC encontradas para coliformes totales en el Muestreo I y II van desde 100 hasta 5000, en el Muestreo III las cantidades varían entre 100 a 200 UFC/100ml y para el Muestreo IV las cantidades oscilan entre 150 y 300 UFC/100ml, estos valores nos indican una mala calidad bacteriológica en las estaciones de muestreo (albercas), ya que si tomamos en cuenta que su hábitat natural son los intestinos de los mamíferos, es posible suponer que las poblaciones de coliformes totales que se pueden encontrar en esta agua, son inoculadas por los bañistas que acuden al balneario (De Jonckheere, 1982), esto es muy probable porque el balneario no cuenta con las medidas higiénicas necesarias para evitar la proliferación de AVL, por ejemplo, a los visitantes no se les exige que tomen un baño antes de entrar a las albercas. Cabe destacar que a pesar de

que no en todas las estaciones de muestreo se determino coliformes totales y bacterias totales, en todas las piscinas hubo por lo menos una determinación de estos valores.

Cuadro 6. Número de coliformes totales (UFC/100ml) de coliformes totales en cada estación de muestreo.

Estación	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	100	ND	ND	0
2	ND	ND	ND	0
3	ND	ND	ND	0
4	400	ND	200	ND
5	400	600	ND	ND
6	100	ND	ND	200
7	5000	5000	0	300
8	ND	0	100	250
9	ND	ND	ND	0
10	ND	ND	ND	0
11	ND	ND	0	250
12	400	ND	ND	250
13	ND	100	0	100
14	400	100	0	0
15	100	700	0	150
16	ND	ND	ND	0
17	ND	ND	100	0
18	ND	ND	ND	200
19	ND	ND	ND	100

ND: No determinada

Otro punto importante es la total ausencia de cloro libre residual en el sistema recreativo, ya que al tratar de realizar mediciones de cloro libre residual en las albercas del balneario “El géiser”, se observó una ausencia de este parámetro, en cada una de las estaciones, por lo que se decidió no reportar estos datos, se sabe que esta es una de las principales razones por las cuales se encuentra presente, en este centro recreativo, *N. fowleri*, en algunos estudios se demostró una fuerte asociación entre el cloro libre residual combinado con la calidad bacteriológica del agua y la ausencia de *Naegleria* spp (Esterman *et al.*, 1984). De Jonckheere, (1982) reportó una fuerte asociación entre la presencia de *N. fowleri*, altas temperaturas del agua, un mal sistema de desinfectado y cantidades suficientes de bacterias para que la ameba se alimente, sin embargo, existe literatura que asegura que no solo se requiere la presencia de cloro libre residual para eliminar a *N. fowleri*, sino que el cloro se encuentre en las concentraciones adecuadas, (Muñoz *et al.*, 2003). Concentraciones arriba de 0.75 ppm de cloro libre residual a un pH de 7.0 son suficientes para eliminar al 99% de los trofozoítos de *N. fowleri*, en 30 minutos (Tiewchaloren y Junnu, 1999).

4.2 BACTERIAS TOTALES

La cantidad de Bacterias totales es uno de los parámetros más importante para las poblaciones de protozoos, entre ellos, amebas, que viven en este sistema se alimentan de las bacterias disponibles (Rodríguez- Zaragoza, 1994). Las cantidades de UFC encontradas para bacterias totales van desde las 500 UFC/ml hasta más de 300,000 UFC/ml (TMTTC) (cuadro 7) a lo largo de todos los muestreos, esto se puede atribuir a que el agua tiene poblaciones naturales de bacterias, lo cual se comprobó al realizar las revisiones de los cultivos de amebas cuando se clonaron, ya que se puede observar la

presencia de estas poblaciones que viven de manera natural en el agua proveniente del géiser.

Cuadro 7. Número de bacterias totales (UFC/ml) en las estaciones donde se realizó esta prueba.

Estación de muestreo	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	1000	ND	ND	500
2	ND	ND	ND	5000
3	ND	ND	ND	ND
4	1 400	200	12 000	ND
5	ND	4700	TMTC	7500
6	30 000	ND	ND	12000
7	10 000	TMTC	360 000	300000
8	ND	400	TMTC	50000
9	ND	2100	ND	15000
10	ND	500	7000	10000
11	ND	100	14 000	35000
12	ND	1700	2000	35000
13	10 000	2000	5000	15000
14	2 300	TMTC	TMTC	17000
15	1600	3800	10 000	20000
16	ND	ND	300 000	4500
17	ND	ND	18 000	45000
18	ND	ND	ND	65000
19	ND	ND	ND	12000

ND: No determinada

TMTC: Cantidades por arriba de 300,000 UFC

Las cantidades de UFC/ml de bacterias totales encontradas durante el Muestreo I van desde 1000 hasta 30,000 UFC/ml, para el Muestreo II, las cantidades oscilaban entre 200 y TMTC, en el Muestreo III se presentaron cantidades de 10,000 hasta TMTC UFC/ml y en último lugar, el Muestreo IV presentó cantidades que fluctuaban entre las 4,500 hasta las 650,000 UFC/ml (cuadro 7), cabe resaltar que los valores presentados para el Muestreo IV fueron cuantificados en el Laboratorio de Bacteriología de la UIICSE de la FESI.

Kyle y Noblet (1985) sugieren que en una zona donde el agua sea rica en bacterias, no se encontraran amebas en gran número, lo cual es contrastante, con lo reportado por Rodríguez-Zaragoza (1994) quien propone que cuando las concentraciones de bacterias son altas en la columna de agua, la presencia de amebas se incrementa de manera directamente proporcional. Además De Jonckheere (1982) en un estudio realizado en piscinas de hidroterapia reportó altas cantidades de UFC para bacterias totales, y las relacionó con la presencia de amebas del género *Naegleria*; en el presente estudio se encontraron resultados que apoyan lo propuesto anteriormente, pues en estaciones donde, el agua estaba infestada de bacterias, se pudo aislar *N. fowleri*, por ejemplo, en la estación 8 del Muestreo IV. Sin embargo, se observa que en estos lugares, si bien las cantidades de UFC de bacterias totales son muy elevadas, las cantidades de UFC para coliformes son reducidas ó nulas (K (IV) 10). Esta tendencia también se observa en los aislados identificados como *N. gruberi* y *Naegleria* spp. (cuadro 8). Esterman y colaboradores (1984) afirman que existe una fuerte asociación entre el cloro libre residual con la calidad bacteriológica y la ausencia de *Naegleria* spp, por esto recomiendan cantidades de 1.0 mg/ l de cloro libre residual a un pH de 7.0.

Cuadro 8. Comparación entre los aislados del género *Naegleria* y la cantidad de Bacterias y Coliformes presentes en las estaciones.

Aislados	Diagnóstico morfológico	Coliformes Totales (UFC/100ml)	Bacterias Totales (UFC/ml)
K(I)11	<i>Naegleria fowleri</i>	N	N
K(II) 13	<i>Naegleria fowleri</i>	100	2000
K(III)8	<i>Naegleria fowleri</i>	100	TMTC
K(III)11	<i>Naegleria fowleri</i>	0	14000
K(III)14	<i>Naegleria fowleri</i>	0	TMTC
K(IV)4	<i>Naegleria fowleri</i>	N	N
K(IV)6	<i>Naegleria fowleri</i>	200	12000
K(IV)8	<i>Naegleria fowleri</i>	250	50000
K(IV)10	<i>Naegleria fowleri</i>	0	10000
C(I)5s	<i>Naegleria fowleri</i>	N	N
C(I)11a	<i>Naegleria fowleri</i>	N	N
C(II)8	<i>Naegleria fowleri</i>	0	400
C(II)15	<i>Naegleria fowleri</i>	700	3800
C(III)13	<i>Naegleria fowleri</i>	0	5000
K(I)8B	<i>Naegleria</i> spp.	N	N
K(I)12	<i>Naegleria</i> spp.	N	N
K(III)7	<i>Naegleria</i> spp.	0	360000
K(III)9	<i>Naegleria</i> spp.	N	N
K(III)15	<i>Naegleria</i> spp.	0	10000
K(IV)11	<i>Naegleria</i> spp.	250	35000
K(IV)12	<i>Naegleria</i> spp.	250	35000
K(I)5S	<i>N. gruberi</i>	N	N
K(I)10	<i>N. gruberi</i>	N	N
K(IV)13	<i>N. gruberi</i>	100	15000

N: Cantidades nulas

5. DIAGNÓSTICO MOLECULAR

5.1 IDENTIFICACIÓN DE *Naegleria fowleri* POR PCR

Con la finalidad de confirmar el diagnóstico morfométrico que previamente se hizo a los aislados identificados como *N. fowleri*, *N. gruberi* y *Naegleria* spp, se realizaron extracciones de ADN a 24 aislados y se buscó amplificar por la técnica de PCR anidado un segmento de 110 pb específico para *Naegleria fowleri*. Los productos obtenidos de la segunda amplificación fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Los fragmentos de ADN amplificados por PCR, se analizaron en dos geles de agarosa, colocando 12 muestras en cada gel con un marcador molecular en los carriles externos. En el corrimiento electroforético mostrado en la figura 11, se observan 12 de los 24 aislados de *Naegleria* ensayados por PCR para obtener el segmento de 110 pb buscado para *N. fowleri*, en la electroforesis se observa que en las muestras de ADN solo en ocho se obtuvo un producto de amplificación específico para *N. fowleri*, en el caso de K (II) 13, la marca no es muy aparente, debido quizás, a la baja cantidad de ADN obtenido durante la extracción y purificación del material genético. En las muestras

K (I)8b, K(III)7, K(III) 8 y K(III)11, no se observa amplificación, por lo que se anotaron como negativas, es importante destacar que los dos primeros aislados fueron identificados morfológicamente como *N. fowleri*, y para K(I)8b y K(III)7 su diagnóstico solo había sido hasta género. Respecto a los aislados que amplificaron las 110 pb, siete fueron identificados por morfología como *N. fowleri*, y uno, K(I)12, como *Naegleria* spp.

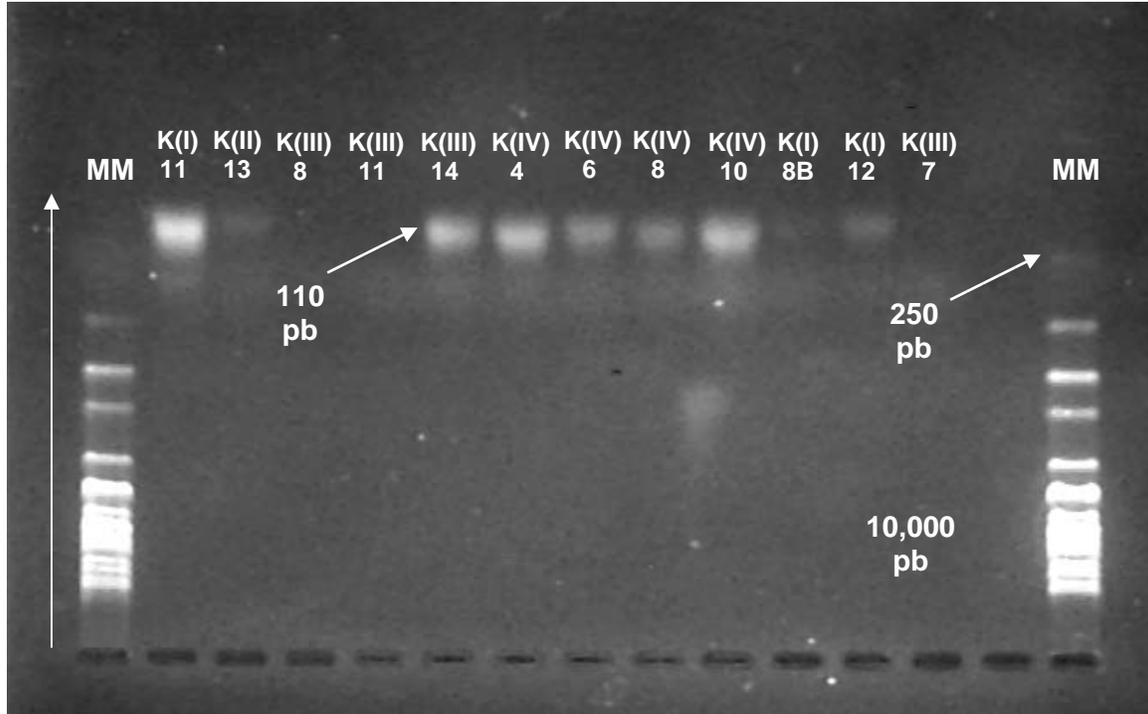


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del PCR anidado, se puede observar como aparecen las bandas en 110pb; MM, representa a los marcadores moleculares, y también aparecen los aislados a los que corresponde cada carril. Los número romanos entre paréntesis representan el número de muestreo, los números arábigos representan el número de la estación, la flecha indica la dirección en que migraron los fragmentos de ADN.

De los catorce aislados identificados por microscopía como *N. fowleri* dos no amplificaron las 110pb (K (III)8 y K (III) 11), durante el PCR anidado, las temperaturas a las que fueron aisladas son 34.1 y 35.5° C respectivamente, y soportaron la prueba de temperatura de 45° C, por lo cual, estos aislados pueden pertenecer a cualquier otra especie del género *Naegleria*, que presente características termófilas.

En la figura 12 se observa el segundo grupo de muestras de *Naegleria* amplificadas por PCR para buscar el segmento de 110 pb específico de *N. fowleri*, en ella se muestra el resultado por electroforesis en gel de agarosa de las otras 12 muestras analizadas. El ADN de 11 aislados de *Naegleria* fue positivo para producir el amplicón específico buscado con la prueba de PCR, en este caso solo una de las muestras, (K (I) 10) fue negativa con lo que se descarta su posible ubicación taxonómica como *N. fowleri*, esto se corrobora con la previa identificación morfológica que la había colocado como *N. gruberi*. De las 11 muestras que amplificaron las 110 pb, cinco habían sido identificadas previamente como *N. fowleri*, dos (K (I) 5s y K(IV)13) como *N. gruberi*, y cuatro habían sido identificadas hasta género (*Naegleria* spp) (cuadro 9).

En el caso del aislado K(I)10 que había sido identificado como *N. gruberi* sí bien fue colectado a temperaturas que *N. gruberi* “*sensu stricto*”, puede soportar (38.3° C), el hecho de que hayan podido tolerar la prueba de temperatura de 45° C durante 48h, nos indica que en definitiva no corresponde a *N. gruberi* “*sensu stricto*”, sino, a alguna a otra ameba del género *Naegleria* que sea termófila, como *N. lovaniensis* ó de la especie *N. italica* (De Jonckheere, 2002)..

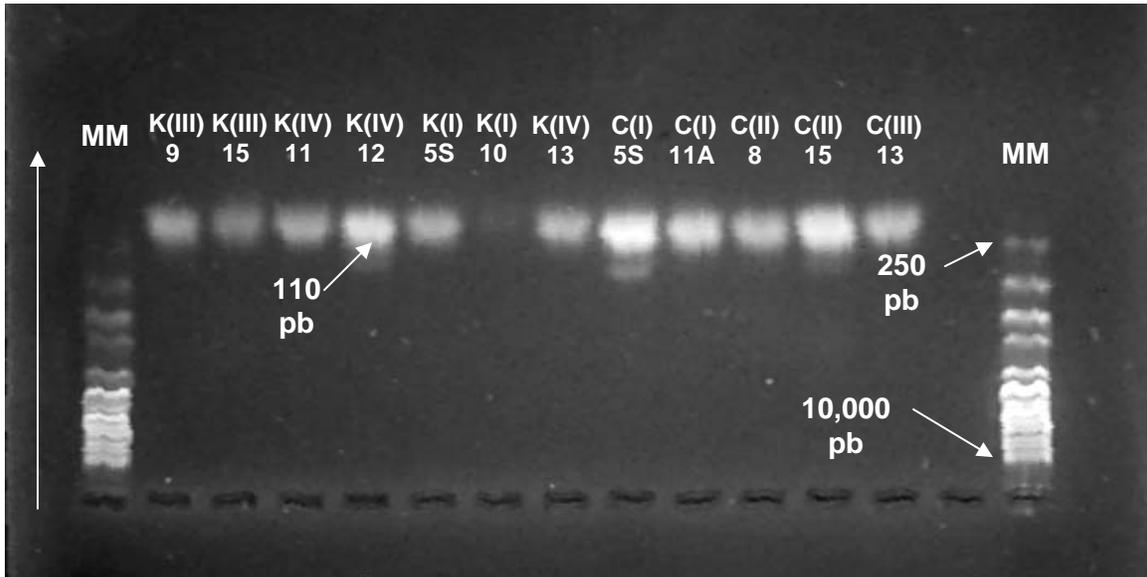


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los 12 ADNs templados restantes del segundo PCR anidado. Se puede observar como aparecen las bandas en 110pb, MM, representa a los marcadores moleculares, y también aparecen los aislados a los que corresponde cada carril. Los números romanos entre paréntesis representan el número de muestreo, los números arábigos representan el número de la estación la flecha indica la dirección en que migraron los fragmentos de ADN.

En el cuadro 9, se puede observar que hay diferencias entre lo encontrado mediante estas pruebas moleculares y lo identificado mediante los métodos tradicionales (morfometría), estas pruebas moleculares demostraron que cinco de los siete aislados identificados como *Naegleria* spp. correspondían a la especie *N. fowleri*, esto es en el caso de los aislados K(I)12, K(III)9, K(III)15, K(IV)11 y K(IV)12, el PCR anidado amplificó las 110 pb correspondientes a *N. fowleri*, confirmando de esta manera que pertenecían a dicha especie.

Del mismo modo, de los catorce aislados que habían sido identificados como *N. fowleri*, dos no pertenecen a esta especie, por lo cual, se corrigió un 14.2% de error que se tuvo en el reconocimiento de *N. fowleri* con las pruebas moleculares específicamente con el PCR anidado, y un 37.5% de error en la identificación de los aislados identificados como pertenecientes al género *Naegleria* spp. ya que nueve de los 24 aislados se identificaron morfológicamente dentro de una especie a la que no correspondían, siete de esos aislados pertenecían a *N. fowleri*, y no habían sido identificados correctamente mediante morfología.

Cuadro 9. Comparación de los resultados obtenidos de los aislados que fueron analizados por PCR respecto a su previo diagnóstico morfológico.

Aislados	Diagnóstico Morfológico	Diagnóstico por PCR
K(I)11	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
K(II) 13	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
K(III)8	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria</i> spp.
K(III)11	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria</i> spp.
K(III)14	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
K(IV)4	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
K(IV)6	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
K(IV)8	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
K(IV)10	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
K(I)8B	<i>Naegleria</i> spp.	<i>Naegleria</i> spp.
K(I)12	<i>Naegleria</i> spp.	<i>Naegleria fowleri</i>
K(III)7	<i>Naegleria</i> spp.	<i>Naegleria</i> spp.
K(III)9	<i>Naegleria</i> spp.	<i>Naegleria fowleri</i>
K(III)15	<i>Naegleria</i> spp.	<i>Naegleria fowleri</i>
K(IV)11	<i>Naegleria</i> spp.	<i>Naegleria fowleri</i>
K(IV)12	<i>Naegleria</i> spp.	<i>Naegleria fowleri</i>
K(I)5S	<i>Naegleria gruberi</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
K(I)10	<i>Naegleria gruberi</i>	<i>Naegleria</i> spp.
K(IV)13	<i>Naegleria gruberi</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
C(I)5s	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
C(I)11a	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
C(II)8	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
C(II)15	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
C(III)13	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i>

Marciano-Cabral y colaboradores (2003), llevaron a cabo un estudio en el cual tomaron muestras del agua de una casa en Arizona, buscando la presencia de *N. fowleri*, de las 19 muestras, 17 resultaron positivas para *N. fowleri*, las muestras no recibieron procesamiento previo alguno, y no realizaron una extracción y purificación previa de ADN. Réveiller y colaboradores (2001), al desarrollar la técnica de PCR anidado afirman que esta prueba es rápida, sensible y específica para *N. fowleri*, comprobándola con pruebas en las cuales ensayaron los cebadores del PCR anidado, con ADN de otras especies entre ellas, *N. lovaniensis*, *N. australiensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni* y *A. astronyxis*, con las cuales no amplificaron estos cebadores, además que esta prueba ofrece la ventaja, de llevar a cabo, en menos tiempo y con menos materiales una identificación acertada de *N. fowleri*, y es capaz de detectar 5pg de ADN puro ó 5 células amebianas de *N. fowleri*, por lo cual, se decidió utilizar esta prueba en el presente trabajo.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Respecto al análisis de Coeficiente de Correlación por Jerarquías de Spearman, el único análisis que arrojó resultados significativos relacionando algún parámetro fisicoquímico ó bacteriológico con la presencia de *N. fowleri*, fue el realizado para el Muestreo II.

En el cuadro 10, podemos observar que el único parámetro relacionado con presencia de *N. fowleri* es la cantidad de UFC de coliformes totales y con un muy bajo nivel de significancia, mientras que coliformes a su vez, esta asociada con otros cuatro parámetros, con conductividad y bacterias esta fuertemente ligada, y de forma positiva, y con temperatura del agua y el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto se relaciona de manera negativa, es decir, mientras la temperatura del agua y el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto están relacionados en niveles bajos, la cantidad de coliformes totales aumenta, mientras que siempre que la conductividad y la cantidad de bacterias totales aumenten la cantidad de coliformes también aumenta.

A su vez, las bacterias totales se relacionan negativamente con temperatura del agua (de manera similar a lo anterior) y de manera positiva con conductividad y coliformes totales, de la misma manera conductividad esta relacionada negativamente con temperatura del agua y de manera positiva con coliformes totales y bacterias totales.

El porcentaje de saturación de oxígeno disuelto esta relacionado negativamente con coliformes y de manera positiva con la temperatura del agua, mientras que la temperatura del agua esta relacionada positivamente únicamente con el porcentaje de saturación de oxígeno disuelto y negativamente con conductividad, coliformes y bacterias. Temperatura de la atmósfera y pH, al parecer no están relacionadas con ningún otro parámetro

Por lo anterior se puede decir, que la presencia de amebas de la especie *Naegleria fowleri*, en el Muestreo II, estuvo relacionada directamente con la presencia de poblaciones de coliformes totales, en este caso en las estaciones 8, 13 y 15 las cuales presentaron valores de coliformes totales de 0, 100 y 700 UFC/100ml, esto concuerda con lo presentado por Marshall y colaboradores (1997) que reportan que en cuerpos de agua que se encuentren contaminados con bacterias coliformes es más probable el aislamiento de AVL, sin embargo este parámetro se encuentra relacionado a su vez, con UFC/ ml de bacterias totales y conductividad, lo cual tiene sentido pues para que haya poblaciones de bacterias coliformes debe haber mayor cantidad de poblaciones de bacterias totales, en el caso de conductividad, Kyle y Pittman (1985), encontraron poblaciones bacterianas y midieron conductividad hallando valores de 40 hasta 160 μS , pero, en este trabajo los valores que se obtuvieron superan ese rango ya que oscilan entre 2670 a 3550 μS , lo cual nos indica que las poblaciones bacterianas cuentan con suficientes iones, para alimentarse.

Los análisis correspondientes a los otros tres muestreos, no arrojaron ningún resultado significativo, relacionando algún parámetro fisicoquímico, ambiental ó biológico con la presencia ó ausencia de amebas patógenas de la especie *N. fowleri*.

Cuadro 10. Correlación de Spearman entre los valores de los parámetros fisicoquímicos y los parámetros bacteriológicos del Muestreo II.

			Tempagua (°C)	Tempatmos (°C)	pH	% de od	Conduc (μS)	Coli (UFC/100ml)	Bact (UFC/ml)	sp
Spearman's rho	tempagua (°C)	Correlation Coefficient	1,000	,289	,427	,652(**)	-,536(*)	-,527(*)	-,547(*)	-,085
		Sig. (2-tailed)	.	,277	,099	,006	,032	,036	,028	,753
		N	16	16	16	16	16	16	16	16
	tempatmos (°C)	Correlation Coefficient	,289	1,000	,428	,299	-,153	,005	,207	-,257
		Sig. (2-tailed)	,277	.	,098	,261	,572	,987	,441	,337
		N	16	16	16	16	16	16	16	16
	pH	Correlation Coefficient	,427	,428	1,000	,420	,424	,170	,313	,067
		Sig. (2-tailed)	,099	,098	.	,105	,101	,528	,238	,806
		N	16	16	16	16	16	16	16	16
	% de od	Correlation Coefficient	,652(**)	,299	,420	1,000	-,396	-,559(*)	-,236	-,028
		Sig. (2-tailed)	,006	,261	,105	.	,129	,024	,378	,918
		N	16	16	16	16	16	16	16	16
	Conduc (μS)	Correlation Coefficient	-,536(*)	-,153	,424	-,396	1,000	,647(**)	,716(**)	,170
		Sig. (2-tailed)	,032	,572	,101	,129	.	,007	,002	,530
		N	16	16	16	16	16	16	16	16
	coli (UFC/100ml)	Correlation Coefficient	-,527(*)	,005	,170	-,559(*)	,647(**)	1,000	,786(**)	,511(*)
		Sig. (2-tailed)	,036	,987	,528	,024	,007	.	,000	,043
		N	16	16	16	16	16	16	16	16
	bact (UFC/ml)	Correlation Coefficient	-,547(*)	,207	,313	-,236	,716(**)	,786(**)	1,000	,398
		Sig. (2-tailed)	,028	,441	,238	,378	,002	,000	.	,127
		N	16	16	16	16	16	16	16	16
	sp	Correlation Coefficient	-,085	-,257	,067	-,028	,170	,511(*)	,398	1,000
		Sig. (2-tailed)	,753	,337	,806	,918	,530	,043	,127	.
		N	16	16	16	16	16	16	16	16

Tempagua: temperatura del agua, tempatmos: temperatura de la atmósfera, % de od: porcentaje de saturación de oxígeno disuelto, conduc: conductividad, coli: coliformes totales, bact: bacterias totales y sp: número de aislados de *Naegleria fowleri*. **La correlación es significativa en un nivel de 0.01 * La correlación es significativa en un nivel de 0.

VIII. CONCLUSIONES

A lo largo de un año de estudio en las piscinas de aguas termales del balneario “El Geiser”, municipio de Tecozautla, estado de Hidalgo, se obtuvieron 82 aislados amebianos pertenecientes a 12 géneros y 23 especies, entre las que destaca el género *Naegleria* con 24 aislados, de estos, 18 fueron catalogados por morfometría y análisis moleculares como *Naegleria fowleri*.

Se identificaron morfológicamente por microscopía en contraste de fases a 13 aislados amebianos pertenecientes a la especie *N. fowleri*, cuatro a *N. gruberi* y siete identificados hasta nivel de género *Naegleria* spp.

Se utilizó la técnica de PCR anidado como una herramienta para la identificación y confirmación de la identidad taxonómica de los aislados amebianos previamente catalogados morfológicamente por microscopía de luz en contraste de fases como *N. fowleri*, *N. gruberi* y *Naegleria* spp. De esta manera se obtuvieron un total de 19 aislados positivos con la amplificación de un segmento de 110pb específico para *Naegleria fowleri*. El balance que se calculó con el uso de la técnica de PCR anidado como una herramienta para el diagnóstico y confirmación de la especie *Naegleria fowleri* fue la corrección de un error de identificación de aproximadamente del 40% entre la identificación por microscopía de luz en contraste de fases con el uso de claves taxonómicas y el análisis de un segmento específico de ADN por PCR anidado.

Con estos resultados se destaca la importancia del uso de la técnica de PCR como una herramienta rápida y precisa para la identificación de organismos patógenos de difícil diagnóstico como lo es el caso de las amebas del género y especie *Naegleria fowleri*, los cuales pueden causar daños graves y fulminantes a la salud de las personas que entren en contacto directo con estos organismos.

Respecto a la correlación entre los parámetros fisicoquímicos y bacteriológicos y la presencia o ausencia de AVL de la especie *Naegleria fowleri*, el análisis estadístico solo pudo correlacionar significativamente durante el muestreo II, los valores de coliformes totales con la presencia ó ausencia de *Naegleria fowleri*. En los demás muestreos no hubo correlación significativa entre las cuantificaciones, y la presencia-ausencia de *Naegleria fowleri*, por lo que se concluye que ninguno de los parámetros fueron determinantes en la presencia de *Naegleria fowleri* a lo largo de los cuatro muestreos, esto probablemente se debió a la estabilidad que mostraron los datos entre sí, a lo largo de los muestreos realizados, durante este proyecto.

El hallazgo de la presencia de amebas de vida libre patógenas del género y especie *N. fowleri* en las piscinas del balneario “El Géiser” significa un riesgo para los usuarios de este centro recreativo ya que las amebas encontradas tienen el potencial de causar brotes epidémicos de MEAP, los cuales son difícilmente controlables debido a la escasa información que se tiene sobre la ameba, esta situación hace imperativo monitorear la presencia de *Naegleria fowleri* en este sitio y advertir a los administradores sobre los riesgos de la presencia de amebas patógenas para tomar las precauciones pertinentes y eliminar o reducir los riesgos que estos organismos pueden llegar a representar para los bañistas que acuden al balneario “El Géiser”.

ANEXO 1:

Mediciones de quistes y trofozoítos

CUADRO A. Mediciones de los diámetros de los quistes pertenecientes a los aislados identificados como *Naegleria fowleri* mediante las pruebas moleculares dados en micrómetros.

AISLADO	MEDIA	MEDIANA	DESV STD	MIN	MAX.
K(I)5s	9.30	9.84	1.25	7.38	12.30
K(I)8B	8.76	9.84	1.43	7.38	12.30
K(I)10	10.51	2.52	2.50	2.46	17.22
K(I)11	8.61	7.38	1.34	7.38	12.30
K(I)12	8.02	7.38	1.10	7.38	9.84
K(II)13	8.41	7.38	1.23	7.38	9.84
K(III)7	10.92	9.84	1.61	9.84	14.76
K(III)8	7.92	7.38	1.03	7.38	9.84
K(III)9	10.92	9.84	1.50	9.84	14.76
K(III)11	8.26	7.38	1.21	7.38	9.84
K(III)14	9.25	9.84	1.90	7.38	14.76
K(III)15	8.36	7.38	1.23	7.38	9.84
K(IV)4	12.20	12.3	2.07	7.38	14.76
K(IV)6	7.28	7.38	1.12	4.92	9.84
K(IV)8	9.69	9.84	1.15	7.38	12.30
K(IV)10	12.00	12.3	1.28	9.84	14.76
K(IV)11	8.17	7.38	1.26	7.38	12.30
K(IV)12	8.56	7.38	1.34	7.38	12.30
K(IV)13	9.05	9.84	1.44	7.38	12.30

Media, Mediana, Desviación Estándar (DESV STD), Medida más baja (MIN) y Medida más grande (MAX)

CUADRO B: Mediciones de la longitud de los trofozoítos pertenecientes a los aislados identificados como *Naegleria fowleri* mediante las pruebas moleculares.

AISLADO	MEDIA	MEDIANA	DESV STD	MIN	MAX.
K(I)5s	16.14	14.76	2.47	12.3	19.68
K(I)8B	26.37	27.06	4.68	14.76	34.44
K(I)10	18.20	18.45	3.44	9.84	27.06
K(I)11	21.45	22.14	4.64	12.3	31.98
K(I)12	23.52	24.60	4.49	14.76	31.98
K(II)13	16.73	17.22	2.56	12.3	24.60
K(III)7	17.94	17.22	4.67	12.3	27.06
K(III)8	21.45	22.14	3.79	14.76	27.06
K(III)9	23.24	24.60	4.99	12.3	31.98
K(III)11	18.72	17.22	4.36	12.3	29.52
K(III)14	17.12	17.22	3.29	9.84	22.14
K(III)15	17.45	17.22	3.64	12.3	24.60
K(IV)4	18.89	19.68	3.46	14.76	27.06
K(IV)6	16.53	17.22	2.07	12.3	19.68
K(IV)8	14.02	14.76	2.50	9.84	22.14
K(IV)10	20.76	19.68	3.41	14.76	27.06
K(IV)11	18.46	17.22	3.91	12.3	29.52
K(IV)12	20.12	19.68	4.90	12.3	31.98
K(IV)13	25.67	24.60	4.51	14.76	34.44

Media, Mediana, Desviación Estándar (DESV STD), Medida más baja (MIN) y Medida más grande (MAX)

CUADRO C: Mediciones de las anchuras de los trofozoítos pertenecientes a los aislados identificados como *Naegleria fowleri* mediante las pruebas moleculares

AISLADO	MEDIA	MEDIANA	DESV STD	MIN	MAX.
K(I)5s	6.89	7.38	1.23	4.92	9.84
K(I)8B	5.61	4.92	1.33	2.46	7.38
K(I)10	13.58	12.3	3.27	7.38	19.68
K(I)11	4.38	4.92	1.59	2.46	7.38
K(I)12	4.13	4.92	1.37	2.46	7.38
K(II)13	4.82	4.92	2.07	2.46	7.38
K(III)7	3.74	2.46	1.44	2.46	7.38
K(III)8	3.04	2.46	1.08	2.46	4.92
K(III)9	4.72	4.92	1.41	2.46	7.38
K(III)11	5.12	4.92	1.41	2.46	7.38
K(III)14	12.80	12.3	2.66	7.38	17.22
K(III)15	4.53	4.92	2.63	2.46	14.76
K(IV)4	2.95	2.46	1.00	2.46	4.92
K(IV)6	5.02	4.92	1.81	2.46	7.38
K(IV)8	10.13	9.84	2.42	7.38	19.68
K(IV)10	10.43	12.3	2.49	4.92	14.76
K(IV)11	5.36	4.92	1.62	2.46	9.84
K(IV)12	4.23	4.92	1.49	2.46	7.38
K(IV)13	4.97	4.92	1.82	2.46	9.84

Media, Mediana, Desviación Estándar (DESV STD), Medida más baja (MIN) y Medida más grande (MAX)

ANEXO 2

Recetas para preparar diferentes reactivos utilizados en este trabajo.

AGAR NO NUTRITIVO CON *Enterobacter aerogenes*

NaCl	0.120 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.004 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.004 g
Na ₂ HPO ₄	0.142 g
KH ₂ PO ₄	0.136 g
Agar bacteriológico	15.00 g
Agua destilada	1000 ml

Cuando el agar solidifica dentro de las cajas de Petri (previamente llenadas) se inocula una solución de la bacteria *Enterobacter aerogenes* muerta. La solución bacteriana se obtiene cosechando la bacteria de cultivos puros en solución con agua destilada e inactivándola en baño de agua a 70° C por 30 minutos (De Jonckheere, 1984)

SOLUCIÓN SALINA EN AMORTIGUADOR DE FOSFATOS (PBS) 10X

Solución stock, 1 litro:

NaCl	80g
KCl	2g
Na ₂ HPO ₄ 7H ₂ O	11.5g
KH ₂ PO ₄	2g
Agua destilada	1000ml

BUFFER TBE 10X PARA ELECTROFORESIS (Tris-Borato-EDTA)

Tris base	53.9g/500ml
Ácido bórico	27.5g/500ml
EDTA (Na ₂)	4.65g/500ml

Para tener una concentración de 0.5X se disuelven 50mL de Buffer TBE 10X en 950mL de agua desionizada.

GEL DE AGAROSA SIGMA (Biología molecular) AL 1.5%

Se pesan 1.5g de agarosa Sigma (TX, USA) y se disuelven en un frasco con capacidad de 250mL que contenga 100mL de Buffer TBE 0.5X. Esta mezcla se calienta a baño María hasta su completa disolución, no se deben observar grumos, ni turbiedad, y se debe evitar que la solución se queme. Posteriormente, se deja reposar el gel a temperatura ambiente, hasta que llegue a los 50°C, evitando la gelificación. Llegado a este punto se le agrega 5 µL de Bromuro de etidio (generalmente la concentración para el bromuro de

etidio es de 5 μ L /100mL de solución TBE 0.5X) para que se pueda revelar el gel en una cámara de rayos UV.

MARCADORES Y MUESTRAS DE ADN (PARA AMPLIFICADOS)

Marcador 1Kpb:

- 1 ml marcador
- 1 ml colorante (Incluido con el Marcador)
- 4 ml agua desionizada

Se vierte todo en un tubo Eppendorf y posteriormente se agita vigorosamente de preferencia con ayuda del vortex, durante 20 seg., después la mezcla se centrifuga durante 10 seg. a máxima velocidad (short spin).

Muestras de ADN:

Las muestras a las que se les desea hacer el corrimiento de electroforesis, se colocan a temperatura ambiente por 10 minutos, transcurrido este tiempo las muestras son centrifugadas durante 10 seg a máxima velocidad (short spin). Las siguientes cantidades son colocadas en tubos eppendorf de 1.5 ml:

- 2 ml del marcador Gel Loading (SIGMA, TX, USA)
- 8 ml de muestra

Una vez hecho esto la mezcla es agitada vigorosamente de preferencia con ayuda del vortex, durante 20 seg., después se le aplica un short spin a cada una de las muestras.

ANEXO 3

Aislados identificados

Cuadro A. Especies y géneros encontrados en las diferentes estaciones a los largo de los cuatro muestreos realizados en El Géiser, Tecozautla.

AISLADO	GÉNEROS O ESPECIES DE AMEBAS ENCONTRADAS	AISLADO	GÉNEROS O ESPECIES DE AMEBAS ENCONTRADAS
K(I)3S	<i>Vexillifera spp.</i> <i>Echinamoeba spp.</i>	K(III)14	<i>N. fowleri</i> , <i>Acanthamoeba spp.</i> ,
K(I)5S	<i>Naegleria gruberi</i> , <i>Vahlkampfia spp.</i> , <i>Acanthamoeba castellanii</i>	K(III)15	<i>Vahlkampfia spp</i> , <i>Naegleria spp</i> , <i>Hartmanella spp</i>
K(I)5	<i>A. castellanii</i> , <i>A. polyphaga</i>	K(IV)4	<i>H. vermiformis</i> , <i>N. fowleri</i>
K(I)8	<i>Willaertia magna</i> , <i>Echinamoeba spp.</i>	K(IV)6	<i>Hartmannella spp.</i> , <i>N. fowleri</i>
K(I)8b	<i>A. palestinensis</i> , <i>A. castellanii</i> , <i>Naegleria spp.</i>	K(IV)8	<i>N. fowleri</i> , <i>Acanthamoeba sp.</i> , <i>Cryptodiffugia</i>
K(I)10	<i>A. culbertsoni</i> , <i>N. gruberi</i> , <i>Vahlkampfia spp.</i> , <i>Hartmannella vermiformis</i>	K(IV)10	<i>V. enterica</i> , <i>N. fowleri</i> , <i>A. castellanii</i>
K(I)11	<i>Naegleria fowleri</i>	K(IV)11	<i>A. polyphaga</i> , <i>Naegleria spp.</i> , <i>Vahlkampfia spp.</i>
K(I)12	<i>Acanthamoeba spp.</i> , <i>Naegleria spp.</i>	K(IV)12	<i>V. enterica</i> , <i>V. averdonica</i> , <i>Naegleria spp.</i> , <i>Mayorella spp.</i>
K(I)14	<i>A. culbertsoni</i> , <i>A. castellanii</i> , <i>A. polyphaga</i>	K(IV)13	<i>N. fowleri</i> , <i>N. gruberi</i> , <i>V. aberdonica</i>
K(I)16	<i>Hartmannella spp.</i> , <i>H. cantabrigensis</i> , <i>Cashia limacoides</i>	K(IV)14	<i>A. polyphaga</i> , <i>Rhosculus ithacus</i>
K(II)8	<i>Rhizamoeba, spp.</i>	C(I)5s	<i>Naegleria fowleri</i> , <i>Naegleria gruberi</i>
K(II)13	<i>V. aberdonica</i> , <i>N. fowleri</i> ó <i>gruberi</i>	C(I)11a	<i>Vahlkampfia ustiana</i> , <i>Naegleria fowleri</i> <i>Naegleria gruberi</i>
K(II)16	<i>Willaertia spp.</i> , <i>Rhizamoeba, spp.</i>	C(II)8	<i>Naegleria gruberi</i> o <i>fowleri</i> , <i>Vahlkampfia aberdonica</i>
K(III)7	<i>A. castellanii</i> , <i>A. polyphaga</i> , <i>Naegleria spp.</i> , <i>Vahlkampfia spp.</i> ,	C(II)15	<i>Vahlkampfia entérica</i> , <i>Naegleria fowleri</i>
K(III)8	<i>N. fowleri</i> , <i>V. averdonica</i>	C(III)13	<i>N. fowleri</i> , <i>N. gruberi</i>
K(III)9	<i>Vahlkampfia spp.</i> , <i>Acanthamoeba spp.</i> , <i>Naegleria spp.</i>	C(IV)12	<i>N. fowleri</i> , <i>N. gruberi</i>
K(III)11	<i>N. fowleri</i> , <i>N. gruberi</i>	C(IV)13	<i>Naegleria spp.</i> , <i>A. castellani</i>

Los aislados están señalados con una letra, que es la inicial del recolector; un número romano entre paréntesis, que indica el número de muestreo y un número arábigo que representa la estación de muestreo

ANEXO 4

Datos de los parámetros fisicoquímicos

CUADRO A: Temperatura del agua (°C) encontrada en las diferentes estaciones a lo largo de los cuatro muestreos.

Estación	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	56.0	57.1	56	53.8
2	53.2	51.8	50.7	52.4
3	53.1	52.6	52.2	52.4
4	52.2	52.2	50.6	52.4
5	41.4	39.0	39.4	49.5
6	49.7	48.3	40.9	48.2
7	43.7	43.9	44.5	49.3
8	43.7	47.5	34.1	41.9
9	38.5	48.0	35.1	33.6
10	38.3	48.0	35.3	33.6
11	38.3	48.0	35.5	33.5
12	36.7	36.1	36.7	33.4
13	36.7	36.2	36.6	37.7
14	36.7	36.1	36.5	37.7
15	36.7	36.2	36.7	37.5
16			45.8	37.8
17			45.8	42.1
18				41.9
19				41.9

CUADRO B: Temperaturas atmosféricas (°C) tomadas en los diferentes puntos de muestreo, durante los cuatro muestreos.

Estación	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	25.7	28.2	22.9	28.1
2	25.7	24.8	25	24.8
3	25.7	26.8	21.4	24.8
4	32.2	28.5	25.9	24.8
5	27.0	28.1	23.1	25.9
6	27	25.9	22.3	30.6
7	27	25.7	22.3	26.6
8	27	33.9	22.3	26.6
9	25.1	27.0	22.3	26.7
10	25.1	27.1	22.3	26.7
11	25.1	27.1	22.3	26.7
12	25.1	26.3	22.3	26.7
13	31.3	26.8	22.3	28.4
14	28.7	27.1	22.2	27.2
15	30.3	27.1	22.2	28.4
16			22.2	28.4
17			22.2	28.4
18				21.1
19				25.6

CUADRO C: Mediciones de los valores del pH, tomados en los diferentes muestreos, en las estaciones.

Estación	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	9.5	9.5	9.5	9.6
2	9.5	9.5	9.8	9.9
3	9.5	9.5	9.8	9.9
4	9.4	9.5	9.8	9.9
5	9.3	9.5	9.7	9.9
6	9.5	9.5	9.7	9.8
7	9.5	9.5	9.8	9.9
8	9.3	9.5	9.7	10.0
9	9.4	9.5	9.7	9.4
10	9.4	9.5	9.7	9.4
11	9.3	9.5	9.7	9.4
12	9.3	9.5	9.7	9.4
13	9.3	9.5	9.7	9.5
14	9.4	9.4	9.7	9.5
15	9.4	9.5	9.7	9.5
16			9.8	9.5
17			9.7	9.5
18				9.5
19				9.5

CUADRO D: Conductividad (μS) ajustada a 25° C (K_{25}), tomadas en cada una de las estaciones.

Estación	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	2500	2670	3050	1897
2	2540	3050	2880	1943
3	2530	3050	2980	1943
4	2680	3020	3010	1943
5	2760	2710	3400	1976
6	2680	3010	3080	2148
7	2610	2940	3120	1994
8	2730	2860	3370	2117
9	2800	2970	3400	2766
10	2770	2830	3400	2963
11	2770	2830	3330	2770
12	2670	2810	3400	2801
13	2780	2830	3580	2591
14	2710	2800	3550	2620
15	2710	2770	3360	2559
16			3380	2571
17			3220	2638
18				2419
19				2427

CUADRO E: Valores del porcentaje de saturación de oxígeno disuelto ajustados a la altitud, encontrados a lo largo de los muestreos.

Estación	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III	Muestreo IV
1	45.6	50.7	51.5	61.0
2	58.1	59.4	59.6	65.3
3	60.0	67.0	56.6	65.3
4	61.2	72.5	55.3	65.3
5	46.6	41.3	44.6	65.3
6	60.0	65.7	20.1	78.0
7	60.6	51.8	60.5	58.8
8	59.4	77.0	52	70.2
9	65.1	77.7	55.2	57.0
10	66.2	81.2	55.2	59.4
11	66.2	81.2	55.1	57.4
12	60.1	49.4	48	56.9
13	62.0	44.0	47.1	46.5
14	59.2	48.4	48.2	43.6
15	59.2	45.0	46.7	43.6
16			56.7	42.1
17			60.1	53.7
18				61.0
19				54.3

IX. LITERATURA CITADA

- Adl, S., Simpson, A., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, R., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Karpov, S., Krugens, P., Drug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Lynn, D., Mann, D., Mccourt, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S., Nerad, T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegel, F. y Taylor, M. 2005. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of Protist. *J. Eukariot Microbiol.* **52**(5): 399-451.
- Alberts, B.; Bray. D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J. 1994. *Molecular Biology of the Cell*. 3a ed. Garland Publishing. EUA. 316-318.
- Arredondo-Figueroa, J. L. y Ponce Palafox, J. T. 1998. *Calidad del Agua en Acuicultura. Conceptos y Aplicaciones*. AGT Editor S. A. 221 pp.
- Biddick, C., Rogers, L. y Brown, T. 1984. Viability of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebae in long-term storage at a range of temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* **4**(48): 859-860
- Bottone, E. 1993. Free-living amoebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Mount. Sinai J. Med.* **4**(60): 260-270
- Brinkley, C. y Marciano-Cabral, F. 1992. A method for assesing the migratory response of *Naegleria fowleri* utilizing [3H] uridine-labeled amoebae. *J. Protozool.* **39**(2): 297-303
- Cabanes, P. A., Wallet, F., Pringuez, E. y Pernin, P. 2001. Assesing the risk of primary amoebic meningoencephalitis from swimming in the presence of environmental *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**(7): 2927-2931.
- Carter, R. F. 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**:193-201.
- Chu, D., Ferguson, T. y Marciano-Cabral, F. 2000. Protein kinase activation and protein phosphorylation in *Naegleria fowleri* amoebae in response to normal human serum. *J. Eukariot Microbiol.* **47**(1): 40-47.
- Clarholm, M. 2002. Bacteria and protozoa as integral components of the forest ecosystem their role in creating a naturally varied soil fertility. *Antonie van Leeuwenhoek.* **81**: 309-318.
- Cogo, P., Scaglia, M., Gatti, S., Rossetti, F., Alaggio, R., Laverda, A. M., Zhou, L., Xiao L. y Visvesvara, G. 2004. Fatal *Naegleria fowleri* meningoencephalitis, Italy. *Emerg. Infect. Diseases.* **10**(10): 1835-1837.
- Daniel, W. W. 2002. Estadística no paramétrica y de libre distribución. **En: Bioestadística**. Limusa Wiley. 658-736.

De Jonckheere, J. 1978. Quantitative study of *Naegleria fowleri* in surface water. *Protistologica* **15**(4): 475-481.

De Jonckheere, J. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann. Microbiol. (Ins. Pasteur)*. **130**: 250-212.

De Jonckheere, J. 1982. Hospital hydrotherapy pools treated with ultra violet Light: bad bacteriological quality and presence of thermophilic *Naegleria*. *J. Hyg. Camb.* **87**: 1-10.

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

De Jonckheere, J. 2002. A century of research on the ameboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool.* **41**:309-342.

De Jonckheere, J., Brown, S., Dobson, P., Robinson, B. y Pernin, P. 2001. The amoeba-to-flagellate transformation test is not reliable for the diagnosis of the genus *Naegleria*. Description of three new *Naegleria* spp. *Protist.* **152**: 115-121.

De Jonckheere, J. y Van de Voorde, H. 1977. The distribution on *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am. J. Soc. Trop. Med. Hyg.* **26** (1): 10-15

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

Esterman, A.; Roder, D.; Cameron, A. S.; Robinson, B. S.; Walters, R. P. Lake, J. A. y Christy, P. E. 1984. Determinants of the microbiological characteristics of South Australian swimming pools. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**(2): 325-328.

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

Gallegos, E. M. 1997. *Amebas de Vida Libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí*. Biología. Tesis doctoral. UNAM. Facultad de Ciencias. México. 132 pp.

García, D. 2000. *Detección de Naegleria fowleri en Cuerpos de Agua de Importancia Turística en el Estado de San Luis Potosí*. Biología. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Estado de México. 87pp.

Griffin, J. L. 1983. The pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecological interactions and the flagellate- empty habitat hypothesis. *J. Protozool.* **30**(2): 403-409.

Goswick, S. y Brenner, G. M. 2003. Activities of Azithromycin and Amphotericin B against *Naegleria fowleri* "in vitro" and in a mouse model of primary amoebic meningoencephalitis. *Antimicrob. Agents. Chemoter.* **47**(2): 524-528.

Hara, T. y Fukuma, T. 2005. Diagnosis of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Int.* **54**: 219-221.

Hernández de Alba, E. 1995. *Estandarización de ELISA para la Identificación de Naegleria spp.* Biología. Tesis de licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. 74 pp.

Hoffmann, R. y Michael, R. 2001. Distribution of free living amoeba (FLA) during preparation supply of drinking water. *Ins. J. Hyg. Environ. Health.* **203**: 215-219.

Hu, W. N., Kopachik, W. y Band, N. 1992. Cloning and characterization of transcripts showing virulence-related gene expression in *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.* **60**(6): 2418-2424.

Huizinga, H. y McLaughlin, G. 1990. Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from power plant cooling reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**(7): 2200-2205.

INEGI. 1992. *Síntesis Geográfica del Estado de Hidalgo*. INEGI. 134 pp.

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002: http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM_hidalgo

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

John, D. T. y De Jonckheere, F. 1985. Isolation of *Naegleria australiensis* from an Oklahoma Lake. *J. Protozool.* **32**(4):571-575.

Kilvington, S. y Beeching, J. 1995. Development of a PCR for identification of *Naegleria fowleri* from the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(10): 3764-3767.

Kingston, D. y Warhust, D. 1969. Isolation of amoebae from the air. *J. Med. Microbiol.* **2**: 27-36.

Kyle, D. E. y Noblet, G. P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* **33**(3):422-434.

Kyle, D. E. y Noblet, G. P. 1987. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J. Protozool.* **34**(1):10-15.

Lares-Villa, F. 2001. Free-living amoebae infections in Mexico. **En:** *IX International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings*, Ed. por: Billot-Bonef, S.; Cabanes, P.; Marciano-Cabral, F; Pernin, P. y Pringuez, E. Ediciones John Libbey Eurotext. Paris. 13-18.

Lehmann, O. J., Green, S. M., Morlet, N., Kilvington, S., Keys, M. F., Matheson, M. M., Dart, J. K. G, McGill J. I. y Watt, P. J. 1998. Polymerase Chain Reaction Analysis of Corneal Epithelial and Tear Samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis. *IOVS.* **39**:7, 1261-1265.

MacLean, R., Richardson, D., Lepardo R. y Marciano-Cabral F., 2004. The identification of *Naegleria fowleri* from water and soil samples by nested PCR. *Parasitol Res.* **93**: 211-217.

Marciano-Cabral, F., Patterson, M., John, D. T. y Bradley, S. G. 1982. Citopathogenicity of *Naegleria fowleri* y *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. *J. Parasitol.* **68**(6): 1110-1116.

Marciano-Cabral, F., Cline, M. y Bradley, G. 1987. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria* species. *J. Clin. Microbiol.* **25**(4): 692-697.

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

Marciano-Cabral, F., K. Zoghby y S. G. Bradley, 1990. Citopathic accion of *Naegleria fowleri* amoebae on rat neuroblastoma target cell. *J. Protozool.* **37**(2): 138-144

Marciano-Cabral, F., MacLean, R., Mensah A. y LaPat, L. 2003. Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. *Appl. Environ Microbiol.* **69**(10): 5864-5869.

Margalef, R. 1995. Medio líquido y radiación, energía. **En: Ecología.** 8a reimpression. Ediciones Omega. Barcelona. Págs 16-80 y 103-158.

Marshall, M.M.; Naumovitz, D.; Ortega, Y. y Sterling, C. 1997. Waterborne protozoan pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* **10** (1): 67-85.

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

Mathers, W. D., Nelson, S. E., Lane, J. L., Wilson, M. E, Allen, R. C. y Folberg, R. 2000. Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch. Ophthalmol.* **18**:178-183.

McLaughlin, G. L., Vodkin, M. H. y Huizinga, H. W. 1991. Amplification of repetitive ADN for the specific detection of *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* **29** (2): 227-230.

Muñoz, V., Reyes, H., Toche, P., Cárcamo, C. y Gottlieb, B. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol. Latinoam.* **58**: 106-111.

Page, F. 1966. *Taxonomical Criteria for small Amoebae, with a Redefinition of the Genera Hartmanella y Acanthamoeba and Descriptions of Three New Species.* Tesis doctoral. Universidad de Wisconsin. EUA. 150pp.

Page, F. 1975. Mophological variation in the cyst wall of *Naegleria gruberi* (Amoebida, Vahlkampfiidae). *Protistology.* **11**:195-204

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

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

Pernin, P., Pélandakis, M., Rouby, Y., Faure, A. y Siclet, F. 1998. Comparative recoveries of *Naegleria fowleri* amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(3): 955-959.

Réveiller, F., Marciano-Cabral, F., Pernil, P., Cabanes, P. A. y Legastelois, S. 2000. Species specificity of a monoclonal antibody produced to *Naegleria fowleri* and partial characterization of its antigenic determinant. *Parasitol Res.* **86**: 634-641

Réveiller, F., Suh, S. J., Sullivan, K., Cabanes, P. A. y Marciano-Cabral, F. 2001 Isolation of a unique membrane protein from *Naegleria fowleri*. *J. Eukariot. Microbiol.* **48**(6): 676-682.

Réveiller, F., Cabanes, P. A. y Marciano-Cabral, F. 2002 Development of a nested PCR assay to detect the pathogenic free-living amoeba *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Res.* **88**:443-450

Rivera-Aguilar, V.; Hernández-Martínez, D.; Rojas-Hernández, S.; Oliver-Aguillón, G.; Tsutsumi, V.; Herrera-González, N. y Campos-Rodríguez, R. 2000. Immunoblot analysis of IgA antibodies to *Naegleria fowleri* in human saliva and serum. *Parasitol Res.* **86**: 775-780.

Rivera, F., Paz M. y López, E. 1978. Transformación ameboflagelar espontánea e inducida en especies del género *Naegleria*, Alexeieff (1912), Emend. Calkins (1913), recolectadas en piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la ciudad de México. *Arch. Mex. Anat.* **15**: 9-19.

Rivera, F., Ortega, A., López, E y Paz M. 1979. A quantitative morphological, and ecological study of protozoa polluting tap waters in Mexico City. *Trans. Amer. Micr. Soc.* **98**:465-469.

Rivera, F., Ramírez P., Vilaclara, G, Robles, E. y Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environ. Res.* **32**: 205-211.

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

Robinson, B., Monis, P., Henderson, M., Gellonese S. y Ferrante, A. 2004. Detection and significance of the potentially pathogenic ameboflagellate *Naegleria italica* in Australia. *Parasitol. Int.* **53**: 23-27.

Rodríguez, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**(3): 225-241.

Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka F. y Wilhelm, M.1998. Comparison of free living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.* **5**(64): 1822-1824

Rojas-Hernández S., Jaramillo-Luna, A., Rodríguez-Monroy, M., Moreno-Fierros, L. y Campos-Rodríguez, R. 2004. Immunohistochemical characterization of the initial stages of *Naegleria fowleri* [meningoencephalitis](#) in mice. *Parasitol Res.* **94**(1):31-36.

Schuster, F y Visvesvara, G. 2004a. Amebae and ciliated protozoa as causal agents waterborne zoonotic disease. *Vet. Parasitol.* **126**: 91–120

Schuster, F y Visvesvara, G. 2004b. Free living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* **34**(9):1001-10027.

Secretaria de Salud. 2005 *Anteproyecto de Norma Oficial Mexicana PROY- NOM-000-SSA1-2005. Requisitos sanitarios y calidad de agua que deben cumplir las albercas de uso recreativo humano.*

Sheehan, K., Fagg, J., Ferris, M. y Henson, J. 2003. PCR detection and analysis of the free living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Appl. Environ. Microbiol.* **10**(69):5914-5918.

Shin, H. e Im, K. Pathogenic free-living amoebae in Korea. *Korean J. Parasitol.* **3**(42): 93-119.

Sparagano. O. 1993. Differentiation of *Naegleria fowleri* and other Naegleriae by polymerase chain reaction and hybridization methods. *FEMS Microbiology Letters.* **110**: 325-330.

Sparagano. O.; Drouet, E.; Brebant, R.; Manet, E.; Denoyel, G. A. y Pernin, P. 1993. use of monoclonal antibodies to distinguish pathogenic *Naegleria fowleri* (quist, trophozoites, or flagellate forms) from other *Naegleria* species. *J. Clin. Microbiol.* **31** (10): 2758-2763.

Smirnov, A. y Goodkov, A. 1999. An illustrated list of basic morphotypes of *Gymnamoeba* (Rhizopoda, Lobosea). *Protistology.* **1**: 20-29.

Sykora, J., Keleti G. y Martinez, J. 1983. Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.* **3**(45): 974-979.

Tiewchaloren, S. y Junnu, V.1999. Factors affecting the viability of pathogenic *Naegleria* species isolated from Thai patients. *J. Tropical Med. Parasitol.* **22**(1): 15-21

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.* **3** (55): 722-732.

Toze, S. 1999. PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Wat. Res.* **33** (17): 3545-3556.

Vargas-Zepeda, J., Gómez-Alcalá, A., Vázquez-Morales, J. A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J. y Lares-Villa, F. 2005. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous Amphotericin B, Fluconazole and Rifampicin. *Arch. Med. Res.* **36**: 83-86.

Visvesvara, G. y Sther-Green, J. 1990. Epidemiology of free living ameba infections. *J. Protozool.* **37**(4):25S-33S.

Wang, A., Nela Band, R. y Kopachik, W. 1995. Effects of trifluralin and differentiation of the amebo-flagellate *Naegleria*. *FEMS Microbiol. Letters.* **127**: 99-103.