



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

AISLAMIENTO DE LA AMEBA PATÓGENA *Naegleria
fowleri* DEL AGUA DE LOS CANALES DE RIEGO DE
MEXICALI, BAJA CALIFORNIA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGÍA CELULAR)

PRESENTA:

ARTURO CALDERÓN VEGA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. ELVIA MAMUELA GALLEGOS NEYRA

MÉXICO, D. F.

ENERO 2008



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 está 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.

Dedico este trabajo a mi Familia

A:

*Elvia Gallegos, mi intuitiva, incansable y emprendedora compañera de
toda la vida*

y

*Arturito Calderón mi hijo razón de todos mis empeños, ideales y la
energía en mi existencia.*

Agradecimientos:

Con admiración y reconocimiento por haber entregado su esfuerzo y dedicado tiempo valioso para la revisión de este trabajo de Tesis, mi más sincera gratitud a:

Dra. Elvia M. Gallegos Neyra

Dra. Ma. Antonieta Aladro Lubel

Dr. Luis Felipe Jiménez García

Dr. Alfonso Lugo Vázquez

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Y a todos mis amigos

CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Ecología.....	4
Manifestaciones clínicas	7
Morfología de <i>Naegleria</i>	9
Trofozoíto	9
Quiste	11
Fase flagelar	12
Epidemiología	13
Diagnóstico	15
Justificación	17
Clasificación de <i>Naegleria</i>	18
Especies patógenas termófilas del género <i>Naegleria</i>	19
OBJETIVOS	21
Descripción del área de estudio	22
MATERIAL Y MÉTODOS	26
Muestras	26
Parámetros fisicoquímicos	26
Temperatura ambiente	27
Temperatura del agua	27
pH	28
Cloro libre residual.....	28
Oxígeno disuelto.....	28
Conductividad.....	29
Demanda bioquímica de oxígeno (DBO ₅)	29
Análisis biológicos.....	30
Toma de muestras.....	30
Aislamiento y cultivo de amebas <i>Naegleria fowleri</i>	30
Prueba de tolerancia a la temperatura	31
Prueba de transformación ameboflagelar	32
Axenización	33
Prueba de patogenicidad en ratones	33
Análisis moleculares	34
Concentración de células por filtración	34
Extracción y purificación del ADN genómico de <i>Naegleria fowleri</i>	34
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
Electroforesis del ADN amplificado en geles de agarosa.....	36
Consideraciones sobre la metodología empleada	37
Control de calidad.....	38
Controles negativos.....	38
Controles amebianos.....	38
Otros protozoos y bacterias.....	38

Análisis bacteriológico cuenta de coliformes y bacterias totales.....	39
Análisis de coliformes totales en muestras de agua	39
Cuenta de bacterias totales en el agua.....	39
Cuenta directa de bacterias con tinción de DAPI.....	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES	71
LITERATURA CITADA.....	73

RESUMEN

La meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) es una infección fulminante del sistema nervioso central causada por *Naegleria fowleri*, una ameba de vida libre que se desarrolla principalmente en cuerpos de agua calentados natural o artificialmente. El portal de entrada de *N. fowleri* en un individuo sano es a través del neuroepitelio olfatorio y la infección puede ser adquirida al bañarse o nadar por la aspiración nasal de agua contaminada con estas amebas.

Esta investigación se llevó a cabo para la búsqueda de amebas de la especie *Naegleria fowleri* que pudieran estar implicadas en el origen de los casos reportados en Mexicali, Baja California, México. Debido a la comunicación de muertes por meningoencefalitis de etiología desconocida con brotes anuales (5-13 casos en cada ocasión) a finales de la estación de verano en varias partes de Mexicali con el antecedente de que los pacientes afectados tuvieron en común previo a la enfermedad, el haber nadado en los canales de riego que hay en la zona para mitigar calor que en algunos lugares puede alcanzar los 55 °C.

Se tomaron muestras de los canales de riego de Mexicali desde su origen en la presa Morelos donde entra el agua del Río Colorado a México para distribuirse por el valle y llegar hasta la ciudad de Mexicali, identificándose 255 aislados amebianos pertenecientes a 14 géneros. De esos aislados 58 fueron ubicados taxonómicamente como *Naegleria*. Los aislados mostraron un elevado índice de proliferación en cultivos axénicos a temperaturas de 42 y 45 ° C. Para confirmar la taxonomía de las amebas a nivel de especie, los aislados fueron clonados y analizados por métodos moleculares con base en el análisis por PCR para amplificar un segmento específico de ADN para *Naegleria fowleri* de 1500 pb. El análisis de PCR permitió identificar de manera precisa a las amebas de la especie *N. fowleri*, y permitió reubicar a otras amebas pertenecientes al género pero no a la especie y que habían sido incluidas en ésta.

Se identificaron 38 organismos como *N. fowleri* los cuales estuvieron distribuidos principalmente en el agua de los canales de riego con zonas adyacentes de alta densidad poblacional. *N. fowleri* mostró ser patógena en todos sus aislados y fue recuperada de aquellos lugares donde se habían reportado casos de meningoencefalitis por lo que se fortalece la hipótesis de que los pacientes que desarrollaron la enfermedad pudieron haberla adquirido al aspirar al patógeno del agua al nadar en estos canales durante la época de verano en la que se reportaron los casos. Durante esta investigación se trabajó de manera estrecha con el Instituto Mexicano del Seguro Social.

Los resultados con la distribución de los sitios con contaminación por *Naegleria fowleri* fueron compartidos con la Institución desplegándose un Programa de Prevención en la ciudad y en el valle de Mexicali a partir de lo cual no se ha emitido ningún otro reporte de MEAP causado por nadar en los canales de riego de la región.

ABSTRACT

Primary amoebic meningoencephalitis (PAM) is a fulminating infection of the central nervous system caused by *Naegleria fowleri*, a free living amoeba found in bodies of water natural or artificially heated. The entrance of *N. fowleri* in a healthy individual is through the olfactory neuroepithelium and the infection can be acquired for nasal aspiration of water contaminated with these amoebas.

This investigation was carried out for the search of *Naegleria fowleri* that could be implied in the origin of the cases reported in Mexicali, Baja California, Mexico. Due to the communication of deaths by meningoencephalitis of unknown etiology with annual outbreaks (5-13 cases in each occasion) in summer in Mexicali with the antecedent that the patients affected had in common prior to the illness having swum in the irrigation canals in the zone to mitigate hot weather that in some places can reach the 55 °C.

Samples of water from the irrigation ditches were taken in Mexicali starting in the Morelos dam then where the water of the Colorado River enters to Mexico to be distributed to the valley and arrive to the city of Mexicali, 255 amoebic isolates were identified belonging to 14 species. Of those 58 they were taxonomically identified as *Naegleria*. The isolates showed a high index of proliferation in axenic cultures in temperatures of 42 and 45 ° C. To confirm the taxonomy of the amoebas to level of species, the isolates were cloned and analyzed by molecular methods based on PCR to amplify a specific 1500 pb segment of DNA for *Naegleria fowleri*. The analysis of PCR permitted to identify in a precise way *N. fowleri* amoebas, and permitted to reposition other amoebas belonging to the genera but not to the specific *fowleri* species.

38 organisms were identified as *N. fowleri* distributed mainly in the water of the irrigation ditches in adjacent zones of highly population density. All isolates identified as *N. fowleri* were pathogenic. Isolates of *N. fowleri* were recovered from those places where meningoencephalitis cases had been reported. This fact support the hypothesis that the patients that developed the illness could have acquired because they aspirating the pathogen of the water upon swimming in these channels in the summer when the cases were reported. This investigation was in a narrow relationship with the Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

The results of the distribution of the *Naegleria fowleri* amoebae in Mexicali were shared with the IMSS starting up a Prevention Program in the city and the valley of Mexicali reason for which no other report of MEAP has been emitted caused by swimming in the irrigation canals of the region.

INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) del género *Naegleria* son encontradas normalmente en suelo y agua alimentándose de bacterias, levaduras, algas y otros protozoos (Marciano-Cabral, 1987). *Naegleria* se considera un parásito facultativo y representa un estado de transición entre los organismos de vida libre y los parásitos (Kilvington, 1991). Se conocen hasta ahora más de 10 especies del género *Naegleria*; cada especie puede ser distinguida sobre la base de su morfología quística (Marciano-Cabral, 1988) y además por sus características bioquímicas, se han propuesto más subespecies para el género (De Jonckheere, 1984; Rivera *et al.*, 1990; Scaglia, 1983).

El estudio de estas amebas de vida libre ha demostrado que un grupo muy reducido causa infecciones en el ser humano incluyendo a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Hartmannella*. De estos, *Naegleria fowleri* es capaz de provocar una meningoencefalitis fulminante conocida como meningoencefalitis amebiana primaria o MEAP la cual ocasiona la muerte en un lapso de 3 a 7 días después de haber adquirido la infección. La MEAP producida por *Naegleria fowleri* invariablemente ocasiona la muerte del enfermo. La infección se adquiere por la inhalación de agua o aire que contenga amebas. Al entrar por la nariz las amebas alcanzan el epitelio olfatorio de la mucosa pituitaria y penetran de manera directa hasta el cerebro a través del nervio olfatorio diseminándose a otras partes del encéfalo. Dado que la invasión es muy rápida, hay destrucción del tejido nervioso y de prácticamente todo el encéfalo. Esta enfermedad ha sido reportada en países como Bélgica, República Checa, Gran Bretaña, Australia, Estados Unidos, Venezuela, Panamá y también en México (Gallegos, 1997).

El cuadro clínico es muy parecido a la meningitis bacteriana; sin embargo, en la infección por *Naegleria* la mayoría de los casos han tenido como antecedente la natación, en época calurosa, de individuos sanos y jóvenes. La evolución clínica es muy rápida y termina con la instalación de coma y muerte 2 ó 3 días después de la aparición de los primeros signos y síntomas. El diagnóstico se confirma con el aislamiento de las amebas del líquido cerebroespinal o del tejido de biopsia cerebral (Martinez 1985).

En México existen las condiciones adecuadas para el desarrollo de amebas del género *Naegleria* y los casos de MEAP reportados pueden representar solo una pequeña parte de los que en realidad pueden existir. Es posible que algunos casos de MEAP sean atribuidos a infecciones bacterianas o virales. El problema esta en la dificultad para la identificación de las amebas por observación directa de los trofozoítos en el líquido cefalorraquídeo, o a partir de cultivos en medios de agar especiales. Más aún, la identificación morfológica de los trofozoítos solo es confiable hasta el nivel de género. El diagnóstico de las especies del género *Naegleria* requiere que las amebas sean aisladas, clonadas y cultivadas en cantidades masivas para su identificación. Este proceso puede hacerse

trabajando intensivamente en un período de 2 a 4 días para llegar a la identificación hasta género, y la determinación del organismo hasta especie puede tardar más tiempo y requiere de gran experiencia.

La importancia de estas amebas como agentes causales de enfermedades en seres humanos no es bien conocida en el área biomédica, y es probable que varios de los casos de meningoencefalitis registrada como de etiología desconocida hayan sido causados por estas amebas. No existe un tratamiento satisfactorio para la MEAP y solo la anfotericina B ha resultado ser la mejor droga amebicida en experimentos *in vitro* para tratar la MEAP causada por *Naegleria fowleri* (Anderson, 1972; Apley, 1970; Loschiavo, 1993; Pongvarin, 1991; Seidel, 1982; Wang, 1993). Se conocen cinco casos de personas sobrevivientes de MEAP que fueron tratados con anfotericina B, la cual fue aplicada por vía intravenosa e intratecal. Dichos casos fueron de niños de Australia, Gran Bretaña, India, Estados Unidos y México (Carter, 1969; Dhu 1982; Donald, 1979; Duma, 1976; Lee, 1979; Scaglia, 1988; Seidel, 1982; Smego, 1984; Stevens, 1981).

Más recientemente, se han probado de manera experimental, *in vitro*, algunas drogas con capacidad para actuar en contra de la ameba *N. fowleri*, sin causar daños colaterales graves como cuando se utiliza el antimicótico anfotericina B (Schuster, 1998). Una de esas drogas es la azitromicina, eficaz en animales de experimentación a las que se les induce MEAP y luego son tratados con el medicamento obteniendo un nivel de protección del 100% mientras que la anfotericina B protege solo un 50 % de los animales en las mismas condiciones. La azitromicina incluso ha sido valorada con éxito en la prevención de la infección (Goswick, 2003).

Con estos antecedentes es imprescindible que la identificación de *Naegleria fowleri* se haga en el menor tiempo posible. Sin embargo, con la metodología convencional para obtener un diagnóstico de la especie amebiana causante de una infección puede haber un retardo de hasta cinco días, si el análisis es hecho por un experto. Lo anterior ha motivado que actualmente se empiecen a utilizar algunas herramientas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y el análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (PLFR), para lograr la identificación precisa de las AVL hasta en un tiempo de cuatro horas a nivel experimental. Se prevé que este análisis pueda ser aplicado en el mediano plazo como una prueba diagnóstica rutinaria para detectar a la MEAP. Con esta prueba se podría monitorear la presencia de amebas patógenas en el ambiente y en tejidos tales como córnea, cerebro y líquido cefalorraquídeo.

Ecología

Diversos trabajos sobre el hábitat de *N. fowleri* han demostrado que ésta es una ameba termófila, que crece bien a temperaturas que oscilan alrededor de los

45°C (Delattre, 1981; Gupta, 1999; Kasprzak, 1982). Por ello los lugares adecuados para aislar a este tipo de amebas son los canales que reciben aguas calentadas de plantas termoeléctricas, estanques naturales de agua termal (Kyle, 1986) y casi cualquier cuerpo de agua donde las altas temperaturas permitan la supervivencia y multiplicación de estas amebas. En la mayoría de las áreas geográficas donde se ha aislado a *N. fowleri*, se ha observado que la incidencia del organismo está determinada por los ciclos estacionales, y depende de la temperatura, obteniendo números elevados de amebas en el verano y el otoño y bajas concentraciones en el invierno y primavera (De Jonckheere, 1987).

Las AVL son consideradas como un grupo cosmopolita, que viven en el suelo, cuerpos de agua dulce, sedimentos, agua marina y en el aire, se les encuentra adheridas a partículas de materia orgánica suspendidas en la columna del agua y en la superficie, aunque también son epífitas y epizóicas en organismos sumergidos dentro del cuerpo de agua. Las AVL viven en una amplia diversidad de hábitats, sin embargo, su estudio es complicado debido al tamaño escala de los ecosistemas. Incluso una acumulación temporal de agua en el suelo puede ser visto como un océano o por lo menos como un valle completo donde las amebas pueden tener contacto con bacterias y otras fuentes de alimento (Rodríguez, 1994).

Estos protozoos viven en las interfaces agua-suelo, agua-aire, agua-animal, agua-planta, entre otros, donde se alimentan de bacterias, hongos, levaduras, algas y protozoos incluyendo otras amebas (Rodríguez, 1994). El amplio hábitat de AVL se debe a su capacidad de colonizar ambientes con características muy variadas. Las AVL pueden soportar los cambios ambientales usando principalmente su capacidad para formar quistes. El enquistamiento es la manera en que las amebas responden a cada uno de los cambios ambientales, en esta forma las amebas pueden sobrevivir a la sequía, cambios de pH, radiación ultravioleta, falta de oxígeno y escasez de alimento. De esta manera los quistes de estas amebas sirven como estructuras de resistencia y dispersión. (Rivera *et al.*, 1993; Rodríguez *et al.*, 1993).

Las amebas son dispersadas por el viento y corrientes de agua, generalmente en forma de quistes, una vez en el aire o en el agua actúan como cualquier otra partícula de materia suspendida. Por lo tanto la suspensión, transportación y resuspensión dependen de la dinámica atmosférica más que de sus propios mecanismos de dispersión (Rodríguez, 1994). Una vez en un nuevo hábitat las AVL pueden exquistar y proliferar si hay suficiente cantidad de materia orgánica, bacteria u otras fuentes de nutrientes para poder alimentarse (Rivera *et al.*, 1993).

Las AVL se encuentran distribuidas por todo el mundo, pero la composición particular de especies y su número determinado en un sitio en particular depende ampliamente de las características del ambiente en que éstas se

encuentren, así como también de su capacidad de estas para colonizar y sobrevivir bajo condiciones adversas, lo cual determina su distribución en el ecosistema.

El éxito para el establecimiento de una nueva población depende principalmente de factores ambientales tales como la disponibilidad de alimento y la temperatura (Smirnov, 2002). La distribución de algunas especies depende de su capacidad para sobrevivir bajo condiciones adversas. Las amebas de vida libre han desarrollado dos estrategias de supervivencia para una mayor dispersión de la especie: formando quiste y produciendo numerosos y pequeños organismos en busca de alimento. Las amebas de vida libre que son capaces de formar quistes pueden sobrevivir durante periodos largos de escasez de alimentos, sin embargo estas no pueden tomar ventaja de los medios ambientes irregulares hasta que la acumulación de alimento sea suficiente para revertir los procesos de enquistamiento (Rodríguez, 1994).

Las AVL son capaces de establecer relaciones simbióticas con otros microorganismos tales como bacterias, virus y hongos (Rodríguez, 1994). Algunas AVL pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Sappinia* y *Balamuthia* causan enfermedades fatales en seres humanos y son portadoras de otros patógenos como *Legionella pneumophila* (Schuster y Visvesvara, 2004).

Las amebas de vida libre juegan un papel importante como depredadoras de bacterias, consecuentemente la dinámica de sus poblaciones se encuentra relacionada. El factor de mayor importancia en la distribución de AVL en el agua y suelo es la presencia de un suministro de alimento bacteriano disponible. Los cuerpos de agua con una alta concentración de materia orgánica producen un incremento en las poblaciones de bacterias que alimentan a las amebas y protozoos en general (Barcina, 1991; González, 1990; Kinner, 1997).

Dentro de los cuerpos de agua las amebas necesitan adherirse a partículas de materia que se encuentren suspendidas en la columna de agua para poder alimentarse. Los sustratos de materia suspendida en la columna de agua son un elemento importante en el comportamiento de los cuerpos de agua como un nicho ecológico y un recurso para microorganismos ya que en su superficie hay concentración de nutrientes que en su momento aumenta la supervivencia microbiana (Brown, 1999; Xinyao, 2005).

Los géneros que han sido encontrados frecuentemente en cuerpos de agua dulce son: *Vahlkampfia*, *Naegleria*, *Hartmanella*, *Acanthamoeba*, y *Vanella* (Kyle y Noblet, 1986,1987; Ettinger *et al.*, 2003). Las AVL normalmente toleran temperaturas entre los 10 y 30 °C. El agua caliente puede estimular el crecimiento y la distribución de las AVL particularmente aquellas especies que son termotolerantes (Schuster y Visvesvara, 2004). Algunas amebas como *N.*

fowleri crecen muy bien por arriba de los 37°C y algunas especies de *Hartmanella* pueden incluso tolerar los 48 °C. *Naegleria* ha sido aislada principalmente de cuerpos de agua dulce incluyendo lagos, (Kyle y Noblet, 1985, 1987) ríos, (Ettinger *et al.*, 2003) estanques, manantiales, arroyos, albercas y plantas de tratamiento (Anderson, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2004).

Naegleria fowleri es una ameba termotolerante capaz de sobrevivir a temperaturas por arriba de los 45 °C, debido a esta cualidad que presenta la especie, ha sido aislada principalmente de varios cuerpos de agua caliente (Huizinga y McLaughlin, 1990; Sycora *et al.*, 1983). Sin embargo, la capacidad de crecer a temperaturas elevadas no es un factor determinante de la patogenicidad de este género, algunas especies como *N. australiensis*, *N. andersoni* y *N. lovaniensis* son termotolerantes y potencialmente patógenas en modelos experimentales con ratones. Solamente *N. fowleri* es causante de MEAP en seres humanos (Martínez y Visvesvara, 1991).

Algunas especies del género *Acanthamoeba* son muy tolerantes a condiciones extremas (Rodríguez, 1994) pudiendo desarrollarse en medios ácidos y básicos, se sabe que estas amebas pueden crecer en ámbitos amplios de pH los cuales fluctúan entre valores de 4 a 12, esto sugiere su gran habilidad para colonizar una amplia variedad de nichos. (Kahn, 2003; Mayers, 1998).

Las especies de *Acanthamoeba* patógenas para los humanos (y otros mamíferos) tienen que ser capaces de sobrevivir a 37 °C (y un poco más arriba de la temperatura corporal). Relativamente pocas especies han sido asociadas con infecciones humanas: *Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetii*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhyssodes* y *A. astronyxis*. Otras especies, sin embargo, pueden ser termotolerantes pero no patógenas. De esta manera, la tolerancia a temperaturas elevadas es necesaria, pero no suficiente para la infección de seres humanos y otros mamíferos (Schuster y Visvesvara, 2004).

De manera general, las AVL normalmente viven en la superficie del suelo, agua, materia orgánica, plantas y animales, hasta que los procesos de resuspensión las llevan dentro de la columna de agua. Una vez en los sedimentos solamente algunas amebas resistentes a la anoxia y cambio de condiciones pueden sobrevivir ya sean como quistes o trofozoítos. Los procesos de resuspensión pueden permitir a las amebas alcanzar desde los sedimentos la interfase agua-aire donde estas tienen mejores condiciones para vivir. La superficie disponible, los cambios de pH, osmolaridad, temperatura y materia orgánica determinan si las amebas de vida libre consiguen existir dentro de los cuerpos de agua (Anderson, 2000; Rodríguez, 1994).

Manifestaciones clínicas

Naegleria fowleri es el agente causal de la MEAP una infección fatal fulminante del sistema nervioso central, llamada así para diferenciarla de la

meningoencefalitis de penetración secundaria al cerebro por *Entamoeba histolytica* la cual ataca primero al intestino y sólo después provoca abscesos del hígado y cerebro. La MEAP comienza por una nasofaringitis y evoluciona de manera muy rápida hasta una meningoencefalitis, caracterizada por un cuadro clínico de tipo agudo y hemorrágico capaz de provocar la muerte fulminante por lo general tres días después de haber adquirido la infección (Barnett, 1996; Hashimoto, 1999; Kidney, 1998; Kuroki, 1998; Scaglia, 1997; Singh, 1998; Sugita, 1999). Se han descrito otras especies de *Naegleria* con potencial patógeno como *N. australiensis* y *N. italica* que causan infecciones en ratones y en otros animales (DeNapoli, 1996; Dingley, 1996; John, 1995; Levy, 1998; Rivera *et al.*, 1983; Shalini, 2002; Shenoy, 2002; Szenasi, 1998).

La forma de infección por *N. fowleri* es por la inoculación intranasal de trofozoítos o por la inhalación de quistes y ameboflagelados en el epitelio olfatorio que se revierten a la forma trófica, aunque se tiene el antecedente de la inhalación de quistes de *N. fowleri* a partir de corrientes de aire o tolvaneras como fuente de contagio (Culbertson, 1981). El padecimiento de MEAP en la mayoría de los casos ha sido precedido por el informe de que los individuos habían nadado en lagos, piscinas o cuerpos de agua termal (Rohr, 1998). *Naegleria fowleri* es la única especie del género que ha sido aislada de casos de MEAP en el hombre y aunque *N. australiensis* ha sido descrita como patógena en ratones causándoles meningoencefalitis, no se ha demostrado hasta ahora su patogenicidad en el hombre (De Jonckheere, 1981, 1983).

En casi todos los casos *Naegleria fowleri* entra al cuerpo al ser inhalada o salpicada hacia el epitelio olfatorio (Figura 1). Sin embargo, en algunos casos los pacientes no tuvieron contacto con agua dulce, y aparentemente pudieron haber contraído la enfermedad por la inhalación de polvo cargado con quistes del protozoario. Las células sustentaculares del neuroepitelio olfatorio son capaces de una fagocitosis activa, y este parece ser el mecanismo por medio del cual las amebas invaden el cuerpo. Las amebas viajan entonces desde los espacios axonales del nervio olfatorio no mielinizado hacia el cerebro. El nervio olfatorio termina en el bulbo olfatorio, el cual está localizado en el espacio subaracnoidal ricamente vascularizado y que es bañado por el líquido cefalorraquídeo (Baron, 1996).

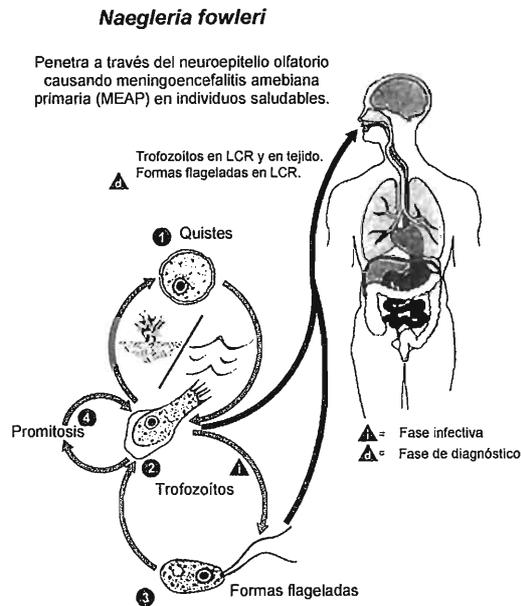


Figura 1. Esquema del proceso de infección de *Naegleria fowleri* en el ser humano, los números indican las fases en que puede estar la ameba al momento de la infección (Tomado del Center for Diseases Control, 2007).

El cerebro de un paciente con meningoencefalitis amebiana primaria muestra los hemisferios cerebrales congestionados y edematosos, con evidencia de incremento en la presión intracraneal. La aracnoides está severamente congestionada, los bulbos olfatorios y los córtices orbitofrontales están usualmente necróticos y hemorrágicos. Las leptomeninges muestran un exudado purulento fibrinoso compuesto de leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos, algunos monocitos y unos pocos linfocitos. Esos cambios pueden estar presentes a través de los hemisferios cerebrales, tallo cerebral, cerebelo y la parte superior de la médula espinal. Algunas amebas pueden ser observadas en el exudado purulento. *Naegleria fowleri* no utiliza los vasos sanguíneos o los pulmones como ruta hacia el SNC durante las primeras etapas de la MEAP (Jarolim *et al.*, 2000).

Morfología de *Naegleria*

Trofozoíto

Naegleria fowleri aislada de seres humanos es una ameba morfológicamente idéntica a las amebas comunes no patógenas *N. gruberi* y *N. australiensis*. Los

trofozoítos son activos y cambian constantemente de forma y tamaño, cuando se redondean miden 10-15 μm de diámetro. Los trofozoítos se caracterizan por tener seudópodos redondeados o romos llamados lobópodos. Estas extensiones permiten el desplazamiento de los trofozoítos hacia delante. Bajo condiciones adversas los trofozoítos tienden a enquistarse (Figura 2). El citoplasma es de granulado muy fino y contiene un halo nuclear claro y conspicuo y un nucléolo central denso y en su citoplasma se aprecian claramente numerosas vacuolas alimenticias y contráctiles (Martinez, 1985).

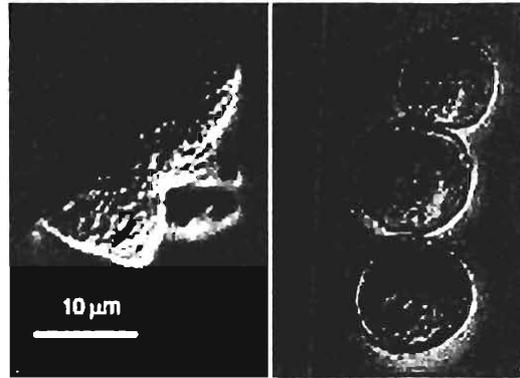


Figura 2. *Naegleria fowleri* a la izquierda en su forma ameboidea y a la derecha en la forma de quiste. La escala de la barra es de 10 micrómetros (Imagen tomada por Bret Robinson, Australian Water Quality Centre and CRC for Water Quality Research).

La superficie externa del trofozoíto es irregular y presenta estructuras parecidas a ventosas o amebostomas (ver abajo) las cuales han sido relacionadas como determinantes de virulencia y capacidades de invasión y fagocíticas de *N. fowleri* (Jantzen, 1983). El núcleo de *N. fowleri* está rodeado por dos membranas electrodenudas claramente visibles separadas por un espacio claro. También son visibles unos cuantos poros en la envoltura nuclear. En estas amebas no se reconoce claramente la presencia de un aparato de Golgi (Martinez, 1985).

Los trofozoítos de *N. fowleri* y de *N. australiensis* presentan estructuras fagocíticas distintivas conocidas como amebostomas (Figura 3). Los amebostomas son utilizados para engullir diversas partículas y tipos de células que sirven de alimento a *Naegleria* (John, 1984). Algunos estudios indican que a diferencia de lo mencionado por Jantzen (1983) acerca de la relación entre virulencia y presencia de amebostomas en los trofozoítos de *Naegleria*, existe una correlación inversamente proporcional entre el número de amebostomas por ameba y su virulencia en ratones.

Según John (1984) los datos sugieren que mientras más virulenta sea una cepa de *Naegleria*, menor cantidad de amebostomas deberán estar presentes y presumiblemente deberá de haber una menor actividad fagocítica.

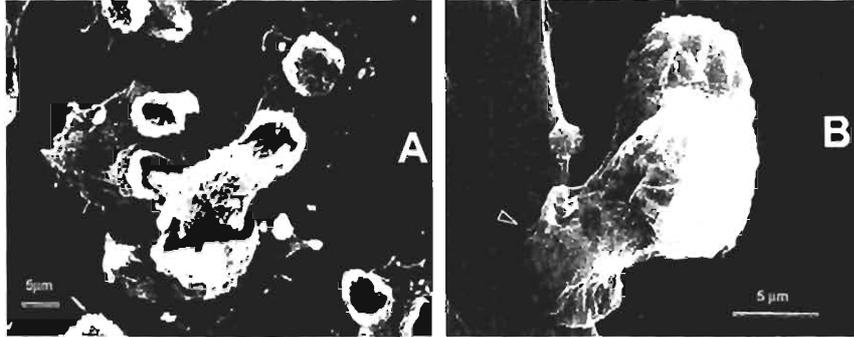


Figura 3. Micrografías de barrido mostrando los amebostomas de *Naegleria fowleri*, en A se aprecian tres amebas *N. fowleri* engullendo porciones de una cuarta ameba y en B una ameba de la especie *Naegleria fowleri* con un amebostoma (flecha) adherido a una célula Vero (Tomadas de John, 1993).

Quiste

Los quistes son esféricos con un diámetro de 8-12 μm , con una pared lisa de una sola cubierta. La pared está perforada por uno o dos poros lisos taponados por mucus, a través de los cuales emergerán los trofozoítos regenerados. El citoplasma del quiste es finamente granuloso con un núcleo central característico.

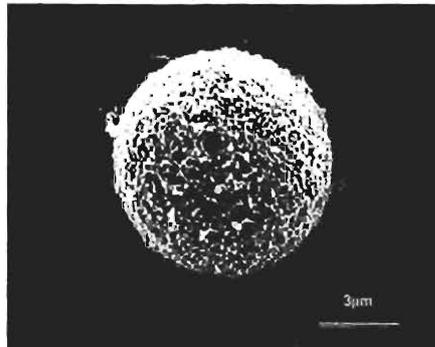


Figura 4. Micrografía tomada con el microscopio electrónico de barrido de un quiste de *Naegleria fowleri* mostrando un solo poro característico de la especie. (Tomado de John, 1993).

El análisis por microscopía electrónica muestra en promedio la presencia de dos poros u ostiolos por quiste (Figura 4) con una pared relativamente delgada (Schuster, 1975), una particularidad que hace a los quistes especialmente susceptibles a la desecación. Por otra parte, los quistes de las amebas pertenecientes a *Naegleria australiensis* son de pared lisa con la aparición de múltiples poros en algunos casos hasta 8 por quiste (De Jonckheere, 1981).

Fase flagelar

Una de las características más notables de diferenciación entre protistas se encuentra en algunas especies de naeglerias, incluyendo a *N. fowleri* y es la capacidad para cambiar su forma de ameba a una fase temporal flagelada (Fulton, 1977). Durante la mayoría de su ciclo de vida *Naegleria fowleri* tiene una forma amebiana típica, alimentándose de bacterias del ambiente y dividiéndose por fisión binaria, sin embargo, cuando las bacterias son diluidas (tanto por la lluvia como por adición de agua en experimentos de laboratorio) cada *N. fowleri* desarrolla rápidamente una forma alargada y forma dos largos flagelos anteriores (Figuras 5 y 6).



Figura 5. Micrografía electrónica de barrido de *Naegleria fowleri* cepa KUL mostrando la fase de flagelación con dos flagelos emergiendo de la parte inferior del rostrum (tomada de John, 1993).

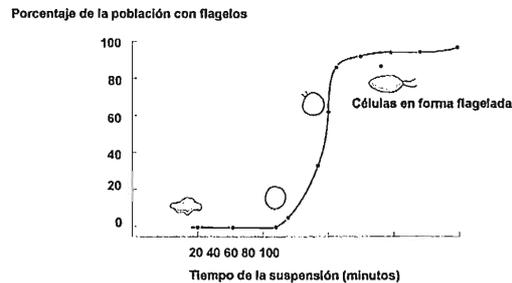


Figura 6. Diferenciación del fenotipo flagelado en *Naegleria*. Amebas creciendo en medio con bacteria son lavadas e inoculadas en agua destilada al tiempo 0 desarrollan en aproximadamente 80 minutos poblaciones en fase flagelada (Fulton, 1977).

Esta particularidad de formación temporal de *Naegleria fowleri* para desarrollar una fase flagelada, es utilizada como una de las características para el diagnóstico taxonómico de *N. fowleri*, aunque no necesariamente del género, ya que De Jonckheere (2001) ha demostrado que algunas especies de *Naegleria* carecen de esta capacidad, sin embargo, en el caso de *N. fowleri* la ameboflagelación sigue siendo uno de los criterios tomados en cuenta para su identificación.

Epidemiología

El primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria en un joven de 16 años ocurrido en México data de 1978, el evento tuvo lugar en Mexicali, Baja California y en el expediente del paciente se reportó como antecedente que el joven había nadado previo a la infección en algunos canales de riego del valle de Mexicali, sin embargo el caso fue publicado de manera formal seis años después (Valenzuela *et al.*, 1984).

Todos los casos de MEAP han sido diagnosticados *post mortem*, con excepción de algunos reportes en México, Inglaterra, Australia y los Estados Unidos (Rondanelli, 1987). La razón de este comportamiento es que el retardo en el diagnóstico permite que las amebas invadan rápidamente los centros nerviosos (Jarolim, 2000). El proceso ocurre en un máximo de seis días y si antes de ese tiempo no se ha aplicado la terapia medicamentosa adecuada la muerte del sujeto es inminente. Actualmente no existe un tratamiento efectivo para el tratamiento de pacientes con MEAP y ello se debe a que los amebicidas, antibacterianos, antimicóticos y algunos desinfectantes no son efectivos contra las amebas del género *Naegleria*. Hasta ahora solo dos casos han sido tratados con éxito, uno en Monterrey (Rodríguez, 1984) utilizando dentro de los tres primeros días de evolución del padecimiento, una dosis elevada de anfotericina B y la mezcla de este potente antimicótico con rifampicina, miconazol y tetraciclina. Y el otro el de un niño de 10 años en Ciudad Obregón Sonora quien fue diagnosticado con MEAP causada por *N. fowleri* una semana después de haber nadado en un canal de irrigación de la zona del río Yaqui en el valle de Sonora, el paciente fue tratado con anfotericina B, fluconazol y rifampicina y se recuperó exitosamente (Vargas, 2005).

En México, desde la década de los 80's Rivera y colaboradores han realizado diversos trabajos en relación con amebas de vida libre. Ellos aislaron amebas anfizoicas de cuerpos de agua naturales y recreativas (Rivera *et al.*, 1990; 1993), a partir de la atmósfera (Rivera *et al.*, 1987; 1994), y de casos clínicos, tanto de MEAP, encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) como de queratitis amebiana (Rivera *et al.*, 1989). A la fecha se tienen detectados diversos lugares en la República Mexicana donde se ha aislado a *Naegleria fowleri* a partir de muestras biológicas en pacientes con meningoencefalitis, de agua de piscinas y de cuerpos de agua natural (Figura 7).

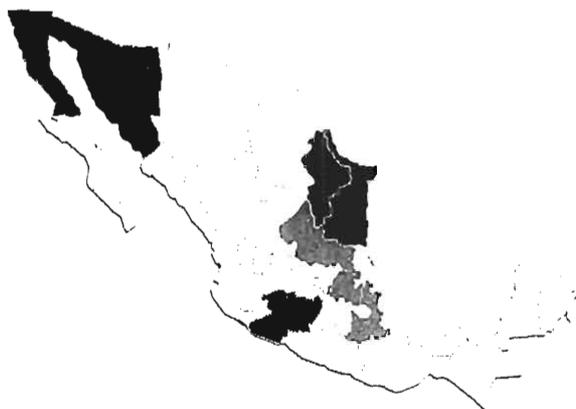


Figura 7. Se muestran los estados en la República Mexicana que hasta la fecha han sido estudiados para la búsqueda de *Naegleria fowleri*, en azul se muestran los lugares donde se han reportado casos de MEAP por *N. fowleri*, y en gris donde solo se ha aislado a la ameba del agua.

En México, se han confirmado 30 casos de MEAP en la región noroeste del país (Cuadro 1) de los cuales se han publicado cinco de los cuales dos pacientes fueron tratados exitosamente (Rodríguez Pérez, 1984; Vargas *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Casos de meningoencefalitis amebiana primaria registrados en México (1978-2005) Adaptada de Lares, 2001 y actualizada a septiembre de 2005.

Lugar de residencia	Método de diagnóstico				Total
	autopsia	amebas en LCR	epidemiológico	cultivo	
Baja California	2	5	9	7	23
Nuevo León		1			1
Michoacán	1				1
Sonora		1		3	4
Tamaulipas		1			1
Total					30

El primero de ellos, un adolescente varón de 16 años se reportó en Mexicali B. C., la historia clínica señaló que su ingreso al hospital fue debido a un intenso dolor de cabeza, y que siete días antes el paciente había nadado en un canal de riego de poca profundidad (Valenzuela *et al.*, 1984). El paciente murió tres días después de haber sido hospitalizado. La observación del líquido cefalorraquídeo mostró formas amebianas en movimiento activo. El análisis *post mortem* reveló una meningoencefalitis con hemorragia severa y amplia destrucción de la fosa posterior del cerebro. La tinción con inmunoperoxidasas para las amebas aisladas del tejido cerebral, fue positiva para *N. fowleri*.

El segundo caso, fue una niña de seis años que jugó con agua de un tinaco infectado, identificado en Monterrey, N. L. (Rodríguez-Pérez, 1984). El diagnóstico en este caso se hizo a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo y la observación directa de las muestras así como las preparaciones con la técnica de coloración de Gómorí, revelaron que el proceso infeccioso fue provocado por *N. fowleri*. Un hecho notable en este caso es que la paciente sobrevivió después del tratamiento con anfotericina B.

El tercer caso descrito en México, ocurrió en la población de Huetamo, Michoacán (López-Corella *et al.*, 1989) a un joven de 13 años que presentó MEAP con destrucción del cerebelo. Las muestras tomadas de las lesiones del tejido nervioso mostraron numerosos trofozoítos de amebas, los cuales fueron posteriormente identificados por inmunohistoquímica como *N. fowleri*. En este caso quedó sin precisar el origen de la infección pero se presume que pudo haberse adquirido en una poza de cría de peces ya que el paciente nadaba en ese lugar con frecuencia, el paciente no sobrevivió. La importancia de estas amebas como agentes causales de enfermedades en seres humanos no es bien conocida en el área biomédica, y es probable que varios de los casos de meningoencefalitis registrada como de etiología desconocida hayan sido causados por estas amebas.

Diagnóstico y control de la MEAP

La meningoencefalitis amebiana primaria no puede ser clínicamente distinguida de las meningoencefalitis pirogénicas agudas o bacterianas. La enfermedad generalmente se presenta en niños y en adultos jóvenes con buena salud quienes han nadado recientemente en agua caliente. Una tomografía axial computarizada del cerebro muestra obliteración de las cisternas que rodean el cerebro medio y el espacio subaracnoideo sobre los hemisferios cerebrales. (Figura 8).

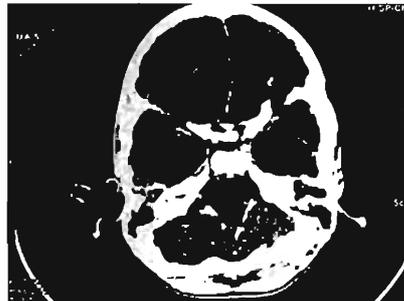


Figura 8. Tomografía axial computarizada la flecha muestra la región fronto-basal con daño en la línea media del cerebro de derecha a izquierda causado por *Naegleria fowleri* (Cogo, 2004).

La enfermedad puede ser diagnosticada rápidamente por el examen microscópico en contraste de fases de una o dos gotas de líquido cefalorraquídeo obtenido recientemente para la búsqueda de trofozoítos de *Naegleria fowleri*. El organismo puede también ser cultivado a partir de LCR o tejido cerebral para lograr un diagnóstico definitivo. Diagnósticos retrospectivos han sido hechos por el examen de secciones de tejido cerebral embebidos en parafina teñidos con hematoxilina y eosina (Figura 9).

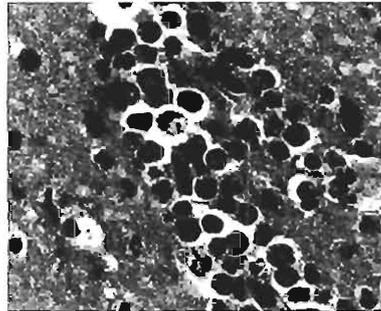


Figura 9. La flecha muestra trofozoítos de *Naegleria fowleri* en las capas superficiales del tejido cerebral (Cogo, 2004).

Hasta ahora se han reportado en todo el mundo más de 200 casos de meningoencefalitis amebiana primaria, de los cuales solamente han sobrevivido cinco pacientes (Poungvarin, 1991; Hara, 2005).

Pocos pacientes han sobrevivido a la infección de meningoencefalitis amebiana primaria. En esos pacientes, la enfermedad fue diagnosticada en su fase temprana y fue tratada agresivamente con dosis altas de anfotericina B. La anfotericina B y el miconazol parecen ser las drogas de elección para el tratamiento de esta infección. La oportunidad de adquirir la infección puede ser reducida por la cloración adecuada de piscinas y tinas de hidromasaje y por evitar nadar o realizar clavados en cuerpos de agua termal (Baron, 1996).

Con estos antecedentes hace imprescindible que la identificación de *Naegleria fowleri* se haga en el menor tiempo posible, sin embargo, la metodología convencional para llegar a un diagnóstico de la especie amebiana causante de una infección puede tardar hasta cinco días si el análisis es hecho por un experto. Por otra parte las pruebas diagnósticas que involucran análisis serológicos como ELISA, hemoaglutinación indirecta, inmunofluorescencia directa/indirecta no son muy seguros en el diagnóstico durante la etapa aguda dado que anticuerpos de diversas especies de *Naegleria* han sido detectados en personas normales (Jain, 2002; Reilli, 1983; John, 1982). De ahí que actualmente se empiecen a utilizar algunas herramientas de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y el

análisis de los polimorfismos de longitud de los fragmentos de restricción (PLFR) para lograr la identificación precisa de las AVL hasta en un tiempo de cuatro horas a nivel experimental, pero se prevé que este análisis pueda ser aplicado a mediano plazo como una prueba diagnóstica rutinaria para detectar la MEAP (Kilvington com. pers.).

Justificación

En Mexicali B. C. se han reportado brotes anuales de meningoencefalitis (5-13 casos en cada ocasión) de etiología desconocida desde 1990. Los casos se dan a finales de la estación de verano durante los meses de agosto y septiembre, una época de calor extremo para ese estado del país (Ontiveros, 1995). Casos de muertes por meningoencefalitis aparecieron en varias partes de Mexicali. El primer paso tomado por los servicios de salud del estado de Baja California fue el de hacer un estudio intensivo para buscar bacterias y tipificar la infección como bacteriana, la causa más común de este padecimiento. Sin embargo, las pruebas resultaron negativas y la enfermedad incierta (Ruiz-Matus com. pers.).

En la historia clínica de los pacientes que murieron en Mexicali se reportó que algo en común previo a la enfermedad, fue el hecho de haber nadado en los canales de riego que hay en la zona. Dichos canales son utilizados por la gente, sobre todo en el verano, para nadar y mitigar el excesivo calor de la zona de Mexicali que en algunos lugares puede alcanzar más de 55 °C, pudiendo llegar la temperatura del agua a 40°C, temperatura ideal para el desarrollo de *N. fowleri*. Por ello y ante posibles nuevos brotes de MEAP se efectuó esta investigación para la búsqueda de *Naegleria fowleri* que pudiera estar implicada en el origen de la enfermedad reportada en Mexicali, B. C. Los muestreos en la zona podrían demostrar la presencia de amebas que pudieran estar relacionadas con los casos de meningoencefalitis mencionados. Lo anterior justifica el inicio de un estudio global, biomédico y ecológico, de los organismos aislados en Mexicali. De aislarse *N. fowleri* de esos canales de riego, se podría establecer la participación de *N. fowleri* como el posible agente causal de la MEAP y ello permitiría hacer el seguimiento ecológico y biomédico de esta ameba, y con ello aplicar el conocimiento generado para la prevención de más brotes de MEAP.

Algunos casos de MEAP han sido reportados cerca de la frontera con México y han justificado la necesidad de cooperación entre México y los Estados Unidos para hacer estudios en nuestro territorio para detectar los factores de riesgo que puedan ayudar a la prevención y control de la MEAP en ambos países (DeNapoli, 1996; Levy, 1998).

En el ambiente se pueden encontrar diferentes especies de *Naegleria* y ser una potencial fuente de infección para los seres humanos. Por ello, el diagnóstico diferencial y la aplicación de la terapia apropiada y específica dependerán de la identificación precisa de la ameba en el laboratorio. En la mayoría de los casos

se puede alcanzar el aislamiento del organismo a partir de muestras del ambiente, sin embargo, la identificación y la diferenciación de los aislados patógenos y de los no patógenos es muy difícil y requiere de mucho tiempo.

En la actualidad los métodos con los que contamos no reúnen los requerimientos de rapidez, especificidad, sensibilidad y confiabilidad para diagnosticar *N. fowleri*. Los criterios morfológicos no son todo lo adecuados que deseáramos, y deben combinarse con las características de termotolerancia, virulencia en animales de laboratorio y variabilidad genética de los aislados de *Naegleria*, para tener un diagnóstico más preciso del organismo. Por ello se pretende acercar los métodos moleculares para el análisis del ADN total o mitocondrial por digestión con endonucleasas de restricción, el análisis del perfil isoenzimático, el uso de PCR con iniciadores al azar (Van Belkum, 1992; Pélandakis, 1997; 1998; 2002) y diseñados para la diferenciación específica y rápida de *Naegleria fowleri* (Sparagano, 1993; Kilvington, 1995; Reveiller, 2002; Sheehan, 2003; Maclean, 2004; Marciano Cabral, 2003).

Clasificación de *Naegleria*

Dentro del género *Naegleria* se reconocen 34 especies conocidas y 22 más aún sin ser descritas a nivel de especie. De esas, 14 son termófilas con capacidad para crecer a temperaturas de 40 °C o más (Cuadro 2).

Cuadro 2. Listado de las especies de *Naegleria* reconocidas a la fecha, T. máx. °C indica la temperatura máxima de crecimiento en condiciones de laboratorio. Adaptado de National Center for Biotechnology Information (NCBI), American Type Culture Collection (ATCC) y De Jonckheere, 2002.

Especies de <i>Naegleria</i>	T. máx. °C	<i>Naegleria</i> spp.	T. máx. °C
<i>Naegleria americana</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. 543	<40
<i>Naegleria andersoni</i>	40	<i>Naegleria</i> sp. 550	<40
<i>Naegleria angularis</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. 552	<40
<i>Naegleria antarctica</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. ATCC 30294	<40
<i>Naegleria australiensis</i>	42	<i>Naegleria</i> sp. N121	<40
<i>Naegleria carteri</i>	45	<i>Naegleria</i> sp. NG055	<40
<i>Naegleria chilensis</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. NG236	<40
<i>Naegleria clarki</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. NG334	<40
<i>Naegleria dobsoni</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. NG427	<40
<i>Naegleria endoi</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. NG434	<40
<i>Naegleria fowleri</i>	45	<i>Naegleria</i> sp. NG597	42
<i>Naegleria fultoni</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. NG650	<40
<i>Naegleria galeacystis</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. NG872	<40
<i>Naegleria gallica</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. NG874	<40
<i>Naegleria gruberi</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. NG964	<40
<i>Naegleria indonesiensis</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. PNCA-1	<40
<i>Naegleria itálica</i>	42	<i>Naegleria</i> sp. PNCA-1	<40
<i>Naegleria jadini</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. PNMA-1	<40
<i>Naegleria jamiesoni</i>	42	<i>Naegleria</i> sp. PNML	<40
<i>Naegleria laresi</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. PNMR-1	<40
<i>Naegleria lovaniensis</i>	45	<i>Naegleria</i> sp. PNTL	<40
<i>Naegleria mexicana</i>	<40	<i>Naegleria</i> sp. W	<40

Cuadro 2. Continúa

Especies de <i>Naegleria</i>	T. máx. °C
<i>Naegleria minor</i>	<40
<i>Naegleria morganensis</i>	44
<i>Naegleria niuginensis</i>	45
<i>Naegleria pagei</i>	<40
<i>Naegleria peruana</i>	<40
<i>Naegleria philippinensis</i>	40
<i>Naegleria pringsheimi</i>	<40
<i>Naegleria pussardi</i>	41
<i>Naegleria robinsoni</i>	<40
<i>Naegleria sturti</i>	44
<i>Naegleria schusteri</i>	<40
<i>Naegleria tihangensis</i>	42

La ubicación taxonómica de *Naegleria fowleri* había permanecido estable durante muchos años y se basaba en principalmente en sus características morfológicas, por los patrones generados por sus características isoenzimáticas y de proteínas totales así como por el análisis estructural de las amebas con microscopía electrónica (Page, 1988; De Jonckheere, 1982; Schuster, 1963). Sin embargo, con el desarrollo de métodos moleculares y su aplicación como una herramienta en taxonomía el esquema de clasificación de *Naegleria* ha cambiado y se ha propuesto la siguiente para ubicar a *Naegleria fowleri* (Cuadro 3) (Aladro, 2006; Patterson *et al.*, 2000).

Cuadro 3. Clasificación de *Naegleria fowleri*.

Reino:	Protozoa Goldfuss, 1818; emend. von Siebold, 1846
Subreino:	Neozoa Cavalier-Smith stat. nov 1997 emend
Infrareino:	Discicristata Cavalier-Smith, 1998
Phylum:	Percolozoa Cavalier-Smith, 1991
Subphylum:	Tetramitía Cavalier-Smith, 1993
Clase:	Heterolobosea Page & Blanton, 1985
Orden:	Schizopyrenida Singh, 1952
Familia:	Vahlkampfiidae Jollos, 1917
Género:	<i>Naegleria</i> Alexeieff, 1912; emend. Calkins, 1913
Especie	<i>fowleri</i> , R. F. Carter, 1970

Especies patógenas termófilas del género *Naegleria*

Naegleria fowleri es una ameba termófila considerada como un patógeno para el humano, con capacidad probada para causar la muerte en animales de experimentación. Por otra parte se han probado todas las demás naeglerias para determinar su capacidad o no de producir infecciones y conducir a la muerte a grupos de ratones y solo *N. australiensis* y *N. italica* han sido efectivas en establecer la infección y causar la muerte en los animales (De Jonckheere y van de Vorde, 1977). Sin embargo, no se han diagnosticado hasta el momento infecciones humanas debidas a estas dos últimas amebas. Aunque se ha

reportado un caso en México en donde se aisló *N. lovaniensis* la cual en animales de experimentación no resultó patógena y no pudo ser considerada como la causa de la muerte del paciente sino como contaminante del líquido cefalorraquídeo (Rivera *et al.*, 1989).

Descripción del área de estudio

La península de Baja California está situada en el extremo noroccidental del país, y es una estrecha franja de tierra que se desprende de la frontera con los Estados Unidos y se interna en el mar paralela a la costa continental, entre el Océano Pacífico y el Golfo de California o Mar de Cortés. El clima de la península es predominantemente seco y extremo, exceptuando la porción noroeste particularmente en las zonas más elevadas, lo que favorece la existencia de vegetación desértica con desiertos pedregosos. El promedio de temperatura media anual es de 23.2 °C con la temperatura más alta de 32.7 °C durante el mes de julio y la más baja de 12.0 °C durante el mes de enero, aunque se han reportado valores de hasta 57.0 °C en algunos días del mes de julio.

El valle de Mexicali es una extensa región que está muy cerca del valle Imperial en el sudeste de California (Figura 7). El valle de Mexicali es un ambiente desértico donde existe un extenso sistema agrícola que depende de una compleja red de canales artificiales y cuerpos de agua para su irrigación que se originan del Río Colorado. El Río Colorado comienza en las partes altas de las montañas Rocosas del Colorado. El agua proviene del deshielo y las lluvias de esa región y se complementa por los ríos Gunnison, Green, San Juan, Little Colorado, Virgin, y Gila. La corriente principal la constituye el río Colorado el cual es de carácter internacional. Al entrar en la República Mexicana cruza de norte a sur al Distrito de Riego 014, dividiendo en dos regiones agrícolas, ubicadas en ambos márgenes del río, el valle de Mexicali y el valle de San Luis, formando la parte más baja de la cuenca.

Lo reducido de la cuenca del Río Colorado y la escasa precipitación en territorio mexicano, traen como consecuencia que prácticamente no existan escurrimientos. Las dos regiones son regadas con aguas de gravedad, así como con pozos de bombeo; las aguas que se utilizan son diferentes en cuanto a su composición química, siendo de mayor salinidad las aplicadas en el valle de San Luis por utilizar aguas de drenaje agrícola del valle de Yuma, Arizona. Es importante mencionar que los canales de riego en Mexicali no están conectados de ninguna manera a algún sistema de aguas residuales de ningún tipo. El agua que se distribuye a través de ellos es agua corriente del río Colorado.

La mayoría de estos canales por donde se distribuye el agua del Río Colorado a la región de Mexicali son someros con profundidades variables que van de 50 cm hasta 1.5 m y muchos pobladores de la región los utilizan para bañarse así como para nadar y refrescarse del intenso calor de la zona. Por otra parte, la poca profundidad de los mismos permite que la radiación solar mantenga el agua caliente o templada, factor que puede aumentar la probabilidad de encontrar amebas termófilas del género *Naegleria fowleri*.



Cuadro 4. La tabla identifica los nombres de los sitios de muestreo en la zona y su ubicación en el valle de Mexicali, Baja California.

Canal	Nombre del Canal	Clave
1	Represa Morelos	RPM
2	Canal Alimentador del Norte	CAN
3	Col. Ladrillera I	LA1
4	Col. Ladrillera II	LA2
5	Ejido Morelos C. Independencia	MCI
6	Ejido Morelos Chapoteadero	MCH
7	Canal Irapuato	IRA
8	Ejido Oaxaca	OAX
9	Ejido Nayarit	NAY
10	Canal Abasolo	ABA
11	C. Islas Agrarias B	IAB
12	C. Independencia "Iey"	IND
13	Ejido Xochimilco	XCH
14	Poblado Coronita	COR



Figura 10. En el recuadro de la figura superior se muestra la zona del valle de Mexicali donde se localiza el valle de Mexicali en el estado de Baja California. En la proyección inferior se detallan los sitios de muestreo seleccionados en donde se realizaron los muestreos en este estudio (Imágenes cortesía de Image Science Laboratory, NASA Johnson Space Center USA).

El valle de Mexicali, región agrícola más importante del estado, (Figura 10) está rodeada por el desierto y forma parte del distrito de riego No. 14, tiene una superficie bruta de 207,000 hectáreas de tierras fértiles: 80,000 Has. en el municipio de Mexicali, en Baja California y 27,000 Has. en el municipio de San Luis Río Colorado, en Sonora. De aquellas, 136,000 Has. se riegan por gravedad, donde el agua es conducida a través de una extensa red de canales principales que derivan a su vez en un complejo sistema de canales secundarios y drenes destinados a inundar las parcelas en producción y 44,000 Has. por bombeo de pozos de agua.



Figura 11. En la imagen de la izquierda se muestra el detalle de la Represa Morelos en donde es entregada a México el agua proveniente del Río Colorado desde los Estado Unidos, la fotografía del lado derecho muestra uno de los canales por donde se distribuye el agua para riego en el valle de Mexicali.

El abastecimiento de agua se realiza a través del canal alimentador Central Reforma (Figura 11) la cual proviene del distrito de riego No. 14 mismo que se abastece de la presa Morelos la cual recibe por medio de la CILA (Comisión Internacional de Límites y Agua de México) mediante un tratado internacional establecido entre Estados Unidos y México, agua proveniente de la presa Hoover siendo entregada a México a través del río Colorado (COSAE, 2004).

La mayoría de los canales por donde se distribuye el agua proveniente del Río Colorado son someros y sus paredes están hechas de concreto, permitiendo que la radiación solar mantenga el agua caliente o templada dependiendo de la fuerza de su corriente, lo cual es un factor favorable para la presencia de algunas amebas de vida libre. La mayoría de los canales distribuidos en el valle de Mexicali son utilizados por los pobladores de la entidad para nadar y refrescarse del intenso calor que caracteriza al valle de Mexicali (Figura 12). El uso del agua de los canales es para el uso agrícola (74%), para uso público (25%) y para uso doméstico e industrial (1%).



Figura 12. Vista del sitio de muestreo en el canal de riego del Ejido Oaxaca, el agua está tipificada para uso en riego agrícola, sin embargo, los pobladores del lugar la utilizan para nadar, bañarse e incluso para su consumo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo de investigación realizado se dividió en tres partes, que incluyeron: trabajo de campo, análisis microbiológicos y análisis moleculares.

Muestreos

Para integrar este trabajo se llevaron a cabo 9 muestreos (Cuadro 5), en donde se incluyeron las épocas del año con marcados cambios ambientales de temperatura con el fin de evaluar si los factores estacionales en Mexicali tienen influencia en la presencia de *Naegleria fowleri* y poder relacionar la presencia de este patógeno en el agua con los casos de meningoencefalitis que se han dado anualmente en la región.

Cuadro 5. Fechas en las que se realizaron muestreos de agua en los canales de riego en el valle de Mexicali, B. C.

Fechas de muestreo	
Muestreo I	Marzo, 2000
Muestreo II	Octubre, 2000
Muestreo III	Marzo, 2001
Muestreo IV	Junio, 2001
Muestreo V	Agosto, 2001
Muestreo VI	Febrero, 2002
Muestreo VII	Septiembre, 2002
Muestreo VIII	Octubre, 2003
Muestreo IX	Mayo, 2004

Se seleccionaron como sitios de muestreo 14 canales de agua para riego en Mexicali (Cuadro 4). La selección de los canales de agua en Mexicali, Baja California se hizo con los criterios de que son los más populares para nadar y porque en la historia clínica de varios de los pacientes reportados con meningoencefalitis se anotó que habían nadado en algunos de esos cuerpos de agua, una a dos semanas antes de haber adquirido la infección (Lares y Ontiveros com. pers.).

En cada lugar se recolectaron muestras de agua, para identificar a los organismos amebianos presentes, cuantificar el número de bacterias y medir “*in situ*” el oxígeno disuelto, la temperatura del agua y del ambiente, así como la conductividad, DBO₅, cloro libre residual y el pH.

Parámetros fisicoquímicos

Los parámetros fisicoquímicos tienen gran importancia en la dinámica de los cuerpos de agua, por ello es necesario conocer su comportamiento a lo largo del tiempo para observar su relación con respecto a la distribución y el

comportamiento de las comunidades bióticas (Arredondo y Ponce, 1998). La temperatura del agua, pH, concentración de oxígeno y la disponibilidad de bacterias como fuente de alimento juegan un papel importante en la presencia y abundancia de AVL (Rodríguez, 1994). La obtención y el registro de los datos de los parámetros fisicoquímicos “*in situ*” que se consideraron para el presente estudio fueron los siguientes:

Temperatura ambiente

La temperatura ambiental es un factor que debe ser considerado cuando se buscan AVL en cuerpos de agua expuestos a las condiciones climatológicas en la zona de estudio dado que este factor influye de manera importante sobre la temperatura que pueden tener los cuerpos de agua y por consecuencia en los organismos que viven en ella.

En el caso de los canales muestreados la temperatura del agua puede ser determinada por la temperatura ambiental en conjunto con factores como la profundidad y la fuerza de la corriente que presenten los mismos. El registro de las temperaturas ambientales se hizo con un termómetro digital (Hanna Mod. HI9041) y los resultados fueron expresaron en grados centígrados (°C).

Temperatura del agua

La temperatura del agua es probablemente el factor más importante en los ecosistemas acuáticos y en el estudio de *Naegleria fowleri* y tiene relación de manera directa o indirecta con los fenómenos limnológicos, así como con la estabilidad de las masas de agua y sobre el metabolismo biótico (Arredondo y Ponce, 1998).

La temperatura del agua es un factor de gran importancia en la distribución de AVL, principalmente en especies termotolerantes. Algunas especies del género *Naegleria* potencialmente patógenas tienen la habilidad de tolerar temperaturas elevadas y pueden desarrollarse y ser más abundantes en cuerpos de agua caliente debido a la disminución o desaparición de especies no patógenas (no termotolerantes), disminuyendo así la competencia por fuentes de alimento (Gallegos, 1997).

El registro de la temperatura del agua de los canales se obtuvo con un termómetro digital (HANNA modelo HI9040). La sonda del termómetro fue introducida en cada uno de los cuerpos de agua aproximadamente a 20 cm de profundidad, se dejó estabilizar hasta obtener una lectura fija y posteriormente se registraron los datos en grados centígrados (°C).

pH

El ámbito de pH tolerado por las AVL potencialmente patógenas “*in vitro*” es de 4.6 a 9.5 (Kyle y Noblet, 1985), aunque también se ha reportado que algunas especies son resistentes a condiciones extremas y pueden tolerar pH's que van de 4 a 12. El valor de pH en los cuerpos de agua se determinó por medio de un potenciómetro digital (Oakton Modelo Testr1). Para obtener el valor de pH, el electrodo de dicho aparato se expuso al agua por unos segundos hasta obtener un valor estable.

Cloro libre residual

El cloro libre residual es un agente desinfectante utilizado en diversos procedimientos para desinfectar el agua. En los canales de riego de Mexicali, se esperaba no encontrar cloro dado el uso que se le da a este tipo de aguas, sin embargo, para comprobar esto, se hicieron análisis para determinar si había alguna cantidad de cloro en ellas, dado que en algunos lugares el agua se utiliza para nadar y para consumo humano.

El cloro fue determinado de acuerdo a las instrucciones del fabricante por el método colorimétrico de ortotoluidina con el Kit para determinar cloro libre (Hanna HI3831F).

Oxígeno disuelto

Esta variable fisicoquímica es considerada como una de las más críticas, ya que de ello depende la conservación, crecimiento y rendimiento de las poblaciones de diversos organismos incluyendo especies de AVL (Arredondo y Ponce, 1998). Debido a que *Naegleria fowleri* así como las otras AVL son organismos estrictamente aerobios, requieren de oxígeno para sobrevivir, sin embargo, cuando hay escasez de este recurso o las condiciones se vuelven anaerobias, las formas tróficas y flageladas pueden enquistarse para protección de las condiciones adversas del ambiente en que se encuentren (Gallegos, 1997; Weik, 1977a, 1977b).

La concentración de oxígeno disuelto (OD) en los cuerpos de agua se determinó con un oxímetro digital (HANNA modelo HI9143). Para determinar la concentración de oxígeno disuelto se introdujo la sonda del medidor en el agua manteniéndola inmóvil hasta que el aparato se estabilizó en un valor, y se tomó la lectura expresada en valores de porcentaje de saturación y en mg/L de OD.

Análisis fisicoquímicos y bacteriológicos adicionales realizados para los muestreos V a IX fueron: Conductividad, DBO₅ y bacterias coliformes totales.

Conductividad

La conductividad es una expresión numérica de la capacidad que tiene el agua para conducir una corriente eléctrica. El registro depende de la concentración total de sustancias ionizadas disueltas en el agua y de la temperatura a la que se realiza la medición. La movilidad de cada uno de los iones disueltos, sus valencias y su concentración real y relativa afectan a la conductividad. La estimación de la conductividad permite expresar la cantidad de sólidos totales disueltos, a fin de conocer el efecto de los diversos iones sobre el equilibrio químico, los efectos fisiológicos en las plantas y animales acuáticos. (Arredondo y Ponce, 1998).

La medición de la conductividad se hizo con un conductímetro digital (Trans Instrument modelo Walk Lab). La sonda del conductímetro fue sumergida en el agua y se tomó la lectura del aparato en el momento en que este se estabilizó en un valor, el cual se expreso $\mu\text{S}/\text{cm}$. Las lecturas tomadas en el campo se ajustaron por un factor de corrección a valores equivalentes a 25°C y el resultado se expreso como $K=25^\circ\text{C}$.

Demanda bioquímica de oxígeno (DBO_5)

El oxígeno disuelto en el agua puede ser consumido por la fauna acuática a una velocidad mayor a la que es reemplazado desde la atmósfera, lo que ocasiona que los organismos acuáticos compitan por el oxígeno y en consecuencia se vea afectada la distribución de la vida acuática.

Una medida cuantitativa de la contaminación del agua por materia orgánica (sirve como nutriente y requiere oxígeno para su descomposición) es la determinación de la rapidez con que la materia orgánica nutritiva consume oxígeno por la descomposición bacteriana y se le denomina Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO). La DBO es afectada por la temperatura del medio, por las clases de microorganismos presentes, por la cantidad y tipo de elementos nutritivos presentes.

La DBO_5 de una muestra de agua expresa la cantidad de miligramos de oxígeno disuelto por cada litro de agua, que se utiliza conforme se consumen los desechos orgánicos por la acción de las bacterias en el agua. La demanda bioquímica de oxígeno se expresa en mg/L de oxígeno y se determina midiendo el proceso de reducción del oxígeno disuelto en la muestra de agua manteniendo la temperatura a 20°C en un periodo de 5 días. Una DBO_5 grande indica que se requiere una gran cantidad de oxígeno para descomponer la materia orgánica contenida en el agua.

El agua potable tiene una DBO_5 de 0.75 a 1.5 mg/L y se considera que el agua está contaminada si la DBO_5 es mayor de 5 mg/L . Las aguas municipales contienen entre 100 y 400 mg/L pero los desechos industriales y agrícolas

contienen niveles de DBO₅ del orden de miles de mg/L. La reducción de los niveles de DBO₅ se hace mediante tratamiento de aguas negras (Cuadro 6).

Cuadro 6. Valores típicos de Demanda Bioquímica de Oxígeno para aguas de diferente calidad.

Tipo de agua	DBO mg/L
Agua potable	0.75 a 1.5
Agua poco contaminada	5.0 a 50
Agua residual municipal	100 a 400
Residuos industriales	500 a 10 000

El análisis de la DBO₅ del agua de los canales de riego a partir del muestreo IV se hizo de acuerdo la metodología descrita en el Manual del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (Greenberg, 1998).

ANÁLISIS BIOLÓGICOS

Toma de muestras

La toma de las muestras de agua para los análisis de laboratorio se hizo de la siguiente manera: se recolectaron 1000 ml de agua en frascos esterilizados de polipropileno de boca ancha, La toma de las muestras de agua se hizo en la columna del agua tratando de tomar sedimento cuando fuera posible ya que en general los canales de riego debido a su diseño, construcción y la limpieza del agua que distribuyen casi no acumulan sedimento en sus paredes y en el fondo.

La muestra de agua fue fraccionada en condiciones asépticas en dos volúmenes de 500 ml cada uno, un volumen se utilizó para el aislamiento de *N. fowleri* en placas de cultivo de Petri, y los 500 ml restantes fueron usados para extraer el ADN total de la muestra para el análisis de identificación por PCR de *Naegleria fowleri*.

Para el conteo de bacterias presentes en el agua de los canales adicionalmente se recolectaron muestras de agua de 10 ml en tubos de polipropileno de 15 ml esterilizados y se fijaron con formol al 4% con solución amortiguadora de cacodilato. En todos los casos las muestras de agua fueron transportadas al laboratorio a temperatura ambiente.

Análisis microbiológicos

Aislamiento y cultivo de *Naegleria fowleri*.

El aislamiento de amebas del género *Naegleria* se hizo por concentración de muestras por filtración. Las muestras se procesaron según el método descrito por De Jonckheere (1977) para aislar amebas de vida libre. Se tomaron

volúmenes de agua de 100 ml con jeringas Millipore estériles y se filtraron a través de filtros de membrana de 0.22 μm (Millipore), el filtro fue colocado en posición invertida sobre placas con medio de agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (medio NNE). Las placas sembradas de esta manera se guardaron de forma invertida dentro de bolsas de plástico.

Las muestras sembradas en agar se transportaron al laboratorio de Biología Molecular de la UIICSE de la FES Iztacala y se incubaron a 45 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo las placas fueron observadas con el microscopio invertido y se separaron de cada placa de agar NNE a todos aquellos organismos amebianos de forma y tamaño diferentes. Las amebas separadas de esta forma fueron sembradas en medio NNE nuevo y siguieron incubándose a 45°C por otras 24 horas. Se seleccionan estas temperaturas de aislamiento para evitar el crecimiento de otras amebas que no fueran de importancia médica. Se ha reportado que las amebas patógenas incluyendo a *Naegleria fowleri* pueden soportar temperaturas elevadas (Cabanés *et al.*, 2001), no así las amebas que no son patógenas, las cuales dejan de crecer de los 42 °C en adelante.

Adicionalmente en el laboratorio se hizo el aislamiento de las amebas de vida libre por la concentración de las muestras por centrifugación. Las muestras fueron procesadas de acuerdo al método descrito por De Jonckheere (1977) para aislar amebas de vida libre. Volúmenes de agua de 50 ml se centrifugaron a 1500 x g durante 10 min., después de la centrifugación el sedimento se inoculó sobre placas con medio de agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (medio de cultivo NNE). Las placas de Petri con NNE sembradas de esta manera se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Transcurrido este tiempo las placas fueron observadas con el microscopio invertido (NIKON mod. Eclipse TS100) y se seleccionaron aquellas zonas en las que se presentó buen crecimiento amebiano. Se cortaron trozos de agar de aproximadamente 5 mm² donde hubiera crecimiento amebiano con organismos de un solo tipo, para separar los diferentes géneros y especies y se re-inocularon en placas de agar NNE nuevas. El proceso se repitió cuantas veces fue necesario para separar cada tipo diferente de amebas y obtener cultivos con una sola especie.

Los aislados amebianos identificados como *Naegleria fowleri* según las claves taxonómicas de Page (1988) fueron cultivados axénicamente y se les extrajo y purificó el ADN con los procedimientos referidos más adelante para las muestras de agua y se analizaron por PCR.

Prueba de tolerancia a la temperatura

Las AVL normalmente toleran temperaturas entre los 10 y 30 °C. Existe la premisa de que las amebas patógenas tienen capacidad de tolerar temperaturas elevadas, muchas especies del género *Naegleria* son termotolerantes y se desarrollan bien a temperaturas superiores a los 37 °C y algunas especies pueden desarrollarse bien a temperaturas superiores a los 45 °C. Por el

contrario, las amebas que no son patógenas solo se desarrollan a temperaturas de 37 °C o menores, esta característica es importante para poder separar las posibles amebas patógenas para el hombre (De Jonckheere, 1981, 2002; Griffin, 1972), e incluso es una herramienta importante como criterio en la determinación taxonómica de algunas especies. Para la determinación de esta característica las placas de Petri que fueron inoculadas según el procedimiento descrito anteriormente para el aislamiento de amebas, se incubaron a una temperatura de 45°C por 24 h y se hizo la transferencia de las amebas termotolerantes que sobrevivieron a placas con medio NNE nuevo. Este proceso se continuó por una semana para garantizar la recuperación de las amebas termófilas.

Prueba de transformación ameboflagelar

El término amebloflagelado es usado para describir la capacidad de las amebas para transformarse de una fase de trofozoíto, que se alimenta y reproduce a una etapa temporal de flagelación en la que no se alimenta ni se reproduce y solo se puede desplazar mediante un órgano de locomoción, en este caso *N. fowleri* tiene dos flagelos (John, 1993).

Su posible capacidad de transformación ameboflagelar fue inducida agregando agua destilada esterilizada a cultivos de amebas creciendo en forma trófica en placas de Petri, e incubadas a temperatura de 37°C. Después de 15 minutos las placas fueron observadas al microscopio invertido a intervalos de 15 minutos para buscar la aparición de formas flageladas. Cuando hubo flagelación de las amebas la prueba se consideró positiva por lo que a esos organismos se les consideró como pertenecientes a la familia Vahlkampfiidae y con la posibilidad de incluirse en el género *Naegleria*, pues se sabe que cuando *Naegleria* es colocada en medios que no le son adecuados como el agua destilada o soluciones amortiguadoras, el protozoo se transforma transitoriamente a un ameboflagelado (Cable y John, 1986).

La prueba de transformación ameboflagelar se utilizó para diferenciar a los aislados de *Naegleria* y de *Vahlkampfia*. Los trofozoítos de *Vahlkampfia* que son similares a los de *Naegleria*, presentan trofozoíto en forma limax que exhibe un seudópodo eruptivo y bifurcación frecuente, sin embargo, sólo los trofozoítos de *Naegleria* tienen la habilidad de transformarse en un flagelado (Page, 1988).

A los aislados que toleraron temperaturas de incubación de 45° C, se les determinó si tenían la capacidad de cambiar temporalmente de una forma trófica a otra ameboflagelada, cuando hubo flagelación de las amebas la prueba se consideró positiva indicando que los organismos ameboflagelados son de la familia Vahlkampfiidae a la cual pertenece el género *Naegleria*.

Axenización

Todos los organismos amebianos que presentaron una fase temporal de transformación ameboflagelar, se pasaron a un medio líquido libre de bacteria con suero fetal de bovino. La importancia de axenizar a los aislados es para asegurar que en las pruebas de patogenicidad con ratones y en las pruebas de biología molecular, se tenga a la ameba sin bacteria que pudiera producir errores en los resultados. Los trofozoítos se transfirieron a tubos de cultivo con medio líquido y se incubaron a 45 °C, manteniendo los tubos inclinados y sin agitación con el fin de que las amebas puedan adherirse a la superficie del tubo (De Jonckheere, 1977).

Los medios líquidos que se utilizaron para axenizar fueron: medio PBSGM (Phosphate:Bactocasitone:Serum:Glucose Medium) conocido también como medio Chang, Bactocasitona al 2% y medio PYNFH, (Phosphate: Yeast: Nucleic acid: Folic: Hemin), para evitar contaminación bacteriana, se agregó penicilina sódica, estreptomycin y kanamicina en concentraciones de 200 µg/ml cada una, las amebas del género *Naegleria* no son afectadas por los antibióticos.

Al transferir trofozoítos del medio NNE al medio de Chang se buscó eliminar a la bacteria *E. aerogenes* como fuente de alimento para las amebas y hacer que éstas se alimentaran de los nutrimentos del medio de cultivo de Chang, obteniendo de esta manera un cultivo axénico, es decir con una sola especie creciendo en el medio a partir de uno monoxénico (dos especies o más compartiendo el cultivo bacteria-ameba).

La importancia de axenizar a los aislados fue para asegurar la obtención de cultivos amebianos puros sin bacteria y así evitar que pudieran producirse errores en los resultados de las pruebas patogenicidad.

Prueba de patogenicidad en ratones

La patogenicidad de los aislados amebianos es una prueba inmediata a la axenización de las amebas para evitar la disminución de la virulencia de las amebas, y sirve para probar si una ameba tiene la capacidad de provocar infección en animales de laboratorio, con el fin de hacer inferencias de su posible patogenicidad en los seres humanos (Yun, 2002). La prueba se hace de dos maneras: por inoculación intracerebral (IC) y por instilación nasal (IN).

La propagación intracerebral se hizo inoculando a partir de un subcultivo de amebas de aproximadamente 10^6 células con una jeringa insulínica un volumen de 25 µl de muestra aplicado directamente a la masa cefálica en un lote de 5 ratones cepa CD-1 de 2 a 6 semanas de edad por cada cepa de ameba (Rivera, 1990). Paralelamente se inocularon sólo con medio de cultivo sin amebas un lote de 5 ratones, que sirvieron de grupo control. Los ratones inoculados de las dos maneras se revisaron diariamente para observar cambios en el comportamiento

y sobre todo el período y el número en que murieron si la cepa fue patógena. Si después de 21 días algunos o todos los ratones inoculados con amebas sobrevivieron, se sacrificaron y sus órganos (cerebro, hígado, pulmón y riñones) fueron sembrados en placas de NNE y se incubaron para aislar las amebas y determinar la vía de diseminación de la infección amebiana.

Para la inoculación por instilación nasal, se utilizó la misma dosis en una jeringa de insulina a través de los orificios nasales del ratón. Ambas pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en grupos de cinco ratones machos de la cepa CD-1, de tres semanas de edad. Los ratones inoculados de las dos maneras se vigilaron diariamente para determinar la mortalidad de los mismos. Los ratones inoculados con amebas que sobrevivieron 21 días, fueron sacrificados y diseccionados para sembrar segmentos de cerebro, hígado, pulmones y riñones en placas con medio NNE, que se mantuvieron a 45 °C por 24 h. A los ratones muertos antes de los 21 días también se les extrajeron los órganos y se sembraron de la misma manera.

Una ameba se considera patógena cuando la mortalidad de ratones alcanza el 60% por cualquiera de las dos vías, aunque se reconoce con mayor validez a la prueba por instilación nasal, por ser la forma más común de invasión de parte de estos organismos y por el daño que se puede causar al inocular los ratones intracerebralmente.

ANÁLISIS MOLECULARES

Concentración de células por filtración

Para aislar ADN genómico a partir de las células de las amebas de vida libre recolectadas del agua de los canales de riego de Mexicali se tomaron 500 ml de agua recolectada y fueron bombeadas asépticamente a través de filtros Sterivex GS (Millipore Corp. Bedford, Mass.) de 0.22 μm y el retentado dentro del cartucho se lavó con solución amortiguadora SET (Sacarosa 20%, EDTA 50mM y Tris-HCl 50 mM [pH 7.6]) los cartuchos fueron sellados y transportados a baja temperatura al laboratorio e inmediatamente congelados a -20°C hasta ser procesados.

Extracción y purificación del ADN genómico de *Naegleria fowleri*

Los filtros fueron descongelados y se les agregó 1.8 ml de amortiguador SET por la entrada de la unidad del filtro con la ayuda de una jeringa esterilizada. Después se adicionaron 62 μl de una solución de lizozima y amortiguador (5 mg/ml en Tris-HCl 10 mM [pH 8], EDTA 1 mM y NaCl 10 mM). El contenido fue mezclado por inversión y el cartucho se puso en hielo por 15 minutos. Se agregaron 16 μl de una solución stock al 25% de dodecil sulfato de sodio (SDS) y la unidad de filtro se incubó a temperatura ambiente con agitación suave y constante para mantener toda la muestra dentro del filtro en contacto con los

reactivos. Después de 1 hora se agregó solución de proteinasa K (20 mg/ml en agua bidestilada) y se dejó mezclando suavemente en un agitador mecánico a temperatura ambiente por 3-4 horas. Para retirar los lisados crudos del tubo Sterivex con una jeringa se extrae el contenido del filtro. Se agrega 1 ml de amortiguador SET para lavar el filtro y se toma este para unirlo con la primera extracción.

Con el fin de minimizar el tiempo de extracción y purificación de ADN para llevarlo a PCR al lisado obtenido se le extrajo directamente el ADN genómico utilizando el sistema de purificación comercial Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, Madison WI), siguiendo el procedimiento del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se ensayaron tres pares de primers (iniciadores) descritos para amplificar e identificar genes específicos para *Naegleria fowleri* (Cuadro 7). Uno flanqueando una región de 301 pb descrito por McLaughlin (1991), el otro una región de 678 pb reportado por Hu y colaboradores (1991, 1992) y el tercer par un segmento de 1.5 kpb por Kilvington (1995).

Cuadro 7. Descripción de los primers utilizados y productos de amplificación obtenidos en este estudio.

Autor	Secuencia de los primers utilizados 5' a 3'	Tamaño esperado (pb) del producto de la PCR
Mc Laughlin (1991)		
MCLF forward 60-79	CGTATCTAGTAGATAGAACA	301
MCLR reverse 341-360	CGTAACGACACAAACCTACAGA	
Hu (1992)		
HVF forward 243-259	GCCCAAACACTACTGCATC	678
HVR reverse 904-920	TCCAAAGACTCAACAAC	
Kilvington (1995)		
PSF forward	GCTATCGAATGGATTCAAGC	1500
P3R reverse	CACTACTCGTGGAAGGCTTA	

Al seleccionar los primers para la detección de genes específicos para *Naegleria fowleri* por PCR los autores demostraron la especificidad de estos iniciadores al probarlos en diferentes amebas del género *Naegleria*, otras amebas de vida libre y en diversos protozoos relacionados y solo se obtuvo amplificación del ADN de las cepas de *Naegleria fowleri*.

Para la prueba de PCR, a cada microtubo se le agregó 53.5 µl de agua destilada, 10 µl de buffer PCR, 16 µl de mezcla de los cuatro desoxiribonucleótidos (dntp's), 0.5 µl de Amp Taq, 5 µl de cada uno de los iniciadores (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 10 µl de ADN de la muestra o de la cepa

de referencia. El volumen total en el tubo de reacción fue en todos los casos de 100 μ l.

Los parámetros que se utilizaron para las amplificaciones por PCR utilizando los primers PSF y P3R se tomaron de los trabajos del Dr. Kilvington con las adecuaciones que hicimos en dos estancias en su laboratorio en el Public Health Laboratory, Royal United Hospital en Bath, Gran Bretaña. Para los iniciadores MCLF-MCLR y HVF-HVR la metodología fue adaptada de a partir de la descrita por sus autores.

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Perkin Elmer (GeneAmp PCR System 2400) y con el paquete de reactivos (GeneAmp PCR Reagent Kit) con la enzima polimerasa (Ampli Taq DNA polymerase) programando el aparato de acuerdo con el con el protocolo del cuadro 8.

Cuadro 8. Programa de temperaturas utilizado para la prueba de PCR para cada par de primers utilizados en el experimento.

Protocolo (Autor)	Desnaturalización	Alineación	Extensión	Extensión final	ciclos
McLaughlin	94°C/1 min	47°C/1 min	72°C/3 min	72°C/3 min	26
Hu	99°C/5 min	95°C/30 seg	55°C/1 min	72°C/1 min	30
Kilvington	95°C/1 min	55°C/1 min	72°C/1.5 min	72°C/7 min	35

Electroforesis del ADN amplificado en geles de agarosa.

Se preparó agarosa al 2.0 % con amortiguador TBE (Tris Borato EDTA) a concentración de 0.5X y se disolvió por ebullición, se dejó enfriar a 56°C y se le agregó una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/ml). La agarosa se vació en un molde para gel y el peine formador de pozos adecuado y se dejó madurar por 30 min. Cuando el gel se gelificó se retiraron el peine y las cintas, se colocó en la cámara de electroforesis y se cubrió con amortiguador TBE 0.5X hasta que el gel quedó sumergido aproximadamente a 3 mm bajo el amortiguador. Después en los pozos de cada extremo se pusieron 2 μ l de marcador molecular con 2 μ l de una solución de carga "gel loading", y en los siguientes pozos se pusieron 17 μ l de ADN amplificado por PCR con 2 μ l de gel loading. Se conectó la cámara submarina a la fuente de poder por 4.0 horas con un voltaje de 60 voltios, con un corrimiento aproximado de 4 voltios/cm². Terminada de correr la electroforesis se observó el gel en un transiluminador con luz ultravioleta a 305 nm y se obtuvo el registro fotográfico con película instantánea Polaroid 665 en un sistema Polaroid MP-4, con filtros naranja Wratten 23 A (Kodak) entre el gel y la cámara y un filtro Wratten 2A UV (Kodak) entre la fuente de luz y el filtro 23A. El tiempo de exposición fue de 30 segundos con una apertura del lente de f 4.5. La película se reveló de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Consideraciones sobre la metodología empleada

Los criterios de selección y origen de los iniciadores (primers) utilizados en este proyecto de investigación están basados en los datos de la secuencia de nucleótidos reportados en EMBL, Gene Bank y la Base de Datos de Secuencias de Nucleótidos DDBJ. Utilizando amplímeros de ADN repetitivo se reproduce una banda para la especie *Naegleria*. Los iniciadores seleccionados fueron escogidos sobre la base de no-homología con otras secuencias de eucariontes de acuerdo a una secuencia de alineación múltiple el iniciador “reverse” se escogió de una región conservada entre otros protozoos y especies de hongos con el objeto de maximizar la probabilidad de que pudiera hibridar a todas las especies de ADN de *Naegleria*.

Las condiciones son únicas para cada una de las pruebas a desarrollar, y se incluyen aquellas de carácter extremo que se piensan realizar, de esta manera las condiciones de la reacción son como sigue:

La temperatura apropiada para la alineación de los iniciadores depende de la composición, longitud y concentración de los iniciadores de la amplificación. La temperatura de alineación ideal generalmente es de 5 °C abajo del T_m real de los iniciadores. Las temperaturas de alineación en el ámbito de 55 a 72 °C generalmente producen los mejores resultados. Las condiciones extremas de temperatura especialmente durante los primeros ciclos, ayudan a incrementar la especificidad.

Considerando el número de ciclos en la metodología de PCR (30-35) y en la optimización de la misma es probable obtener aproximadamente 10⁶ copias de ADN al final del análisis. Demasiados ciclos podrían incrementar la cantidad y complejidad de los productos no específicos que se encuentren presentes en la muestra, especialmente si consideramos que habrá organismos diferentes en muestras tomadas del ambiente. Asimismo, pocos ciclos producirán muy poco ADN para ser analizado. Teóricamente 20 ciclos podrían producir un millón de copias de una secuencia blanco ($2^{20} = 10^6$), pero debido a que la eficiencia en la reacción no es perfecta, generalmente se usan 30-40 ciclos, los cuales deberán producir más de 1 millón de veces la concentración de la secuencia original de ADN.

Con respecto a la especificidad de la prueba se ha mencionado que los iniciadores a ser utilizados son altamente específicos para los protozoos del género *Naegleria*, sin embargo, será posible mejorar la especificidad cuando al menos un reactivo crítico, por ejemplo la Taq DNA polimerasa sea omitida hasta después que la reacción es calentada a 94-95 °C. Este método “hot start” se basa en el hecho de que la iniciación no-específica y la producción subsiguiente de bandas de ADN amplificado no deseado son generalmente producidas por la retención de considerable actividad enzimática a temperaturas por abajo del óptimo para la síntesis del ADN. Manualmente agregamos los reactivos

esenciales como por ejemplo la ADN polimerasa al tubo de reacción a temperaturas elevadas. Este método mejora la especificidad y minimiza la formación de dímeros-primers que se desperdician.

La posible inhibición de la reacción de PCR al trabajar en el laboratorio es real, una gran variedad de componentes dentro de los especímenes clínicos pueden inhibir los sistemas de detección al interactuar con los componentes de la reacción enzimática. Sin embargo, escogimos metodologías con ligeras variaciones para asegurar que no tuviéramos interferencias graves ni procesos de inhibición de la reacción. Además se compararon el procedimiento estándar de extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamilo y precipitación con etanol con los kits comerciales de PROMEGA para extracción y purificación de ADN genómico.

CONTROL DE CALIDAD.

Controles negativos

En todas las pruebas se utilizaron blancos de agua (ultra pura Sigma) como muestra. Probamos también controles clínicos negativos en cada corrida adicionalmente al PCR del amortiguador blanco. Todos los blancos de agua utilizados en la preparación de la muestra son probados en secuencia con los especímenes clínicos.

Controles amebianos

Para verificar que solo se amplificaran ADN específico para *N. fowleri*, se probaron por PCR muestras de ADN obtenidas a partir de cultivos de cepas del American Type Culture Collection (ATCC) y del catálogo de cepas del Laboratorio de Biología Molecular de la UIICSE (Cuadro 9).

Cuadro 9. Cepas del American Type Culture Collection (ATCC) y del catálogo de cepas del Laboratorio de Biología Molecular de la UIICSE

Cepa amebiana	Clave
<i>Naegleria australiensis</i>	PP 397
<i>Naegleria gruberi</i>	1-E
<i>Naegleria fowleri</i>	KUL30808
<i>Naegleria itálica</i>	Italica
<i>Naegleria lovaniensis</i>	N. lov.

Otros protozoos y bacterias

Sabemos también que en los sistemas que van a muestrear concurren una gran variedad de microorganismos que van desde bacterias, protozoos hasta otros grandes invertebrados, tomando esto en cuenta, se incluyen en la prueba de PCR análisis de otros organismos para demostrar que estos no interfieren con

los resultados finales, dentro de esos organismos se probaron: *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* que son en nuestros cultivos monoxénicos la fuente de carbono de algunas de las amebas que cultivamos además de los organismos mencionados en el segmento de material biológico de referencia. Asimismo, se procesaron 12 cepas de *Acanthamoeba* de diferentes géneros (datos no mostrados) las cuales no produjeron ningún tipo de amplificación en análisis de PCR con los primers utilizados en este experimento.

Análisis bacteriológico cuenta de coliformes y bacterias totales

Las AVL juegan un papel importante en los ecosistemas como depredadores de bacterias. Consecuentemente la dinámica de sus poblaciones está relacionada entre sí, esto supone una relación muy importante para la estabilidad y productividad de comunidades biológicas, puesto que más importante que su abundancia es el índice de producción de nutrientes. Rodríguez (1994) y De Jonckheere (1991), sugieren una posible relación entre la disponibilidad de bacterias como fuente de alimento y la presencia de AVL dentro de la columna de agua.

Análisis de coliformes totales en muestras de agua.

Se determinó el número de coliformes totales para establecer si existe relación entre la presencia de amebas de vida libre y la densidad de bacterias coliformes en el agua. Esta prueba se realizó con muestreadores Coli-Count MILLIPORE (Bedford, Ma).

Se tomó una muestra de agua de los canales de riego del valle de Mexicali con la botella muestreadora llevándola hasta un volumen de 18 ml, se insertó la paleta del muestreador dentro de la botella y se sumergió durante 30 segundos. Posteriormente se desechó el líquido y la paleta fue insertada nuevamente en la botella la cual se selló para evitar contaminación. Los muestreadores fueron llevados al laboratorio y se incubaron a 35 °C durante 24 horas.

El crecimiento de las colonias en la superficie del filtro de la paleta fueron contadas como organismos individuales. Para el análisis de muestras de coliformes totales se tomaron en cuenta solo las colonias azules, el resultado de su conteo fue multiplicado por 100 y de esta manera el número de coliformes totales fueron reportados como unidades formadoras de colonias (UFC) por cada 100 ml de muestra.

Conteo de bacterias totales en el agua

Para correlacionar la presencia de *N. fowleri* con la cantidad de bacterias presentes en el agua se hizo el conteo de bacterias totales en los canales de agua de Mexicali. Para ello se transportaron al laboratorio muestras de 10 ml de agua fijadas con formol amortiguado y el laboratorio de bacteriología de la ENEP

Iztacala procesó las muestras con la técnica de DAPI. Este estudio se justificó porque se ha reportado (DeNapoli, 1996) que existe una relación estrecha entre la cantidad de bacterias en el agua y la presencia de *N. fowleri*.

Conteo directo de bacterias con tinción de DAPI

El número total de bacterias se cuantificó como número directo usando tinción con DAPI (4',6-diamidino-2 fenilindol) (Sigma Chemical Co, USA) de acuerdo al método de Porter y Feig (1980). La muestra se fijó con formalina (hasta una concentración final de 2%) y se transportaron al laboratorio para ser analizadas. Las bacterias se concentraron por filtración de 0.5 a 1 ml de la muestra en membranas de policarbonato de 0.2 μm de poro (Poretics, Alemania), teñidas a negro con negro de Irgalan o negro de Chlorazol usando para su conteo un microscopio de epifluorescencia (Carl Zeiss, Alemania), juego de filtros de excitación de UV (DAPI), usando el objetivo de inmersión 100x (Carl Zeiss, Alemania). Por mililitro de muestra se agregó 50 μl de DAPI y se dejó de 3 a 5 minutos (en el filtro) antes de filtrar la muestra.

Cálculo de la concentración de bacterias presentes:

$$N = C \frac{(B)(d)}{V(ml)} = \text{Cél ml}$$

Donde:

N= Número de bacterias

C = Constante

B = Promedio de bacterias contadas

V = Volumen de muestra filtrada

d = dilución

La constante es un valor calculado del microscopio considerando la superficie de la cuadrícula en donde se cuentan las bacterias, datos del microscopio ($10 \times 1.25 \times 100$) y la apertura del filtro utilizado para concentrar la muestra. La constante utilizada en la fórmula de cálculo de la concentración, va a depender de el área (cuadros) en que se contaron las bacterias, La cuadrícula consta de 36 cuadros por lo que si se contaron en 1 cuadro la constante tendría un valor de 5.515×10^5 , en 6 cuadros es 9.12×10^4 y la cuadrícula completa (36 cuadros) es de 1.532×10^{41} .

La dilución es útil en muestras con altas concentraciones de bacterias. En las muestras de Mexicali no fue necesario hacer tal dilución y por ello de estas muestras solo se filtraron alícuotas de 0.5 a 1 ml.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diversidad amebiana

Durante este trabajo de investigación que comprendió nueve muestreos para recolectar agua de los canales de riego de 14 cuerpos de agua dedicados al riego en el valle de Mexicali, se aislaron en placas de agar no nutritivo con *E. coli* un total de 255 aislados amebianos pertenecientes a 14 géneros incluyendo a cinco organismos amebianos de vida libre quienes no pudieron ser asignadas taxonómicamente en ningún género conocido.

Se identificaron amebas pertenecientes a los géneros *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp., *Vahlkampfia* spp., *Hartmannella* sp., *Rosculus* sp., *Willaertia* sp. y *Thecamoeba* sp. entre los más abundantes (Figura 13). El hallazgo de estos organismos en el agua es común y en muchos casos se encuentran asociados a la presencia de poblaciones de *Naegleria* (Rivera, 1989). El desarrollo de diversos géneros además de *Naegleria* en las placas de NNE era esperado ya que el medio de cultivo es adecuado para el crecimiento de diferentes especies de amebas de vida libre al ser sembradas en el laboratorio.

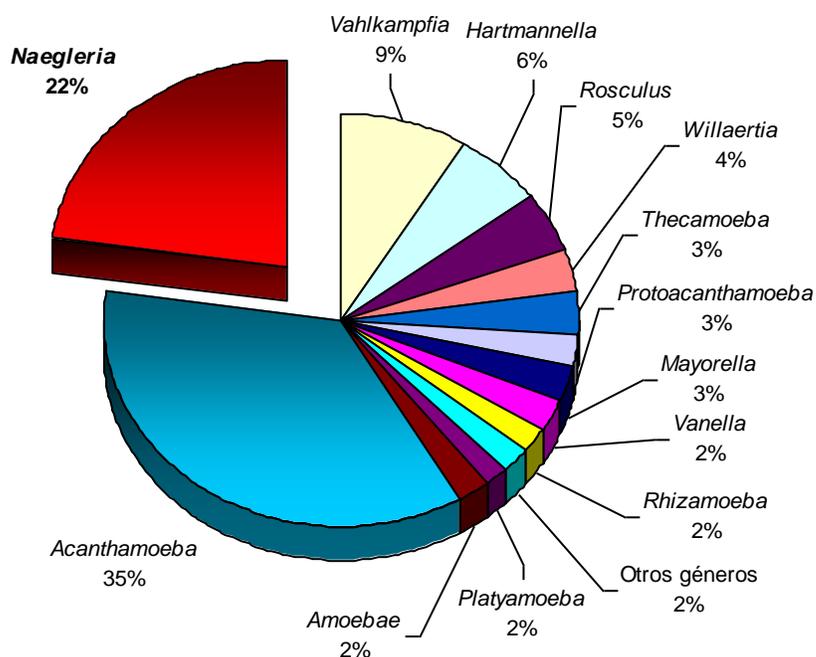


Figura 13. Géneros amebianos aislados en nueve muestreos a partir del agua de riego de los canales ubicados en el valle de Mexicali, B. C.

Sin embargo, al incubar las placas a una temperatura de 45 °C se eliminaron aquellos organismos que no fueron termotolerantes, aunque amebas de las especies, *N. lovaniensis*, *Hartmannella* sp., *Acanthamoeba* spp. y *Willaertia magna* además de *Naegleria fowleri* pueden tolerar temperaturas de hasta 45°C.

En la figura 13 se destaca que el mayor porcentaje de los aislados correspondió a los géneros, *Acanthamoeba* con el 35% y *Naegleria* con el 22% se debe resaltar aquí que la mayoría de las especies de amebas patógenas reportadas en la literatura se encuentran incluidas en estos dos géneros.

Amebas del género *Naegleria*

Se obtuvieron 58 aislados de protozoos ameboflagelados, termotolerantes a 45°C identificados por morfometría con las claves de Page (1988) como *Naegleria* spp. El cuadro 9 muestra en detalle algunas características de los 58 aislados amebianos reportados en este trabajo como organismos pertenecientes al género *Naegleria*, en la misma tabla también se observa la prueba de patogenicidad que se hizo al inocular intracerebralmente (IC) e intranasalmente (IN) alícuotas de *Naegleria* en forma trófica en ratones de experimentación para determinar la patogenicidad y virulencia de las amebas.

Trofozoíto

A partir de cultivos recientes se observó la forma trófica de las naeglerias encontrándose en todas ellas características comunes como son el desplazamiento rápido en todas las especies de *Naegleria* por la formación de lobópodos eruptivos hialinos (Figura 14), por ello el tamaño del trofozoíto fue variable entre 15-28 μm (Cuadro 10). La avidez de las amebas en el consumo de bacteria fue notable especialmente en temperaturas mayores de 37 °C y no se observó preferencia por *Escherichia coli* o por *Enterobacter aerogenes* como fuente de carbono en las placas de NNE.



Figura 14. Vista de un trofozoíto de *N. fowleri*. se observa la forma limax de la ameba, el pseudópodo (P) de avance. Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40x.

Quiste

Para los todos los aislados el diámetro del quiste se ubicó en el intervalo de 8.4 a 22.9 μm con una media de 15.6 μm (Figura 15). Estas diferencias en el diámetro del quiste se dieron por la presencia de otras especies de naeglerias distintas de *N. fowleri*, como *N. gruberi*, *N. australiensis* y *N. italica* en los diferentes lugares de muestreo, sin embargo, la mayoría de los aislados tuvieron un diámetro de quiste de 10.7 a 11.8 μm (Cuadro 10) lo que las ubica dentro de las medidas promedio estimadas para *N. fowleri* (Robinson, 1992).

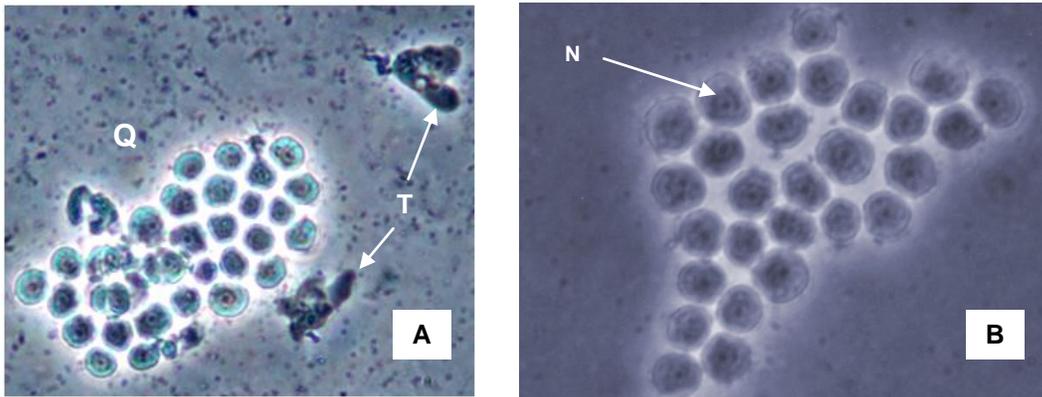


Figura 15. Vista de varios quistes de *N. fowleri* en A se observan trofozoítos en forma limax con unseudópodo de avance. En B se muestran quistes formando un racimo donde aparece el núcleo (N) bordeado por los gránulos perinucleares acomodados en forma de anillo. Microfotografía tomada en contraste de fases 40x.

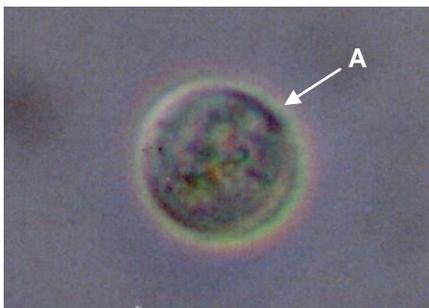


Figura 16. Quiste juvenil de *N. fowleri*, se muestra en detalle la forma redonda perfecta de su estructura y un ameboporo (A) sobre su superficie.

Con respecto a la presencia de poros en el quiste, lo cual sirve como criterio para la identificación taxonómica de *Naegleria* por microscopía en contraste de fases a 100x fue visible la presencia de poros sobre la superficie quística de todos los aislados (Figura 16), siendo esos poros más conspicuos en quistes vacíos que en quistes maduros o prequistes.

Las mediciones de los aislamientos permitieron identificar los diferentes organismos tanto en su fase de trofozoito como de quiste. La media mínima promedio de la longitud y anchura de la fase del trofozoito para los aislados de *Naegleria fowleri* es de 5.0 μm y 9.87 μm respectivamente. Sin embargo, la media máxima de estas medidas corresponde para el aislado *Naegleria* spp. con una estimación de 6.98 μm y 14.62 μm respectivamente. El tamaño promedio de los quistes igualmente muestra diferencias, la media mínima corresponde al aislado de *Naegleria gruberi* con 7.46 μm , la máxima promedio es de 9.87 μm para *N. fowleri*.

Cuadro 10. Promedio de medidas por microscopía de las amebas del género *Naegleria* aisladas a partir del agua de los canales de riego de Mexicali, B. C.

	I	X	DS	M	n
<i>Naegleria</i> sp.					
Trofozoito largo	7.05-16.45	11.94	2.36	14.1	50
Trofozoito ancho	3.05-11.75	6.98	2.25	7.05	50
Quiste	7.05-11.75	9.87	1.25	9.40	50
<i>Naegleria gruberi</i>					
Trofozoito largo	9.56-23.9	14.62	3.3	11.95	50
Trofozoito ancho	2.39-9.56	5.78	1.69	4.78	50
Quiste	4.78-11.95	7.46	2.40	7.67	50
<i>Naegleria fowleri</i>					
Trofozoito largo	7.05-14.1	9.87	1.84	9.4	50
Trofozoito ancho	2.35-7.05	5.0	1.12	4.7	50
Quiste	7.05-11.75	8.79	1.56	9.4	50

Intervalo (I); media (X), Desviación estándar (DS), Moda (mo), tamaño de la muestra (n). En micrómetros.

Flagelación

Todos los aislados identificados como *Naegleria* mostraron una fase temporal de transformación ameboflagelar cuando fueron expuestos a un ambiente con agua destilada. Esta característica se estimuló varias veces a lo largo del trabajo experimental al poner a las amebas en contacto con agua destilada y a temperatura de incubación de 37 °C.

Pruebas de patogenicidad de *Naegleria* en animales de laboratorio.

De 58 aislados de *Naegleria* inoculados en ratones de tres semanas de edad por las vías intranasal e intracerebral como se muestra en Cuadro 11, un total de 42 aislados amebianos produjeron la muerte de los ratones por destrucción masiva del cerebro en el lapso de cuatro a cinco días después de la inoculación con un porcentaje del 100% de muertes del lote de ratones probados, lo que demuestra su patogenicidad y virulencia en los aislados. En este punto se debe mencionar que solo dos de los 42 aislados amebianos ABA(II)b y OAX(VI) positivos para

patogenicidad en ratones lo fueron por inoculación intracerebral, ya que en la prueba por instilación nasal, no causaron la muerte al 60% de los ratones, porcentaje necesario para considerarse patógenas por esta vía, sin embargo, estos dos aislados fueron catalogados como patógenos en ratones de laboratorio dado que por inoculación IC causaron daño masivo al SNC y la muerte de los animales de experimentación.

Cuadro 11. Concentrado de los aislados termófilos del género *Naegleria* spp. obtenidos a partir del agua de los canales de riego de Mexicali, B. C. en nueve muestreos.

Aislados de <i>Naegleria</i> spp.	Flagelación	Temperatura de incubación		Patogenicidad en animales de laboratorio	
		42 °C	45 °C	IN	IC
LA2(I)	+	+	+	+	+
IRA(I)	+	+	+	+	+
ABA(I)	+	+	+	+	+
ABA(I)b	+	+	+	-	-
RPM (I)	+	+	+	-	-
IND(I)	+	+	+	+	+
XCH(I)	+	+	+	+	+
COR(I)	+	+	+	+	+
CAN(II)	+	+	+	-	-
LA2(II)b	+	+	+	+	+
LA2(II)	+	+	+	+	+
ABA(II)b	+	+	+	-	+
ABA(II)	+	+	+	+	+
IND(II)	+	+	+	+	+
IND(II)b	+	+	+	-	-
NAY(III)	+	+	+	+	+
LA1(IV)	+	+	+	+	+
LA2(IV)	+	+	+	+	+
IRA(IV)	+	+	+	+	+
OAX(IV)	+	+	+	-	-
NAY(IV)	+	+	+	+	+
ABA(IV)	+	+	+	+	+
IAB(IV)	+	+	+	+	+
COR(IV)	+	+	+	+	+
LA1(V)	+	+	+	+	+
LA2(V)	+	+	+	+	+
OAX(V)	+	+	+	+	+
RPM(V)	+	+	+	-	-
NAY(V)	+	+	+	+	+
COR(V)	+	+	+	+	+
LA1(VI)	+	+	+	+	+
RPM(VI)	+	+	+	-	-
CAN(VI)	+	+	+	-	-
OAX(VI)	+	+	+	-	+
NAY(VI)	+	+	+	-	-
COR(VI)	+	+	+	+	+
IRA(VII)	+	+	+	+	+
OAX(VII)	+	+	+	-	-
NAY(VII)	+	+	+	+	+
ABA(VII)	+	+	+	+	+

Cuadro 11. Continúa

Aislados de <i>Naegleria</i> spp.	Flagelación	Temperatura de incubación		Patogenicidad en animales de laboratorio	
		42 °C	45 °C	IN	IC
LA2(VIII)	+	+	+	+	+
LA2(VIII)b	+	+	+	-	-
RPM(VIII)	+	+	+	-	-
NAY(VIII)	+	+	+	+	+
NAY(VIII)b	+	+	+	+	+
OAX(VIII)	+	+	+	-	-
COR(VIII)	+	+	+	-	-
LA1(IX)	+	+	+	+	+
LA2(IX)	+	+	+	+	+
IRA(IX)	+	+	+	+	+
NAY(IX)	+	+	+	+	+
NAY(IX)b	+	+	+	-	-
ABA(IX)	+	+	+	+	+
IAB(IX)	+	+	+	+	+
IND(IX)	+	+	+	+	+
COR(IX)	+	+	+	+	+
COR(IX)b	+	+	+	-	-

El código de tres letras indica el canal de donde se recuperó el aislado de *Naegleria* spp.
 El número romano entre paréntesis corresponde al número de muestreo realizado.
 La letra b indica un aislado amebiano de *Naegleria* con características diferentes recuperado en el proceso de clonación a partir de las placas de NNE.

Por otra parte en el mismo cuadro 11 se puede apreciar que 16 aislados amebianos identificados como *Naegleria* spp. no causaron la muerte en los ratones por ninguna de las dos vías de inoculación, por lo que se les descartó como posibles *N. fowleri* aun cuando sus características así lo indicaban, en el cuadro 12 se muestra el resumen de las pruebas de patogenicidad y se hace notar que más del 72% de los organismos amebianos identificados como *Naegleria* fueron patógenos en animales de experimentación.

Cuadro 12. Resumen de los resultados de las pruebas de patogenicidad en ratones de laboratorio de los aislados de *Naegleria* obtenidos a partir del agua de los canales de riego

Amebas del género <i>Naegleria</i>	Número	% de aislados
Aislados patógenos	42	72.4
Aislados no patógenos	16	27.6
Total de aislados	58	

Con respecto al número de aislados patógenos obtenidos en este trabajo, se demuestra que el mayor número de organismos patógenos fueron recolectados durante el periodo que comprenden los meses de mayo a septiembre el cual

coincide con la época de mayor calor en esta parte del país. Mientras que en los muestreos que se realizaron en el período que incluyeron los meses de octubre a marzo se obtuvieron la menor cantidad de naeglerias patógenas, temporada reportada como la época más fría del año para el valle de Mexicali.

Identificación de *Naegleria fowleri* por PCR

Las especies de *Naegleria* son entre sí prácticamente indistinguibles morfológicamente una de otra, y además por serología tienen reacciones cruzadas lo que las hace muy difícil de separar a nivel de especie (McLaughlin, 1991), por ello se ha empezado a utilizar el análisis de PCR como un método altamente específico, sensible y rápido para la identificación de los organismos de la especie *Naegleria fowleri*.

Sobre esta base ensayamos tres metodologías basadas en PCR utilizadas experimentalmente para la identificación de regiones específicas del ADN genómico de *Naegleria fowleri* cambiando primordialmente la secuencia de los iniciadores que fueron nombrados HVR/HVF, MCLF/MCLR y PSF/P3R.

Iniciadores (HVR/HVF) por Hu

En el primer experimento se probaron dos iniciadores sintetizados por Hu (1992) para amplificar una región de ADN relacionada con la formación de un fragmento de actina presente en cepas altamente virulentas de *Naegleria fowleri*. En esta prueba de PCR se esperaba obtener un amplicón de 678 pb, sin embargo, en el laboratorio obtuvimos por electroforesis de los productos de amplificación dos segmentos adicionales al previsto, uno de aproximadamente 1550 pb y otro de 500 pb incluso para la cepa KUL de *N. fowleri*. Otros aislados identificados como *N. fowleri* produjeron los mismos resultados y los controles negativos fallaron para producir los mismos segmentos aunque la metodología descrita por los autores fue cuidadosamente desarrollada en el laboratorio.

Dada la cantidad de aislados a ser analizados por PCR para este par de primers y la generación de al menos tres amplicones obtenidos se decidió no integrar estos resultados al trabajo dado que la prueba no resultó específica para producir un amplificado de 678 pb a partir de una región específica de ADN de *Naegleria fowleri*.

Iniciadores (MCLF/MCLR) por McLaughlin

Los resultados del segundo experimento para amplificar por PCR un segmento del gene que codifica para la subunidad 6 de la ATPasa mitocondrial de *N. fowleri* utilizando los iniciadores reportados por McLaughlin (1991) ver Cuadro 6, produjeron señales positivas de ADN cuando fueron visualizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1%. Un producto de amplificación de 301 pb fue registrado en el gel con lo que se comprobó que el par de iniciadores

sintetizados y propuestos por McLaughlin (1991) fue específico para detectar la presencia de *N. fowleri* en una muestra. En este caso aparecieron amplicones del tamaño esperado tanto en las muestras de agua a las que se les extrajo el ADN como en las muestras de ADN extraídas de los aislados amebianos de *N. fowleri* a partir de cultivos.

No obstante los resultados positivos obtenidos, durante el estudio se observó que algunas muestras claramente identificadas como *N. fowleri* por morfometría, tolerancia a la temperatura, flagelación y pruebas positivas de patogenicidad en ratones de laboratorio, no amplificaron con los iniciadores MCLF/MCLR. Se observó también que cuando se incrementó la concentración del ADN templado de aquellas muestras negativas, en algunos casos aparecía el fragmento de aproximadamente 300 pb después de la amplificación por PCR, lo que demuestra que a pesar de la especificidad de los oligos, la sensibilidad de la prueba utilizando este tipo de iniciadores depende de la concentración de ADN templado para producir un resultado positivo.

Los datos de los análisis no se muestran aquí ya que para obtener resultados para la identificación de *N. fowleri*, utilizando los oligos MCLF/MCLR es necesario aislar y purificar ADN a partir de cultivos masivos de *Naegleria*, dado que la sensibilidad de la prueba para detectar el ADN templado es baja, esto no sería problema si la identificación del segmento específico de ADN se pretende hacer a partir de cultivos de *Naegleria*, pero el análisis no podría llevarse a cabo a partir de muestras directas de agua o biológicas como LCR, dado que en estos ambientes la cantidad de células amebianas no siempre son abundantes.

Iniciadores (PSF/P3R) por Kilvington

El ADN total extraído a partir de los organismos amebianos identificados como *Naegleria* recolectados de muestras de agua de los canales de riego de Mexicali fue analizado por PCR con un tercer par de iniciadores para detectar segmentos específicos de ADN de *Naegleria fowleri*. En este experimento se probaron los iniciadores PSF/P3R (Cuadro 6) diseñados por Kilvington (1995) para amplificar por PCR una región de ADN cromosomal de 1500 pb seleccionada al azar pero específica para *Naegleria fowleri*. Para probar su especificidad los iniciadores fueron probados con el ADN de diversos organismos incluyendo aquellos de la clase Heterolobosea (a la cual pertenece *Naegleria fowleri*), además de diversas especies de hongos y bacterias como *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* (bacterias usadas en las placas de cultivo para AVL) sin producirse ningún producto de amplificación.

Los resultados de la PCR con el ADN purificado de *Naegleria* spp. y otras AVL se muestran en las figuras 14 a 18, un producto único de 1.5-kpb fue detectado en 38 de los 58 aislados analizados. Se esperaba que 16 aislados de *Naegleria* spp. (Cuadro 9) no amplificaran el producto de 1.5-kpb dado que ellos no resultaron patógenos en pruebas con animales de laboratorio. Los aislados

LA2(II)b (Figura 15) y NAY(VIII)b (Figura 18) identificados como *Naegleria fowleri* por morfometría, tolerancia a la temperatura de 45 °C, capacidad para flagelar y patogenicidad en ratones no revelaron ninguna marca de amplificación por PCR en los geles de agarosa por lo que se les descarta como pertenecientes a la especie.

Por otra parte al probar por PCR el ADN de los aislados ABA(II)b (carril 2, Figura 15) y OAX(VI) (carril 3, Figura 17) en los geles de agarosa no se visualizaron marcas de ningún producto de amplificación en la electroforesis por lo que también estos organismos del género *Naegleria* debieron ser considerados como amebas diferentes de la especie *N. fowleri*. En este punto es importante destacar la importancia del análisis por PCR para identificar específicamente a los organismos de la especie, ya que estos cuatro aislados identificados por microscopía en contraste de fases, flagelación, termotolerancia y patogenicidad en animales de laboratorio como *N. fowleri*, por PCR se tuvo que reconsiderar su ubicación taxonómica como pertenecientes a la especie y deben ser analizados con otros criterios para ser ubicados taxonómicamente en la categoría que correspondan.

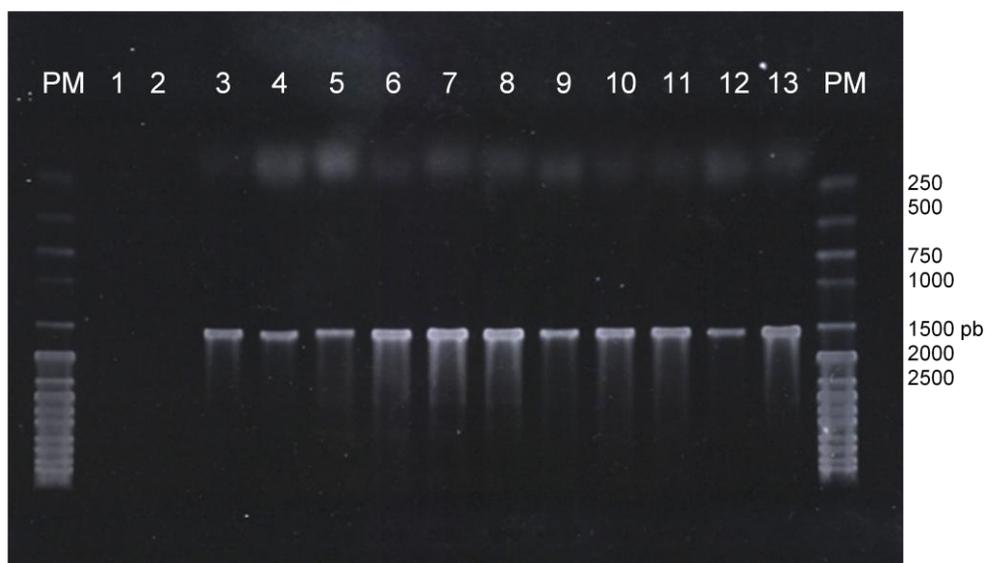


Figura 17. Secuencia de los aislados en gel de agarosa (2 %) 1 ABA(I)b, 2 CAN(II), 3 LA2(I), 4 IRA(I), 5 ABA(I), 6 IND(I), 7 XCH(I), 8 COR(I), 9 LA2(II), 10 ABA(II), 11 IND(II), 12 NAY(III) y 13 LA1(IV), PM escalera de 15 fragmentos de 250 pb cada uno para identificar el peso molecular de los productos de la amplificación por PCR.

Los iniciadores sintéticos de ADN fueron diseñados a partir de una secuencia parcial de datos que alinearon y amplificaron ADN de *N. fowleri* desde el primer análisis sin necesidad de hacer modificaciones importantes en la técnica escrita por Kilvington y Beeching (1995). Es importante destacar también, que en las figuras 17 a 21 las marcas observadas en los geles de agarosa corresponden a una alícuota de 8 μ l del producto de la amplificación por PCR y con esta cantidad se observa claramente el fragmento de 1.5-kpb en todas las muestras

analizadas, lo que demuestra que la reacción se llevó en condiciones óptimas y no se formaron subproductos adicionales al amplificado esperado.



Figura 18. Secuencia de los aislados amplificados por PCR. 1 LA2(II)b, 2 ABA(2)b, 3 IND(II)B, 4 LA2(IV), 5 IRA(IV), 6 NAY(IV), 7 OAX(IV), 8 ABA(IV), 9 IAB(IV), 10 COR(IV), 11 LA1(V), 12 LA2(V) y 13 OAX(V).

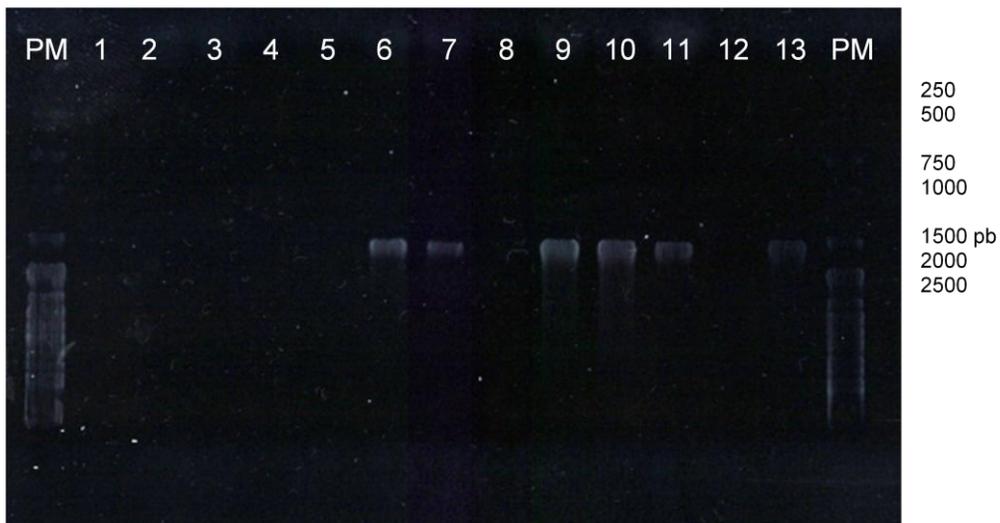


Figura 19. Secuencia de los aislados de *Naegleria* amplificados por PCR. 1 RPM(V), 2 RPM(VI), 3 OAX(VI), 4 NAY(VI), 5 OAX(VII), 6 NAY(V), 7 COR(V), 8 RPM(VIII), 9 LA1(VI), 10 COR(VI), 11 IRA(VII), 12 LA2(VIII)B y 13 NAY(VII)

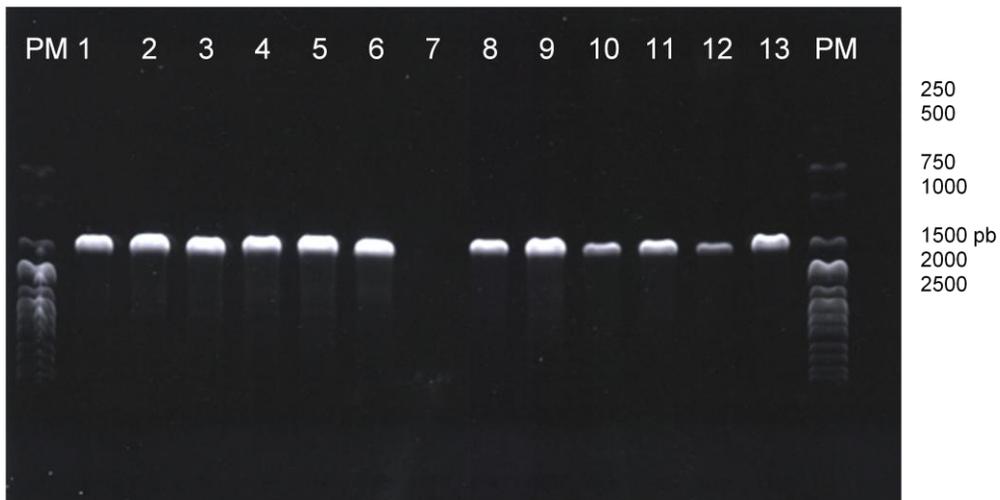


Figura 20. Secuencia de los aislados de *Naegleria* amplificados por PCR. 1 ABA(VII), 2 IND(VII), 3 LA2(VIII), 4 NAY(VIII), 5 LA1(IX), 6 LA2(IX), 7 OAX(VIII), 8 IRA(IX), 9 NAY(IX), 10 ABA(IX), 11 IAB(IX), 12 IND(IX) y 13 COR(IX).

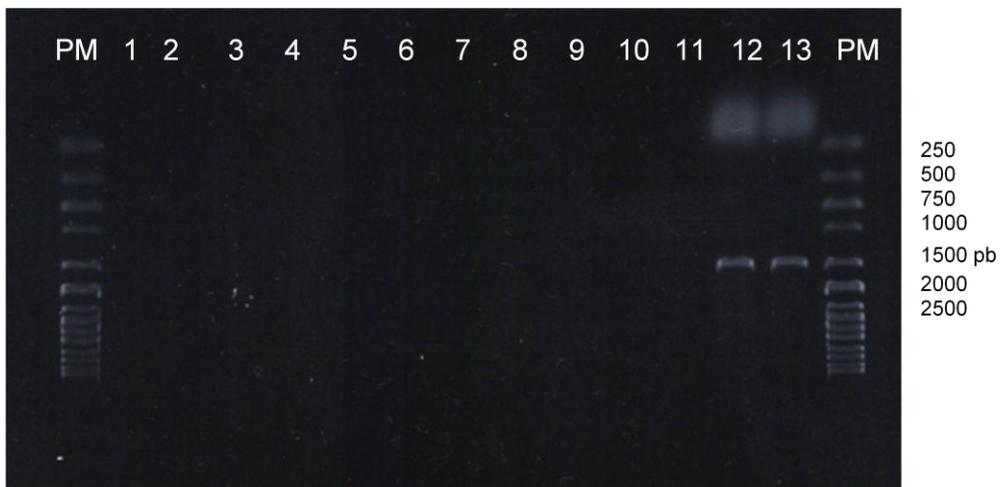


Figura 21. Secuencia de los aislados de *Naegleria* amplificados por PCR. 1 NAY(VIII)b, 2 COR(VIII), 3 NAY(IX)b, 4 COR(IX)b, 5 RPM(I), 6 CAN(VI), 7 PP-397, 8 I-E, 9 *N. lovaniensis*, 10 *N. australiensis*, 11 *A. polyphaga*, 12 KUL 30808 y 13 KUL 30808.

Las muestras de ADN en geles de agarosa de otras especies del género *Naegleria* además de *Acanthamoeba* (Figura 21) no produjeron ningún amplicón cuando fueron observados con el transiluminador de luz ultravioleta. El ADN

aislado y purificado a partir de cepas de *Naegleria fowleri* (KUL 30808) del ATCC utilizado como testigo positivo para la PCR, generó una banda única de 1.5-kpb después de 35 ciclos de amplificación con los iniciadores PSF/P3R, con lo que la prueba de PCR fue considerada lo suficientemente sensible, específica y confiable para utilizarla como una herramienta para el diagnóstico rápido de *Naegleria fowleri*, que puede ser utilizada como una prueba confirmativa para determinar la ubicación taxonómica de esta ameba, además de los análisis microbiológicos convencionales utilizados tradicionalmente en el laboratorio.

La ameba termotolerante *Naegleria fowleri* causa una rara, rápida y potencialmente fatal meningoencefalitis amebiana primaria, que puede ser adquirida por bañarse o por nadar en agua contaminada con este protozoo, por lo tanto es importante detectar a estas amebas termotolerantes en aquellos lugares en donde la gente acostumbra a nadar debido al impacto que tiene para la salud humana (Sheehan, 2003).

Las pruebas basadas en PCR para la recuperación y análisis de ADN a partir de organismos del ambiente brindan un medio de detección relativamente rápido y mejoran la identificación de microorganismos que no son fácilmente distinguidos por métodos microscópicos y de cultivo convencionales como lo es en el caso de la ameba *Naegleria fowleri*.

Distribución de *Naegleria fowleri* en el valle de Mexicali, Baja California

Con los resultados obtenidos a partir de los análisis microbiológicos y de biología molecular para identificar a las amebas del género *Naegleria* presentes en los canales de riego en el valle de Mexicali, se generó el Cuadro 13 donde se sintetiza por canal y por muestreo los aislamientos de *Naegleria* spp. y *Naegleria fowleri* obtenidos en este estudio. En el período de estudio se aislaron, cultivaron e identificaron por métodos microbiológicos convencionales un total de 58 naeglerias las cuales fueron catalogadas taxonómicamente hasta nivel de género. De estos organismos, 20 pertenecieron al menos a tres especies diferentes y representaron el 34.5% del total de aislados.

Posteriormente los 58 aislados fueron analizados por PCR como herramienta confirmativa para identificar un fragmento particularmente encontrado en *N. fowleri* de 1.5-kpb y a partir de esta prueba se identificaron a 38 *Naegleria fowleri* lo que representó un valor de presencia en porcentaje del 65.5%, significativamente alto para este organismo, considerando su impacto en la salud humana.

Cuadro 13. Aislados de *Naegleria* obtenidos a partir de muestras de agua de los canales de riego de Mexicali por muestreo y por canal de riego.

Canal	MUESTREO								
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
RPM	<i>Naegleria</i> sp.				<i>Naegleria</i> sp.	<i>Naegleria</i> sp.		<i>Naegleria</i> sp.	
CAN		<i>Naegleria</i> sp.				<i>Naegleria</i> sp.			
LA 1				<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i>			<i>N. fowleri</i>
LA 2	<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i> <i>Naegleria</i> sp.		<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i>			<i>N. fowleri</i> <i>Naegleria</i> sp.	<i>N. fowleri</i>
MCI									
MCH									
IRA	<i>N. fowleri</i>			<i>N. fowleri</i>			<i>N. fowleri</i>		<i>N. fowleri</i>
OAX				<i>Naegleria</i> sp.	<i>N. fowleri</i>	<i>Naegleria</i> sp.	<i>Naegleria</i> sp.	<i>Naegleria</i> sp.	
NAY			<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i>	<i>Naegleria</i> spp.	<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i> <i>Naegleria</i> sp.	<i>N. fowleri</i> <i>Naegleria</i> sp.
ABA	<i>N. fowleri</i> <i>N. sp.</i>	<i>N. fowleri</i> <i>Naegleria</i> sp.		<i>N. fowleri</i>			<i>N. fowleri</i>		<i>N. fowleri</i>
IAB				<i>N. fowleri</i>					<i>N. fowleri</i>
IND	<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i> <i>Naegleria</i> sp.					<i>N. fowleri</i>		<i>N. fowleri</i>
XCH	<i>N. fowleri</i>								
COR	<i>N. fowleri</i>			<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i>	<i>N. fowleri</i>		<i>Naegleria</i> sp.	<i>N. fowleri</i> <i>Naegleria</i> sp.
<i>N. fowleri</i>	6	3	1	7	5	2	4	2	8
<i>Naegleria</i> spp.	2	4	0	1	1	4	1	5	2
TOTAL	8	7	1	8	6	6	5	7	10

En la Figura 19 se muestra la proporción que representa el aislamiento de *Naegleria fowleri* con respecto al total de organismos identificados del género *Naegleria* en la misma figura se puede apreciar que a lo largo de los nueve muestreos *N. fowleri* fue el organismo predominante sobre las demás especies, sólo en los meses de octubre y de febrero, la proporción fue inversa, lo que demostró que el organismo estuvo presente en el agua de los canales durante la mayor parte del tiempo en el cual se llevó a cabo este trabajo. El aislamiento de

Naegleria fowleri de los canales de riego apoya la hipótesis de que la aspiración de estos patógenos por personas que nadaron en los canales pudieron haber sido la causa de los brotes de MEAP en Mexicali durante 1989 y 1990 motivo por el cual se realizó este trabajo.

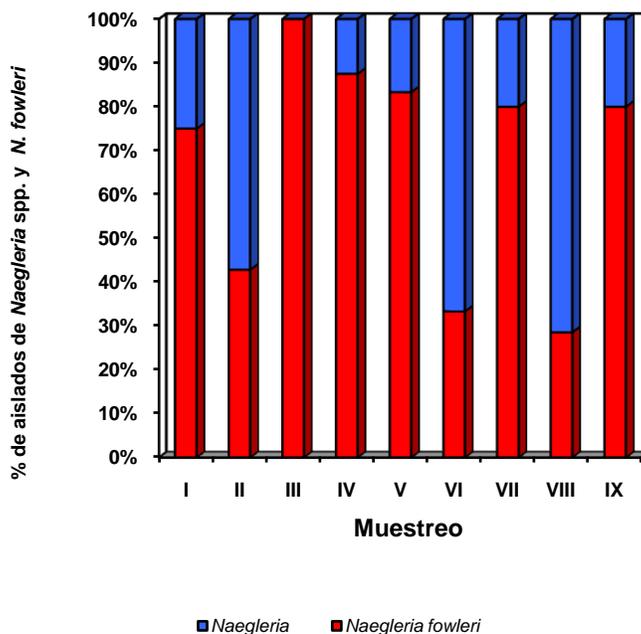


Figura 22. Porcentajes finales de las amebas *N. fowleri* del total de las amebas del género *Naegleria* recolectadas de los canales de riego en Baja California.

Para una mejor comprensión de la distribución de *Naegleria fowleri* en el valle de Mexicali, en la figura 23 se muestra el detalle de la zona de muestreo en Baja California con la ubicación de los canales y el señalamiento de la presencia de amebas del género *Naegleria* en cada uno de ellos, además se indica en el mapa los sitios donde se recuperó *Naegleria fowleri* y el muestreo en el que se obtuvo el aislado. En esa figura se muestra que de seis sitios de muestreo localizados en la zona donde entra el agua del Río Colorado proveniente de los Estados Unidos a México, dos de ellos, Ladrillera 1 y Ladrillera 2 mostraron una consistente presencia de *N. fowleri* principalmente durante los meses de mayo a octubre, coincidentemente aquellos en donde se dieron los valores de temperatura del agua y del ambiente más altos durante las etapas de muestreo. Cabe mencionar aquí que estos dos sitios se caracterizan por estar ubicados cerca de asentamientos irregulares densamente poblados donde no existen condiciones sanitarias adecuadas dadas por la falta de drenaje, agua potable y servicios básicos de infraestructura para el mantenimiento de las dos comunidades mencionadas.

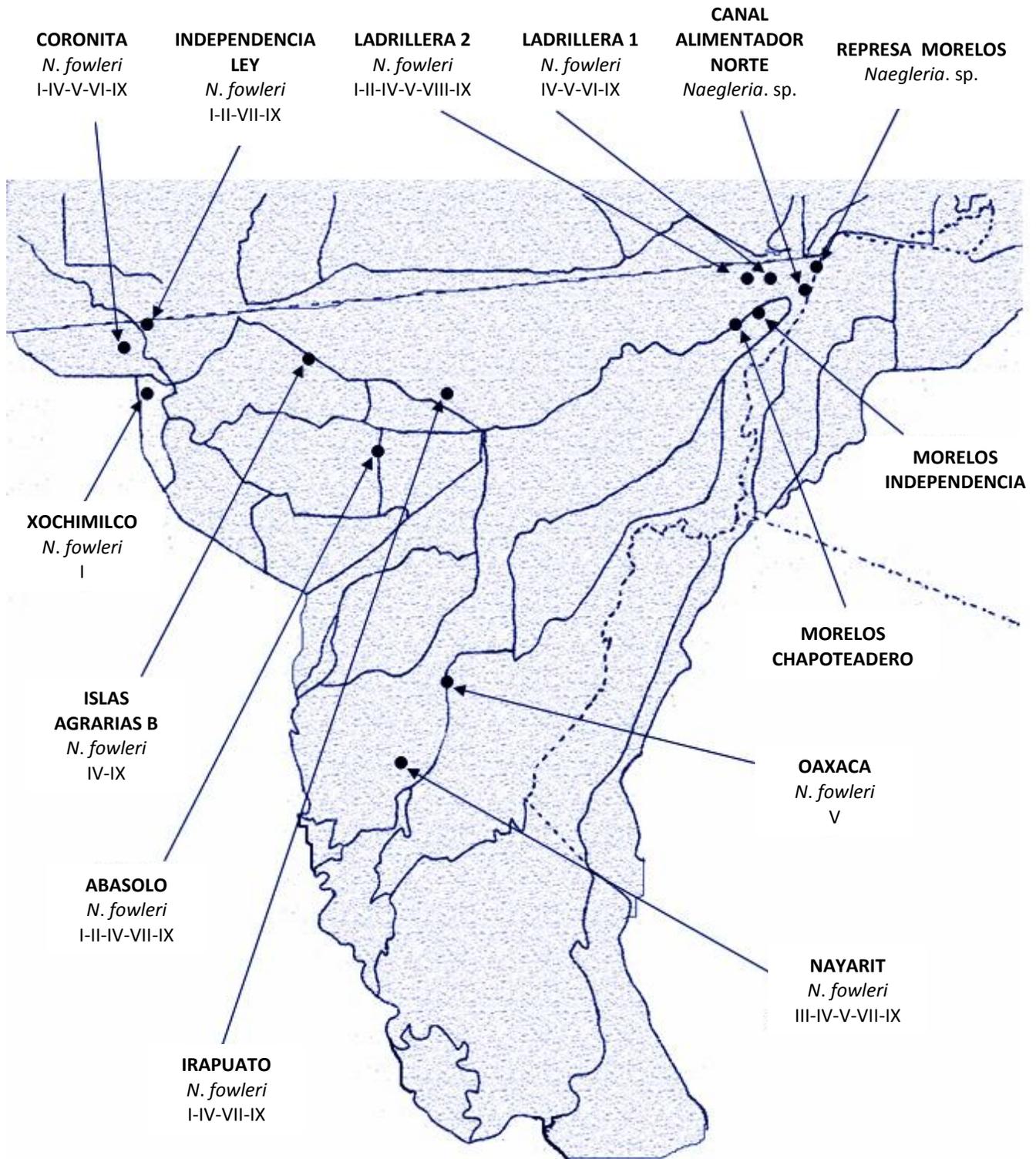


Figura 23. Mapa del valle de Mexicali donde se detallan los sitios y el número de muestreo (en números romanos) donde se describió la presencia de amebas del género *Naegleria*.

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS

Temperatura atmosférica

Con respecto a los valores medidos para la temperatura atmosférica, se señala la diferencia de 32.5 °C entre el valor más bajo de 15.3 °C encontrado en el muestreo III en el canal de riego Independencia (IND) y el más alto de 47.8 °C medido en el muestreo IX en la estación Coronita (COR) en el mes de octubre, este registro indica que existen cambios importantes de temperatura entre temporadas que pudieran incidir en el comportamiento de los organismos buscados ya que para *Naegleria fowleri*, el parámetro temperatura es importante para su establecimiento por competencia en un determinado lugar.

Cuadro 14. Registros de temperatura atmosférica medidos durante los muestreos realizados en área de ubicación de los canales de riego en Mexicali.

Canal	Temperatura ambiente (°C)								
	M I	M II	M III	M IV	M V	M VI	M VII	M VIII	M IX
RPM	32.1	38.6	19.1	39.5	35.0	30.0	ND	39.1	40.0
CAN	28.8	39.1	20.5	37.5	35.3	29.0	ND	38.8	40.1
LA1	27.2	42.1	22.7	46.5	39.7	35.5	ND	38.4	42.0
LA2	25.6	31.1	21.0	42.5	33.2	31.0	ND	37.7	42.0
MCI	ND	ND	22.7	40.0	33.2	31.5	ND	35.5	41.0
MCH	ND	ND	21.2	37.0	31.2	28.5	ND	36.8	43.7
IRA	29.1	38.6	23.0	44.5	37.2	23.0	44.0	37.0	45.1
OAX	ND	ND	27.3	43.0	34.2	27.5	41.0	33.8	38.7
NAY	ND	ND	24.6	38.5	31.2	29.0	39.0	29.5	38.1
ABA	28.3	35.6	17.2	40.5	32.1	21.0	46.0	33.8	46.7
IAB	26.8	34.8	23.0	45.0	35.4	22.0	45.0	33.4	47.1
IND	25.0	33.7	15.3	38.5	30.3	21.0	43.0	27.9	45.5
XCH	29.1	37.5	25.2	35.0	35.2	31.2	ND	45.0	37.8
COR	28.3	36.8	21.8	38.0	31.3	29.5	35.5	47.8	37.4

M= Muestreo

ND= No determinado

De manera general se observa que los datos de temperatura atmosférica del cuadro 14 se agrupan en dos grandes bloques, es decir, aquellos que tienden a mostrar temperaturas altas como en los muestreos I, IV, V, VII, VIII y IX y los correspondientes a los muestreos III y VI de febrero y marzo donde se registraron valores de temperatura muy bajos de hasta 15.3 °C lo que se considera normal para este estado de la república mexicana en la época de invierno cuando se efectuaron los muestreos.

En este punto es importante destacar que los muestreos correspondientes a los meses con las temperaturas del ambiente más altas en Mexicali, coincidieron también con el mayor número de aislados de amebas de vida libre del género *Naegleria*, de esta manera comparando los cuadros 13 y 14 se aprecia que en el muestreo IX donde se alcanzó una temperatura atmosférica máxima de 47.1 °C

y 9 sitios de muestreo más con temperaturas arriba de los 40 °C el número de amebas identificadas como *Naegleria* fue el máximo registrado en este trabajo con un total de 10 aislados, mientras que en los muestreos IV, VII y VIII el número de aislados fue de 8, 5 y 7 respectivamente. Lo que va en concordancia con trabajos anteriores en donde se menciona que en ambientes con temperaturas elevadas se favorece la presencia de amebas termófilas del género *Naegleria* (De Jonckheere, 2007; Sheehan, 2003; Vargas, 2005).

Temperatura del agua

La temperatura del agua medida “*in situ*” durante los nueve muestreos realizados, estuvo dentro de un ámbito que va desde los 12.1 °C hasta los 31.8 °C, con una diferencia de 19.7 °C entre el valor más bajo medido en el muestreo II del mes de marzo y la lectura del valor más alto tomada en el muestreo VII en el mes de septiembre (Cuadro 15). Se debe considerar que Mexicali se encuentra en una región en donde las estaciones del año no están bien marcadas, es decir no hay un gradiente de temperaturas que definan las cuatro estaciones que conocemos, mas bien solo hay dos épocas bien diferenciadas, un invierno corto muy frío y otra estación muy larga y de calor extremo.

En este caso dado que el origen del agua de los canales de riego es del Río Colorado que viene de los Estados Unidos, y el cual se forma por deshielo, la temperatura ambiental juega un papel muy importante en el comportamiento de los cuerpos de agua que se estudiaron. La intensidad de la radiación solar en cada muestreo, aunada a la poca profundidad de los canales de riego, su baja velocidad de flujo además de los vientos y la temperatura ambiental son factores que determinan la temperatura del agua. Para puntualizar en este análisis, podemos mencionar que los canales CAN, MCI y el IND son los más grandes y profundos (8-10 m de profundidad y 40 m de ancho) y en ellos se registraron los valores de temperatura del agua más bajos en los muestreos de invierno por las características mencionadas. Mientras que los demás canales, que son más angostos y los cuales tienen una profundidad que está entre los 0.70-1.5 m tuvieron temperaturas más elevadas.

En los datos que se muestran en el Cuadro 15 con respecto a la temperatura del agua para los nueve muestreos realizados en Mexicali, Baja California, se manifiesta nuevamente que el acumulado de datos se aglutina en dos conjuntos. El primero de ellos correspondiente a los meses de febrero y marzo (época de invierno) donde se incluyeron los muestreos I, III y VI con un promedio de temperatura de agua de 19.3 °C. Y para el segundo donde se concentran los muestreos II, IV, V, VII, VIII y IX el promedio de temperatura del agua de los canales de riego fue de 27°C.

Cuadro 15. Valores de la temperatura del agua registrados en puntos específicos de los canales de riego de Mexicali en los nueve muestreos realizados en este trabajo.

Canal	Temperatura del agua (°C)								
	M I	M II	M III	M IV	M V	M VI	M VII	M VIII	M IX
RPM	23.2	26.5	17.4	28.0	23.8	16.0	ND	28.1	24.1
CAN	20.6	27.1	18.1	29.2	27.2	17.2	ND	27.5	22.1
LA1	19.9	26.6	21.6	30.2	27.1	21.1	ND	27.7	24.1
LA2	18.8	25.8	19.4	29.3	21.0	18.6	ND	27.7	23.2
MCI	ND	ND	22.4	28.6	28.1	17.0	ND	26.7	24.3
MCH	ND	ND	20.9	25.8	24.8	25.0	ND	26.5	23.8
IRA	22.1	29.2	18.1	31.2	25.6	18.3	31.8	26.6	24.7
OAX	ND	ND	19.5	29.5	25.9	16.6	28.5	20.8	27.5
NAY	ND	ND	20.4	31.0	25.7	16.7	30.0	28.7	27.1
ABA	17.1	26.2	17.0	28.0	20.5	17.2	29.9	26.0	25.7
IAB	21.3	27.1	18.4	29.5	21.7	17.1	30.9	26.1	26.3
IND	18.2	28.1	12.1	27.5	20.1	17.4	30.6	25.8	23.4
XCH	25.7	27.2	19.3	29.8	23.1	17.2	ND	27.9	27.0
COR	25.3	26.3	19.3	29.3	18.7	17.7	28.0	27.1	27.4

A lo largo del periodo estudiado, se encontraron valores significativamente diferentes entre los canales muestreados, sin embargo, de manera general se puede aseverar a partir de los datos del cuadro 15 que durante la época de calor para el valle de Mexicali, el agua fue cálida, y en los meses de mayo a octubre se obtuvieron las máximas temperatura en el agua, alcanzando valores de hasta 31.8 °C valor inusual para casi cualquier sistema de agua corriente natural. La elevada radiación solar y el intenso calor en los lugares muestreados en esta región del país incidieron para alcanzar las temperaturas medidas.

Las elevadas temperaturas del agua para los muestreos IV, V, VII y IX (Cuadro 15) coincidieron con el alto número de aislamiento de *Naegleria fowleri* 7, 5, 4 y 8 microorganismos respectivamente (Cuadro 11), por lo que se puede establecer una asociación entre las altas temperaturas de agua y la presencia de *N. fowleri* en este hábitat con estas condiciones (Tyndall, 1989).

pH

Con respecto a este parámetro medido en el agua de los canales de riego, la mayoría de las mediciones a lo largo de los muestreos generaron datos de pH entre 6 y 9 (Cuadro 16) lo que indica una clara tendencia a la alcalinidad con valores máximos de 9.1 a 9.2 los cuales no se consideran extremos y que justifiquen a este factor como un condicionante para la presencia o ausencia de amebas de vida libre en los canales de agua muestreados. El ámbito estándar considerado por la USEPA (United Status Environmental Protection Agency) como el ámbito óptimo de pH para la mayoría de los organismos para en el agua es de 6.5 a 8.5, y la Norma Oficial Mexicana (NOM-001-SEMARNAT-1996) establece como ámbito permisible del potencial hidrógeno de 5 a 10 unidades.

Se ha reportado que el ámbito de pH tolerado por las amebas de vida libre “*in vitro*” oscila entre 4.6 y 9.5 (Kyle y Noblet, 1985).

De manera experimental se ha comprobado que el pH tolerado por las AVL potencialmente patógenas está entre las unidades de 4.6 a 9.5 (Carter, 1970; Kyle y Noblet, 1985; 1986), aunque se sabe que algunas especies de amebas de vida libre pueden desarrollarse bien en medios ácidos y básicos, abarcando niveles de pH que van de 4 hasta 12, lo cual sugiere una gran habilidad para colonizar nichos con una gran variedad de pH's (De Jonckheere, 1977; Tiewchaloren, 1999, 2001; Khan, 2003).

En el cuadro 16 se detallan los valores de pH obtenidos en el agua de riego de los canales muestreados, dichas mediciones produjeron valores de pH que van desde 6.5 que correspondió al canal RPM en el muestreo V, hasta 9.7 como valor máximo el cual fue medido en el canal MCI en el muestreo VIII.

Los resultados indican que los valores de pH registrados en los sitios muestreados se encuentran dentro del ámbito tolerado y reportado como adecuado para la supervivencia de las amebas de vida libre aisladas. En este punto es importante mencionar que puntualmente se midió en el canal MCI durante el octavo muestreo un valor de pH de 9.7 dato que se encuentra fuera del ámbito reportado por Kyle y Noblet, (1986), sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, de manera experimental Khan (2003) menciona que algunas especies pueden no solo tolerar sino desarrollarse bien en medios con valores de pH 12. En el canal MCI no se pudieron obtener aislados amebianos del género *Naegleria*.

Cuadro 16. Datos de pH registrados en el agua de los canales de riego en Mexicali, Baja California.

Canal	pH								
	M I	M II	M III	M IV	M V	M VI	M VII	M VIII	M IX
RPM	8.2	7.7	8.1	7.4	6.5	8.1	ND	8.9	8.8
CAN	8.0	8.0	7.8	7.8	7.3	8.2	ND	8.7	7.8
LA1	7.9	8.0	7.8	7.6	7.6	8.2	ND	8.3	8.8
LA2	7.7	8.2	7.3	8.2	8.0	8.9	ND	8.9	9.1
MCI	ND	ND	8.3	6.3	7.2	8.4	ND	9.7	8.1
MCH	ND	ND	8.3	6.0	7.1	7.7	ND	8.4	7.9
IRA	7.7	8.2	6.9	7.0	8.1	7.7	8.2	8.4	8.7
OAX	ND	ND	8.4	6.5	6.8	8.6	8.5	8.7	7.8
NAY	ND	ND	8.0	6.5	7.2	8.6	8.4	8.9	8.2
ABA	8.4	7.9	7.7	8.0	7.7	8.6	8.3	8.9	7.8
IAB	8.6	8.3	7.8	7.9	8.3	8.6	8.0	8.8	8.2
IND	7.8	8.4	8.3	8.1	7.3	8.2	8.4	8.8	7.8
XCH	7.9	7.7	8.1	6.4	6.9	8.5	ND	9.2	8.6
COR	8.8	7.9	8.2	6.4	6.8	8.4	8.2	9.2	8.8

Oxígeno disuelto

Esta variable es considerada como uno de los parámetros fisicoquímicos más críticos, ya que de ello depende la supervivencia, crecimiento y rendimiento de muchas comunidades acuáticas incluyendo los protozoos. El oxígeno disuelto (OD) en el agua puede ser afectado por cuatro factores principales: la fotosíntesis, la tasa de consumo de este gas por los procesos respiratorios de la comunidad biótica, la tasa de transferencia hacia la atmósfera en la interfase aire-agua y la temperatura. La solubilidad del oxígeno en el agua pura se presenta de la siguiente manera: la concentración de oxígeno disuelto es mayor a 0 °C y decrece al aumentar la temperatura (Arredondo y Ponce, 1998).

Es interesante resaltar que los valores de OD aunque solo reflejan un estado de disolución temporal en el agua, fueron muy altos en las aguas del valle de Mexicali considerando la alta temperatura del agua. Cantidades de hasta 18.7 mg/L de OD fueron medidos en el mes de febrero, en este caso coincidiendo con las temperaturas del ambiente y del agua más bajas encontradas durante este estudio, lo que fue normal para este muestreo en específico ya que la disolución del oxígeno en el agua guarda una relación inversamente proporcional con la temperatura, es decir a mayor temperatura menor cantidad de OD, y de manera opuesta, a menor temperatura en el agua se puede encontrar una mayor concentración de OD en la misma (Weik, 1977a).

Aquí es importante mencionar que los elevados registros de OD obtenidos del agua de los canales de riego, pudieran a primera vista contraponerse al enunciado que se describe al inicio de este apartado donde se menciona que la concentración de OD es mayor en agua fría y que su concentración en el agua disminuye conforme la temperatura del agua aumenta. En los canales de riego muestreados se esperaba contar con valores de OD muy bajos, dado que la temperatura del agua es alta, sin embargo, fue común obtener valores mayores al 10 mg/L de OD a lo largo del estudio.

Los factores que pueden explicar la presencia de elevadas concentraciones en el agua pueden ser varias, entre ellas: que el oxígeno es disuelto con más facilidad en el agua a bajas altitudes debido a la mayor presión atmosférica, la altura en el valle de Mexicali es de 20 msnm (metros sobre el nivel del mar). También en un ambiente con nutrimentos adecuados se favorece el incremento de plantas acuáticas, como es el caso de los canales de riego de Mexicali, donde las plantas del tipo de la hidrilla se han establecido en las fisuras del concreto de muchos canales, este hecho puede provocar que el agua en momentos de intensa radiación solar se sature de oxígeno debido al proceso de la fotosíntesis, aunque en la noche puedan removerlo debido a la respiración.

En este trabajo, la concentración de oxígeno disuelto medido en mg/L de OD en los cuerpos de agua varió considerablemente al contrastar los valores entre los canales muestreados, obteniéndose lecturas con el oxímetro de 3.1 mg/L de OD

como valor mínimo en el agua del canal IRA en el muestreo VIII, y de hasta 18.7 mg/L de OD como valor máximo para el canal LA2 en el Muestreo VI. Sin embargo, se debe mencionar que de manera general el comportamiento del OD en el agua estuvo con una tendencia elevada en un promedio de 8.8 a 9.9 mg/L OD (Cuadro 17), incluyendo aquellos muestreos considerados como de elevada temperatura atmosférica y del agua como en los muestreos VII, VIII y IX correspondientes a los meses de mayo, septiembre y octubre.

Cuadro 17. Valores de OD en el agua tomados “*in situ*” en los canales de riego del valle de Mexicali.

Canal	Oxígeno disuelto (mg/L)								
	M I	M II	M III	M IV	M V	M VI	M VII	M VIII	M IX
RPM	ND	ND	6.7	7.4	7.1	9.8	ND	6.4	11.1
CAN	8.0	9.8	5.9	7.6	5.8	10.0	ND	8.0	10.9
LA1	7.7	10.2	6.2	6.6	5.2	10.3	ND	5.1	5.3
LA2	ND	ND	5.6	13.8	7.8	18.7	ND	5.7	5.1
MCI	ND	ND	7.9	8.2	9.3	12.2	ND	8.0	10.7
MCH	ND	ND	11.5	6.0	7.5	6.3	ND	6.2	10.9
IRA	ND	ND	3.9	6.7	5.3	10.5	8.5	3.1	8.0
OAX	ND	ND	12.8	9.3	12.2	15.3	10.6	7.8	11.9
NAY	ND	ND	9.7	9.3	9.9	14.6	6.2	11.3	10.9
ABA	ND	ND	7.9	8.3	8.8	13.5	10.8	8.7	12.1
IAB	6.2	9.8	9.5	10.3	9.1	13.0	11.2	8.0	11.1
IND	5.6	9.5	6.4	9.0	9.2	11.3	8.9	9.7	12.5
XCH	ND	ND	9.2	6.4	7.8	11.4	ND	5.8	9.7
COR	10.0	7.9	9.6	6.7	5.2	11.5	5.4	9.0	9.1

Cloro libre residual

El cloro es un desinfectante muy efectivo cuando se utiliza en las concentraciones adecuadas para destruir la mayoría de los microorganismos peligrosos en el agua (Tiewchaloren, 1999). Durante mucho tiempo ha sido utilizado para como el único método para la desinfección activa de suministros de agua debido a su capacidad como germicida.

En el caso del agua de los canales del valle de Mexicali, dado que su uso es para riego, no se contempla la adición de cloro para desinfectar el agua. No obstante, los pobladores que viven aledaños a estos canales toman el agua y la contienen en tinacos donde la utilizan para bañarse, el aseo de las casas e incluso para beber, acciones en donde la norma oficial mexicana (NOM-127-SSA1-1994) aguas establece que ésta debería clorarse. Se ha determinado que una concentración de cloro de 0.75 mg/L es efectiva como amebicida para trofozoítos de *Naegleria fowleri* (Tiewchaloren, 1999), aunque para otra naeglerias la concentración para destruir trofozoítos o quistes puede variar (De Jonckheere, 1976).

Todos los canales fueron analizados para determinar si había alguna concentración de cloro como desinfectante del agua y como era de esperarse ninguno de ellos mostró la presencia de cloro libre residual que pudiera medirse. Por lo tanto el factor de desinfección no estuvo presente en este estudio y por lo tanto las poblaciones microbianas no fueron influidas por este agente.

Conductividad

La conductividad permite estimar la cantidad de sales disueltas en el agua. Las AVL tienen una amplia tolerancia para este parámetro (Rivera *et al.*, 1994). Valores de >3 gramos ($3000 \mu\text{S}/\text{cm}^3$) son considerados normales para un agua de tipo salina, pero puede afectar negativamente la riqueza de especies en un lugar en donde la medida media natural esté por debajo de este valor. Las aguas con concentraciones por debajo de este ámbito son clasificadas como agua dulce.

En este estudio los valores de conductividad medidos en el agua de los canales del valle de Mexicali se reportaron, como se muestra el cuadro 18 entre 920 y $1682 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ para el 85 % de los canales analizados. En esta observación se excluyeron seis datos (cinco del canal IRA y uno del MCH) que estuvieron entre 2042 y $6548 \mu\text{S}/\text{cm}^3$ y que fueron puntuales muy elevados causados por la falta de mantenimiento de los mismos.

Cuadro 18. Datos de conductividad registrados en los canales de riego del valle de Mexicali durante cinco muestreos.

Canal	Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)				
	M V	M VI	M VII	M VIII	M IX
RPM	1166	1473	ND	1605	1174
CAN	1074	1304	ND	1432	1204
LA1	1163	1318	ND	1332	1205
LA2	1320	1505	ND	1332	1291
MCI	1132	1452	ND	1715	1116
MCH	1124	920	ND	2042	1340
IRA	6043	6548	5225	5825	2084
OAX	1091	1346	1257	1632	1237
NAY	1055	1391	1095	1682	1548
ABA	1356	1504	1143	1570	1124
IAB	1291	1531	1178	1567	1232
IND	1489	1510	1094	1477	1054
XCH	1294	1539	ND	1232	1152
COR	1489	1430	1258	1326	1066

El canal IRA presentó valores de conductividad por encima de todos los registros hechos en esta investigación, este comportamiento del parámetro puede ser explicado por la falta de mantenimiento al momento de los muestreos, el canal IRA fue bloqueado por maleza, basura y gran cantidad de lodo sedimentado que

impedía que el agua corriera libremente por su estructura, manteniendo el agua casi estancada, por lo cual el cuerpo de agua estaba expuesto a la intensa radiación solar provocando con ello la evaporación de gran parte del agua aumentando la concentración de solutos que pudieran estar disueltos en esta misma, lo que generó valores muy elevados de conductividad.

De manera general los valores de conductividad del agua de los canales se mantuvieron estables en los cuatro muestreos, sin rebasar el límite de los 1600 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ con excepción del caso específico que representó el canal IRA. El canal IRA presentó valores de conductividad muy elevados que estuvieron en el ámbito de de 5225 a 6548 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, este comportamiento del parámetro en este caso específico puede ser explicado por la observación que se hizo del agua del canal de riego al momento de los muestreos, en donde, debido a la falta de mantenimiento, el canal IRA fue bloqueado por maleza, basura y gran cantidad de lodo sedimentado que impedía que el agua corriera libremente, manteniendo el agua casi estancada, por lo cual el cuerpo de agua estaba expuesto a la intensa radiación solar provocando con ello la evaporación de gran parte del agua aumentando la concentración de solutos que pudieran estar disueltos en esta misma, lo que generó valores muy elevados de conductividad. De manera general los valores de conductividad del agua de los canales se mantuvieron estables en los cuatro muestreos, sin rebasar el límite de los 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ con excepción del caso específico que representó el canal IRA.

Por otra parte el aislamiento de *Naegleria fowleri* en cuatro muestreos a partir del agua del canal IRA (Cuadro 13) así como de otros canales con valores de conductividad menores, demuestra el ámbito de tolerancia del protozoo, resistencia que puede deberse al quiste y la capacidad de los trofozoítos de tolerar cambios de salinidad, presión osmótica (Rodríguez-Zaragoza, 1996). En un estudio anterior, Gallegos *et al.*, (1999) lograron aislar amebas de vida libre en aguas con un ámbito de alcalinidad de 319 a 560 mg/L en aguas subterráneas del valle del Mezquital en Hidalgo; por lo que se considera que este factor no es limitante en la presencia o ausencia de las AVL. La Ley de Derechos en Materia de Agua (2001) en su artículo 278-B para uso de riego agrícola no contempla un criterio de calidad de agua para este parámetro, sin embargo, valores de referencia permisibles internacionales indican conductividades de 50 a 1500 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ para agua potable y la mayoría de los canales de agua estudiados se ajustan a este ámbito.

ANÁLISIS BACTERIOLÓGICO

En la literatura se ha reportado que la presencia de grandes cantidades de materia orgánica y densidades altas de bacterias favorecen la presencia de amebas de vida libre patógenas (Dingley, 1996). Se contaron las bacterias totales para establecer si la densidad bacteriana podría relacionarse o con la presencia o ausencia de *N. fowleri*.

Bacterias totales

Las amebas de vida libre son depredadoras de una amplia variedad de microorganismos, aunque su preferencia es mayor por las bacterias gram-negativas y en menor cantidad de gram-positivas, así como de levaduras y algas (Marciano–Cabral, 1987). Ciertos estudios de nutrición amebiana señalan que las amebas pueden provocar una disminución en la población de bacterias de 10^5 a 10^8 por gramo de suelo (Bryant, 1982; Habte, 1978), sin embargo, la capacidad de consumo es diferente para cada especie de ameba; 600 a 3 600 células de *Rhizobium meliloti* son necesarias para producir un trofozoíto de *Hartmannella*, 800 a 7, 500 células de *Xantomona campestri* para producir un trofozoíto de *Naegleria* (Danso, 1975) y 8 300 células de *Pseudomonas paucimabilis* para producir un trofozoíto de *Acanthamoeba polyphaga* (Bryant, 1982).

El conteo de bacterias totales por el método de fluorescencia para determinar el número total de bacterias presentes en el agua de los canales de riego de Mexicali, mostró en general cuentas de bacterias muy variadas entre un canal y otro. En general el número de bacterias estuvo distribuido a lo largo de los cuerpos de agua muestreados en concentraciones de 1 a 9.5×10^6 cél/ml siendo los canales IND, XCH, OAX, MCH y COR donde se reportaron los valores más altos de las mediciones (Cuadro 19).

Cuadro 19. Conteo de bacterias totales de por el método de fluorescencia en nueve muestreos en Mexicali.

Muestra	Bacterias totales X 10^6 cél/ml								
	M I	M II	M III	M IV	M V	M VI	M VII	M VIII	M IX
RPM	3.5	2.3	4.3	1.2	1.0	1.0	ND	2.5	2.3
CAN	2.2	3.1	5.2	1.0	1.0	1.2	ND	2.4	2.6
LA 1	2.7	2.6	3.2	1.0	6.5	7.3	ND	2.5	2.5
LA 2	3.2	3.8	2.7	2.5	5.7	3.8	ND	3.7	3.7
MCI	ND	ND	4.1	4.3	4.0	3.3	ND	3.2	2.3
MCH	ND	ND	3.5	7.6	5.7	4.5	ND	6.5	6.5
IRA	3.4	2.2	4.0	5.9	4.5	5.5	8.2	2.6	2.6
OAX	ND	ND	6.1	6.4	6.6	5.8	6.5	3.6	3.6
NAY	ND	ND	6.5	1.9	6.5	2.6	6.3	4.5	5.2
ABA	2.6	4.6	6.2	2.4	3.0	3.3	8.8	4.3	4.2
IAB	2.7	3.3	7.3	2.5	6.8	5.6	5.3	3.2	3.5
IND	9.2	6.1	5.1	2.9	6.3	2.8	9.5	2.8	3.1
XCH	6.3	4.5	8.4	6.4	5.3	4.4	ND	4.3	4.2
COR	4.1	3.3	6.7	9.2	8.7	7.8	8.3	6.8	6.8

ND= No determinado

La concentración de bacterias en el agua no tuvo una influencia determinante para la presencia o ausencia de *N. fowleri* en los canales de riego, ya que la ameba fue aislada de varios sitios de muestreo y al contrastarse con las cuentas de bacterias heterótrofas totales no se encontró una relación directamente proporcional entre amebas y bacterias, y ello puede ser explicado por la capacidad de *Naegleria* para alimentarse además de bacterias con levaduras,

hongos y ciliados entre otros organismos presentes en el medio acuático (Marciano-Cabral, 1987).

Coliformes totales

En este estudio se midió la concentración de coliformes totales (CT) en el agua de los canales de riego para establecer la calidad bacteriológica de estos cuerpos de agua considerando que la presencia de estas bacterias son un indicador de contaminación fecal, y su importancia radica en el hecho de que aunque el uso del agua de los canales de riego es para irrigar los campos agrícolas del valle de Mexicali, está muy extendida entre la población de la región la actividad de nadar en ellos, además de que como se mencionó anteriormente las bacterias son una fuente de alimento primario para las amebas de vida libre, y la presencia de bacterias puede determinar en gran medida la abundancia de AVL.

Por cuestiones técnicas las mediciones para este parámetro pudieron hacerse a partir del muestreo cinco. En el conteo de CT de los cinco muestreos realizados los valores fueron muy diferentes entre un canal y otro, así como entre muestreos. En este sentido se puede interpretar que cambios ambientales periódicos afectaron las poblaciones de coliformes totales. Las observaciones de campo mostraron que el flujo del agua en la mayoría de los canales de riego es de manera continúa lo que impide la acumulación de materia orgánica y por lo tanto la producción de bacterias.

Los canales de riego están revestidos de concreto por lo que se descarta la infiltración de desechos humanos conteniendo bacterias hacia los cuerpos de agua estudiados. Por otra parte el agua utilizada para el riego, tiene un control en su calidad microbiológica después de su conducción a través de las presas, caídas de agua y canales en ambos países debido al tratado binacional México-Estados Unidos establecido en 1947. Además en el territorio nacional, el agua que proviene del Río Colorado y que está destinada a consumo humano se encuentra sujeta a tratamiento por dos plantas potabilizadoras en la ciudad de Mexicali y que utilizan parte de este caudal para abastecer a la ciudad y sus alrededores.

En el cuadro 20 se puede apreciar el comportamiento de las CT a lo largo de los cinco muestreos, ahí se muestra una diferencia en las cantidades de bacterias en cada canal, sin embargo, si tomamos como referencia la Norma Oficial Mexicana que estipula la concentración máxima de coliformes totales que pueden estar presentes en un cuerpo de agua para riego agrícola y cuyo valor es de hasta 2000 UFC (unidades formadoras de colonias)/100 ml (NOM-001-SEMARNAT-1996), se observa que los valores de CT en más del 90% de los casos no rebasaron la norma.

En la misma gráfica se puede observar también que los canales que tuvieron una mayor concentración de CT fueron aquellos que se encuentran ubicados cercanos a centros de población rural con recursos escasos para la disposición de aguas residuales como el caso de los canales LA1, LA2 e IRA lo que habla de que la actividad humana tiene influencia sobre este parámetro.

En el sitio de muestreo IRA durante los muestreos V y VI se registraron las mayores concentraciones de coliformes totales las cuales correspondieron a 3500 y 2900 UFC/100ml respectivamente, las cuales rebasan por mucho las especificaciones de la norma NOM-001-SEMARNAT-1996 para este tipo de aguas, la explicación para este hecho, es la misma que se hizo para OD y conductividad en un apartado anterior, es decir, el estancamiento del canal por falta de mantenimiento en dos ocasiones fue la causa en el aumento de CT en los dos muestreos, aunado a la actividad humana en esta zona.

Cuadro 20. Bacterias coliformes totales medidas en cinco muestreos a partir del agua de los canales de riego en Mexicali, Baja California.

Canal	Coliformes totales (UFC/100ml)				
	M V	M VI	M VII	M VIII	M IX
RPM	100	300	ND	0	0
CAN	200	200	ND	0	0
LA1	1700	1000	ND	1100	1100
LA2	1200	300	ND	2100	2100
MCI	100	300	ND	0	0
MCH	0	0	ND	1800	1800
IRA	3500	2900	500	1200	1200
OAX	200	100	700	600	600
NAY	300	100	400	300	300
ABA	200	100	400	700	700
IAB	100	100	400	500	500
IND	500	400	1800	700	700
XCH	100	0	ND	200	200
COR	1000	1200	700	900	900

ND= No determinado

Este parámetro puede tener una influencia decisiva para la presencia o ausencia de AVL en los canales de riego, puesto que las AVL se alimentan preferentemente de bacterias y secundariamente de otro tipo de organismos como levaduras, hongos y ciliados (Marciano-Cabral, 1987) y dado que de estos tres canales mencionados se recuperaron 14 de los 38 aislados amebianos de la especie *N. fowleri*, lo que representa un porcentaje de casi el 37% del total de esta ameba durante los nueve muestreos realizados en este trabajo.

Determinación de la materia orgánica

Uno de los parámetros que pueden explicar en gran medida el comportamiento de una población de protozoos como es el caso de *N. fowleri* es la concentración

de materia orgánica en el agua, sin embargo, debido al margen de operación para realizar algunos análisis, basamos nuestra fuente de información sobre la calidad del agua de los canales de riego en los reportes que la Comisión Nacional del Agua (CNA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) a través de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) (1998) y el International Boundary and Water Commission (IBWC) del Río Colorado hacen para el distrito de riego 014 del Río Colorado, ubicado en el valle de Mexicali, y que ocupa el cuarto lugar en importancia productiva y de extensión territorial a nivel nacional.

Los reportes coinciden que el Río Colorado no presenta un problema de contaminación orgánica en sus aguas, las cuales se clasifican como de buena calidad como agua de riego, aunque se menciona que el principal problema del río se refiere al balance de nitrógeno que es aportado al acuífero, influenciado principalmente por la cantidad de agua percolada en el total de la superficie, se presenta una aportación equivalente de 22.9 mg/L de nitrato-N hacia el acuífero (por arriba del límite máximo que establece el Servicio de Salud Pública de EEUU para nitrato-N de 10 mg/L) (Cortés, 2000).

A partir del muestreo IV se tomaron muestras adicionales de agua, y se enviaron al Laboratorio de Análisis Físicoquímicos de Mexicali para determinar la DBO₅ y poder establecer la importancia de este parámetro en la presencia o ausencia de *N. fowleri* en esta agua, el análisis fue determinado en Mexicali, ya que la determinación de la DBO₅ debe ser inmediata para asegurar su exactitud.

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅)

El proceso de demanda bioquímica de oxígeno al quinto día está relacionado a las transformaciones que involucran el consumo de OD en la degradación de la materia orgánica (Nives, 2003). Los resultados de este análisis para las muestras de agua recolectadas de los canales de riego de Mexicali se describen en el Cuadro 21. Ahí se observa que en todos los sitios de muestreo se registraron valores de DBO₅ en el ámbito de 1.9 a 15.3 mg DBO₅/L y satisfacen el criterio de acuerdo al cual el agua que tiene carga de DBO₅ menor de 2 mg/L se consideran no contaminadas con un nivel de calidad alto.

En las estaciones donde el valor de la DBO₅ esta elevada y se encuentra en el ámbito de los 10 a 15 mg/L se sugiere que hay una carga de aguas de desecho sobre el flujo de agua de los canales y muestran una calidad baja, lo cual está de acuerdo con los demás resultados, incluyendo los bacteriológicos, de conductividad y oxígeno disuelto, ya que los canales que siguen presentando valores más elevados que los demás son LA1, LA2 e IRA. De cualquier manera el parámetro medido de DBO₅ no es crítico para el establecimiento de poblaciones amebianas incluyendo a *Naegleria fowleri*.

Cuadro 21. Concentraciones de DBO₅ medidos en seis muestreos a partir del agua de los canales de riego en Mexicali.

Canal	DBO ₅ (mg/L)					
	M IV	M V	M VI	M VII	M VIII	M IX
RPM	2.8	2.1	2.3	3.0	2.7	2.5
CAN	3.1	2.0	3.4	2.4	2.6	3.1
LA1	8.8	9.0	6.8	11.8	15.3	12.6
LA2	9.2	9.6	12.0	12.3	11.5	8.4
MCI	2.1	2.0	1.9	2.3	3.5	2.9
MCH	2.0	2.0	2.1	2.6	4.1	2.5
IRA	6.0	7.5	14.3	11.6	8.5	15.2
OAX	4.3	3.5	1.5	3.9	5.1	2.5
NAY	5.5	4.2	5.4	3.6	4.2	3.9
ABA	8.5	7.5	6.2	4.6	5.8	8.6
IAB	5.7	4.3	4.2	5.2	4.6	3.4
IND	4.0	3.2	2.1	5.2	3.7	3.9
XCH	4.2	4.4	5.2	6.3	4.2	3.6
COR	5.8	6.7	7.7	8.5	5.8	7.8

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Coefficiente de correlación de Spearman

Los resultados obtenidos aplicando el coeficiente de correlación de Spearman (Cuadro 22) indican que no existió una clara correlación entre los parámetros fisicoquímicos y el número de especies de amebas encontradas en los muestreos. Este comportamiento puede explicarse por el hecho de que en los muestreos el número de especies aisladas fue muy bajo en comparación con el total de organismos aislados. Con respecto a la conductividad y el número de especies encontradas, se observó que a mayor valor de conductividad disminuyó el número de especies encontradas, obteniéndose valores de $R = -0.632$ sin embargo, este análisis tuvo un nivel de significancia $p = > 0.05$ bajo, lo cual indica que dicha relación debe ser poco estimada.

Cuadro 22. Coeficientes de correlación de Spearman entre el número de especies y las variables ambientales correspondientes a los muestreos.

Variables ambientales	Muestreos I y II (N=28)		Muestreo III y IV (N=32)		Muestreo V y VI (N=14)		Muestreo VII y VIII (N=32)	
	R	p	R	p	R	P	R	p
Temp. ambiental / No. especies	0.3562	0.2111	-0.1152	0.6709	0.4743	0.2821	-0.1071	0.6929
Temp. agua / No. Especies	0.1287	0.6609	-0.0577	0.8318	0	1	-0.0793	0.7701
pH / No. Especies	-0.0860	0.7697	0.2335	0.3840	0.2415	0.6018	-0.1210	0.6552
O ₂ disuelto / No. especies	-0.1641	0.5749	0.1728	0.5221	0.1581	0.7349	-0.0223	0.9344
Conductividad / No. Especies	0.2270	0.4350	-0.1533	0.5705	-0.6324	0.1274	-0.1163	0.6678
Coliformes / No. Especies	-0.0669	0.8201	0.3524	0.1805	0.1656	0.7225	0.6816	0.0036

N= Número de datos pareados. R= Coeficiente de correlación. p= Nivel de significancia estadística.

Nota: En negritas se muestran los valores cuya relación tiene significancia estadística.

El análisis de correlación de Spearman muestra, sin embargo, una correlación moderada con tendencia a ser buena entre la concentración de coliformes totales y el número de especies encontradas en los dos últimos muestreos con valores de $R=0.681$ y $p < 0.05$ (valor significativo). El análisis para estos dos parámetros indica que el aumento y disponibilidad de bacterias como fuente de carbono para el consumo de las amebas en el cuarto muestreo tuvo una influencia directa que favoreció el sostenimiento de la diversidad de AVL encontrada.

Regresión múltiple “Stepwise”

Mediante el modelo de regresión múltiple se buscó determinar que conjunto de variables ambientales influyeron en cierta medida con la presencia de AVL. Los resultados contenidos en el cuadro 10 muestran que la composición y el orden de importancia del conjunto de las variables ambientales que pudieron estar relacionadas con la presencia de las AVL no fue similar en todos los muestreos.

Es decir, para cada muestreo, el conjunto de variables implicadas en dicha relación fueron las distintas, además, cada una de las variables implicadas no tuvieron la misma importancia en los muestreos realizados. Lo anterior hace suponer que las condiciones ambientales analizadas no tuvieron el mismo efecto sobre la presencia de AVL a lo largo de este estudio.

De manera general, todas las variables ambientales se consideraron importantes con este método estadístico multivariado, aunque como ya se menciona anteriormente para cada muestreo fueron diferentes (Cuadro 23). Para este análisis estadístico cabe mencionar que se obtuvo una relación alta entre el número de coliformes totales y el número de especies encontradas en los dos últimos muestreos con valores de $R=0.73$, $B= 0.60$ y $p < 0.05$ es decir una significancia estadística moderada. En este punto es importante mencionar que los coeficientes de correlación obtenidos entre la densidad de coliformes totales y la presencia de las AVL en el sistema de canales de riego de valle de Mexicali, concuerdan con la sugerencia descrita por Rodríguez (1994) y por los trabajos realizados por Ettinger (2003) y por Kyle y Noblet (1985).

Cuadro 23. Valores de correlación múltiple entre el conjunto de variables ambientales contra el número de especies encontradas correspondientes a los cuatro muestreos.

Muestreos I y II			Muestreos III y IV		
R= .64380595 R ² = .41448610			R= .53302758 R ² = .28411840		
Ajustado R ² = 0.23883192			Ajustado R ² = 0.17398277		
F(3,10)=2.3597 p<.13290.			F(2,13)=2.5797 p<.11389		
Error estándar estimado: 0.09448			Error estándar estimado: 0.08151		
Variables ambientales	BETA	p	Variables ambientales	BETA	p
Conductividad	0.63079363	0.04089858	Coliformes	0.58427481	0.04102596
pH	-0.4437181	0.1303902	Conductividad	-0.2707650	0.31240326
Temp. agua	0.25349089	0.32124019			

Muestras V y VI			Muestras VII y VIII		
R= .98045652 R ² = .96129499			R= .73681855 R ² = .54290157		
Ajustado R ² = 0.76776996			Ajustado R ² = 0.42862696		
F(5,1)=4.9673 p<.32756			F(3,12)=4.7509 p<.02084		
Error estándar estimado: 0.04141			Error estándar estimado: 0.12554		
Variables ambientales	BETA	p	Variables ambientales	BETA	p
Temp. ambiental	2.50325141	0.16759866	Coliformes	0.60167358	0.01374904
Coliformes	0.59381149	0.21169753	Temp. agua	0.27313481	0.20868874
O ₂ disuelto	-1.584751	0.20443439	O ₂ disuelto	-0.2727329	0.21149047
Temp. agua	-0.6314259	0.34879246			
Conductividad	-0.3205390	0.41582203			

R= Coeficiente de correlación.

R²= Coeficiente de determinación.

Beta= Coeficiente de regresión.

p= Nivel de significancia estadística.

Nota: En negritas se muestran los valores cuya relación tiene significancia estadística.

Las AVL además de disponer de alimento bacteriano para sobrevivir, necesitan adaptarse a los cambios del ambiente en el que viven (Winięcka y Linder, 2001). Por ello, aunque estadísticamente no se encontró una correlación entre la presencia de AVL's y los parámetros fisicoquímicos considerados en este estudio (temperaturas del agua y ambiente, pH, conductividad y oxígeno disuelto), en su conjunto, ellos pudieron haber incidido sobre la proliferación de las AVL en el agua de los canales muestreados, considerando que los valores medidos se encontraron dentro de los intervalos promedio tolerados por las AVL. De tal manera que no solamente la disponibilidad de alimento bacteriano determinará la presencia y distribución de amebas de vida libre en los sistemas acuáticos, sino que su supervivencia dependerá también de la relación que exista entre los cambios fisicoquímicos que sufren estos cuerpos de agua y su capacidad de soportar variaciones ambientales extremas.

CONCLUSIONES

Se describe por primera vez la distribución de especies de amebas de vida libre del género *Naegleria* en el sistema de canales de riego del valle de Mexicali, Baja California. En nueve muestreos a lo largo de cuatro años se obtuvieron e identificaron 255 aislados organismos pertenecientes a 14 géneros de amebas de vida libre a partir del agua del sistema de canales de riego en el valle de Mexicali, Baja California.

Por morfometría con microscopía en contraste de fases, pruebas de transformación ameboflagelar, tolerancia a temperaturas de incubación a 42-45 °C y de patogenicidad en animales de laboratorio, se identificaron 58 organismos amebianos del género *Naegleria*, al que pertenecen varios patógenos, causantes de infecciones cerebrales en humanos.

El 72% de los aislados identificados como *Naegleria* en pruebas de patogenicidad en animales de laboratorio mostraron una virulencia muy elevada al matar a ratones inoculados por las vías intranasal e intracerebral de manera fulminante en un promedio de cinco días, lo que demuestra el riesgo que representa para los humanos la presencia de estas amebas en el agua de los canales de riego de Mexicali.

El estudio para la búsqueda de *Naegleria fowleri* mostró la presencia del género, y probablemente de la especie, y para confirmar el diagnóstico de *Naegleria* a nivel de especie, se llevó a cabo el análisis de PCR para buscar un segmento de ADN de 1500 pb específico para la especie. Por esta técnica se identificaron a partir de 58 aislados amebianos del género *Naegleria* a 38 organismos como *Naegleria fowleri*. El PCR fue rápido, preciso y sensible para amplificar la región de ADN buscada por lo que se concluye que esta metodología molecular es confiable y podría ser incluida como una herramienta para el diagnóstico de esta especie amebiana en particular.

Con respecto a la relación de la presencia de *N. fowleri* con los factores ambientales: temperatura ambiente, temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto (OD) y concentración de materia orgánica, no se pudo establecer una influencia significativa sobre el crecimiento de las amebas. Estadísticamente las temperaturas ambiental y del agua no mostraron tener una marcada influencia en el desarrollo de las poblaciones de AVL. Por otra parte los análisis fisicoquímicos y bacteriológicos de las aguas de los canales de riego muestreados en Mexicali Baja California mostraron que tienen las condiciones ideales para soportar la presencia de amebas de vida libre.

El presente estudio demostró que las amebas de vida libre se encuentran ampliamente distribuidas en el sistema de canales de riego del valle de Mexicali, dado que las condiciones fisicoquímicas y bacteriológicas del agua de los canales muestreados presentan condiciones favorables para el desarrollo de

estos microorganismos, Sin embargo, en los canales de riego cercanos a las localidades con mayor densidad poblacional y en los canales cercanos a la ciudad hubo mayor número de aislamientos.

Durante todos los muestreos se aislaron repetidamente organismos amebianos del género *Naegleria* partir del agua de riego de los canales estudiados. *Naegleria fowleri* estuvo presente en 10 de los 14 sitios de muestreo. En los canales de agua de riego: Ladrillera I, Ladrillera II, Abasolo, Nayarit y Coronita se aislaron el mayor número de amebas de la especie *Naegleria fowleri* durante los meses de marzo, mayo, junio y agosto, coincidentes con la época de mayor calor en esta región de la República Mexicana.

La meningoencefalitis amebiana primaria por *Naegleria* debería ser incluida entre los diagnósticos diferenciales del sistema nervioso central durante la temporada de verano en aquellas áreas con temperaturas ambientales elevadas.

LITERATURA CITADA

Aladro, L. A. 2006. Principales Clasificaciones de los Protozoos. Las prensas de ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias (eds.) 1ª ed. México. 90 pp.

Anderson, K. y Jamieson A. 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* **1**:7756 902–903.

Anderson O. R. 2000. Abundance of terrestrial gymnamoebae at a northeastern U. S. site: a four-year study, including the El Nino winter of 1997-1998. *J. Eukariot Microbiol.* **47** (2): 148-155.

Anderson O. R., Gorrell T., Bergen A., Kruzansky R. y Levandowsky M. 2001. Naked amoebae and bacteria in an oil-impacted salt marsh community. *Microb. Ecol.* **42**: 474-481.

Arredondo F. J. y Ponce P. J. 1998. *Calidad de agua en acuicultura*. Ed. AGT, México. D. F. 222 pp.

Apley, J., Clarke S., Roome A., Sandry S., Saygi G., Silk B. y Warhurst D. 1970. Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Br. Med. J.* **1**:596–599.

Barcina I., Ayo B., Muela A., Egea L. e Iriberry J. 1991. Predation rates of flagellate and ciliated protozoa on bacterioplankton in a river. *FEMS Microbiol. Ecol.* **85**: 141-150.

Baron S. 1996. *Medical Microbiology*. The University of Texas Medical Branch at Galveston. 4th ed. Estados Unidos de America.

Barnett, N. D., Kaplan A. M., Hopkin R. J., Saubolle M. A. y Rudinsky M. F. 1996. Primary amoebic meningoencephalitis with *Naegleria fowleri*: Clinical Review. *Pediat. Neurol.* **15**(3):230-4.

Brown M. R. y Barker J. 1999. Unexplored reservoirs of pathogenic bacteria: protozoa and biofilms. *Trends Microbiol.* **7** (1): 46-50.

Bryant, R. J., Woods, L. E., Coleman, D.C., Fairbanks, B. C., McClellan, J. F. y Cole, C. V. 1982. Interactions of bacteria and amoeba populations in soils microcosms with fluctuating moisture content. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**: 747-752.

Cable B. L. y John D. T. 1986. Conditions for maximum enflagellation in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **33**: 467-472.

Carter, R. F. 1969. Sensitivity to amphotericin B of a *Naegleria* sp. Isolated from a case of primary amoebic meningoencephalitis. *J. Clin. Pathol.* **22**: 470–474.

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

CDC. 2003. Primary amoebic meningoencephalitis Georgia, 2002. *Morb Mortal Wkly Rep.* **52** (40): 962-964.

Cavalier-Smith, T. 1998. A revised six-kingdom system of life. *Biological reviews.* **73**: 203-206.

Cogo P. E., Scaglia M., Gatti S., Rossetti F., Alaggio R., Laverda A. M., Zhou L., Xiao L. y Visvesvara G. S. 2004. Fatal *Naegleria fowleri* Meningoencephalitis in Italy. *Emerg Infect Dis.* **10** (10): 1835-1837.

Cortes L. A. 2000. Calidad del agua y sociedad rural, riesgos potenciales de salud en la cuenca baja del río Colorado: el caso del valle de Mexicali, México. Relaciones Tierra-Agua en cuencas hidrográficas rurales. Taller electrónico. OMS, FAO. 1-4.

COSAE (Comisión de servicios de agua del estado). 2004. Reseña del acueducto Río Colorado-Tijuana. Obtenido el 30 de mayo de 2005 en <http://www.bajacalifornia.gob.mx/cosae/introduccion.htm>.

Culbertson, C.G. 1981. Amebic meningoencephalitis. *Antibiotics Chemoter.* **30**: 28-53.

Danso S. K. y Alexander M. 1975. Regulation of predation by prey density: the protozoan-*Rhizobium* relationship. *Appl. Environ. Microbiol.* **29**(4): 515-521

De Jonckheere J. F. y van de Vorde H. 1976. Difference in destruction of cyst of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 294-297.

De Jonckheere J. F. y van de Vorde H. 1977. The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**: 10-15.

De Jonckheere, J. F. 1981. *Naegleria australiensis* sp. nov. another pathogenic *Naegleria* from water. *Protistologica* **17** (3): pp. 423-429.

De Jonckheere, J. F., Aerts, M. y Martínez, J. 1983. *Naegleria australiensis*: experimental meningoencephalitis in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77** (5): 712-716.

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

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

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

De Jonckheere J. F., Brown S., Dobson P. J., Robinson B. S. y Pernin P. 2001. The amoebae-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. F. 2002. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool.* **41**: 309-342.

De Jonckheere J. F. 2007. Molecular identification of free-living amoebae of the Vahlkampfiidae and Acanthamoebidae isolated in Arizona (USA). *Eur. J. Protistol.* **43**(1):9-15.

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

De Napoli T. S., Rutman J. Y., Robinson J. R. y Rhodes M. M. 1996. Primary amoebic meningoencephalitis after swimming in the Rio Grande. *Texas Medicine.* **92**(10):59-63.

Dhu, P. 1982. Effect of antimalarial drugs on *Naegleria fowleri*. *Med. J. Aust.* **1**:13.

Dingley D. 1996. Safe water practices can lower risk of contracting primary amoebic meningoencephalitis. *Tex Med.* **92**(10):28-9.

Donald, J. J., Keys E. A., Cursons R. T. and Brown T. J. 1979. Chemotherapy of primary amoebic meningoencephalitis (primary amebic meningoencephalitis). *N. Z. J. Med. Lab. Technol.* :23–26.

Duma, R. J. and Finley R. 1976. *In vitro* susceptibility of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* species to a variety of therapeutic agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**: 370-376.

Ettinger M. R., Webb S. R., Harris S. A., McInich S. P., Garman G. C. y Brown B. L. 2003. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol. Res.* **89**: 6-15.

Fulton C. y Lai E. Y. 1998. Stable intermediates and holdpoints in the rapid differentiation of *Naegleria*. *Exp. Cell Res.* **242**: 429-438.

Fulton C. 1977. Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 597-629.

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

Gallegos E., Warren A., Robles E., Campoy E., Calderon A., Sainz G., Bonilla P. y escolero O. 1999. The effects of wastewater irrigation on groundwater quality in Mexico. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 40 (29): 45-52.

González J. M., Iriberry J., Egea L. y Barcina I. 1990. Differential rates of digestion of bacteria by freshwater and marine phagotrophic protozoa. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1851-1857.

Goswick S. M. y Brenner G. M. 2003. Activities of azithromycin and amphotericin B against *Naegleria fowleri* *in vitro* and in a mouse model of primary amebic meningoencephalitis. *Antimicrob Agents Chemother.* **47** (2): 524-528.

Greenberg, E. A., Trussell, R. R. y Clesceri, S. L. 1988. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 16th. APHA, AWWA, WPCF. EUA. 1268 pp.

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

Gupta S. Das SR. 1999. Stock cultures of free-living amebas: effect of temperature on viability and pathogenicity. *J. Parasitol.* **85**(1):137-9.

Habte, M. y Alexander, M. 1978 Protozoan density and the coexistence of protozoan predators and bacteria prey. *Ecology.* **59**: 140-146.

Hara T. y Fukuma T. 2005. Diagnosis of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. *Parasitol Int.* **54**(4) 219-221.

Hashimoto R. y Tanaka Y. 1999. Primary amebic meningoencephalitis (*Naegleria*). *Ryokibetsu Shokogun Shirizu.* 412-4.

- Hu W. N., Band R. N. y Kopachik W. J. 1991. Virulence-related protein synthesis in *Naegleria fowleri*. *Infec. Immunity*. **59** (11): 4279-4282.
- Hu W. N., Kopachik W. J. y Band R. N. 1992. Cloning and characterization of transcripts showing virulence-related gene expression in *Naegleria fowleri*. *Infec. Immunity*. **60** (6): 2418-2424.
- Huizinga H. W. y McLaughlin G. L. 1990. Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reservoir. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (7): 2200-2205.
- Jain R., Prabhakar S., Modi M., Bhatia R. y Sehgal R. 2002. *Naegleria* meningitis: Rare Survival. *Neurol India*. **50**: 470-472.
- Jantzen H., Schulze I., Horstmann U. y Christofori G. 1983. Control of protein synthesis in *Acanthamoeba castellanii*. *J. Protozool.* **30**: 204.
- Jarolim K. L. McCosh J. K., Howard M. J. y John D. T. 2000. A light microscopy study of the migration of *Naegleria fowleri* from the nasal submucosa to the central nervous system during the early stage of primary amebic meningoencephalitis in mice. *J Parasitol.* **86** (1): 50-55.
- John D. T. 1982. PAM and the biology of *N. fowleri*. *Ann. Rev. Microbiol.* **36**: 101-123.
- John D. T. y Marciano-Cabral F. M. 1984. Sucker-like structures on the pathogenic amoeba *Naegleria fowleri*. *Appl Environ Microbiol.* **47** (1): 12-14.
- John, D. T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. **In: Parasitic Protozoa**, Ed. por Kreier J. P. y Baker J. R. Academic Press, Nueva York. 140-246.
- John D. T. y Howard M. J. 1995. Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol Res.* **81**(3):193-201.
- Kasprzak, W., Manzur T. y Červa L. 1982. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. *Folia Parasitol. (Prague)*. **29**: 211-218.
- Khan, N.A. 2003 Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. *Microbiol. Pathogenesis*. **34**:277-285
- Kidney D. D. y Kim S. H. 1998. CNS infections with free-living amebas: neuroimaging findings. *Am. J. Roentgenol.* **171**(3):809-812.
- Kilvington, S., Mann, P. G., y Warhurst D. C. 1991. Pathogenic *Naegleria* amoebae in the waters of Bath: a fatality and its consequences. From Kellaway, G. A. (ed.) *Hot Springs of Bath*, pp 89-96.

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.

Kinner N. E., Harvey R. W. y Kazmierkiewicz-Tabaka M. 1997. Effect of flagellates on free-living bacterial abundance in an organically contaminated aquifer. *FEMS Microbiol. Revs.* **20**: 249-259.

Kuroki T. Yagita K. Sugiyama H. Yamai S. Fukuma T. Katsube Y. y Endo T. 1998. Experimental infection of *Naegleria fowleri* in mice. *J. Jap. Assoc. Infect. Dis.* **72** (10): 1064-1069.

Kyle, D. E. y Noblet, G. P. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J. Protozool.* **32**: 99-105.

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.

Lares V. F., De Jonckheere J. F., De Moura H., Rechi I. A., Ferreira G. E., Fernandez Q. G., Ruiz M. C. y Visvesvara G. S. 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: Study of the isolates. *J. Clin. Microbiol.* **31** (3): 685-688.

Lee, K. K., Karr S. L., Wong M. M. y Hoeprich P. D. 1979. *In vitro* susceptibilities of *Naegleria fowleri* strain HB-1 to selected antimicrobial agents, singly and in combination. *Antimicrob Agents Chemother.* **16**: 217-220.

Levy D. A., Bens M. S., Craun G. F., Calderon R. L. y Herwaldt B. L. 1998. Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1995-1996. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep. CDC Surveill Summ* 1998 Dec 11. **47** (5) 1-34.

Levy Y. L., Lai E. Y., Remillard S. P. y Fulton C. 1998. Centrin is synthesized and assembled into basal bodies during *Naegleria* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton* **40**: 249-260.

López-Corella E, De León B, de Jonckheere JF. 1989. Primary amebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* in an adolescent from Huetamo, Michoacan, Mexico. *Bol Med Hosp Infant Mex.* **46**(9):619-22.

Loschiavo, F., T. Ventura-Spagnolo, E. Sessa, and P. Bramanti. 1993. Acute primary meningoencephalitis from entamoeba *Naegleria fowleri*. *Acta Neurol. (Napoli)* **15**: 333-340.

Macleán R. C., Richardson D. J., 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., Stanitski, S., Radhakrishna, V. y Bradley, S. G. 1987. Characterization of a neutral aminoacyl-peptide hydrolase from *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **34** (2): 146-149.

Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol. Rev.* **52**: (1): 114-133.

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

Martinez A. J. 1985. *Free-living amebas: Natural history, prevention, diagnosis, pathology, and treatment of disease*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 156 pp.

Mayers D. F., Rogerson A., Marchant H. J. y Laybourn-Parry J. 1998. Temporal Abundance of naked bacterivore amoebae in coastal East Antarctica. *Estuar Coast Shelf Sci.* **46**: 565-572.

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

Norma oficial mexicana NOM-127-SSA1-1994. "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización".

Norma oficial mexicana NOM-001-SEMARNAT-1996. "Que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales". En:
<http://www.semarnat.gob.mx/leyesy normas/Pages/normasoficialesmexicanasvigentes.aspx>

Ontiveros D., Lara R. M. A. y López L. F. J. 1995 Meningoencefalitis por ameba de vida libre. Revisión de siete casos. *Rev. Med. IMSS* **33** (4): 367-369.

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

Patterson, D. J. Rogerson, y Vørs N. 2000. En Lee J. J., Leedale G. F. y Bradbury P (eds). *An illustrated Guide to the Protozoa*. Segunda Edición. Soc. Prot. Allen Press, Inc. Kansas. pp 1104-1105.

Pélandakis M., Kaundun S. S., De Jonckheere J. F. y Pernin P. 1997. DNA diversity among the free-living amoeba, *Naegleria fowleri*, detected by the random amplified polymorphic DNA method. *FEMS Microbiol. Lett.* **151**: 31-39.

Pélandakis M., De Jonckheere J. F. y Pernin P. 1998. Genetic variation in the free-living amoebae *Naegleria fowleri*. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (8): 2977-2981.

Pélandakis M. y Pernin P. 2002. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme análisis for detection and exploration of the variability in the free-living amoebae *Naegleria* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **68** (4): 2061-2065.

Poungvarin, N., and P. Jariya. 1991. The fifth nonlethal case of primary amoebic meningoencephalitis. *J. Med. Assoc. Thai.* **74**:112-115.

Reilly, M. F., Marciano-Cabral F., Bradley D. W. y Bradley S. G. 1983. Agglutination of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* by antibodies in human serum. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 576-581.

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

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

Rivera Agüero F., Lares Villa F., Gallegos Neyra E., Ramírez Flores E., Bonilla Lemus P., Calderón Vega A., Martínez José J., Rodríguez Zaragoza S. y Alcocer Durand J. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *J. Environ. Res.* **50**: 289-295.

Rivera F., Cerva L., Martínez J., Keleti G., Lares F., Ramírez E., Bonilla P., Graner S. R., Saha A. K. y Glew R. H. 1990. *Naegleria lovaniensis tarasca* New Subspecies, and the Purepecha Strain, a Morphological Variant of *Naegleria lovaniensis* Isolated from Natural Thermal Waters in Mexico. *J. Protozool.* **37** (4), pp 301-310.

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

Rivera F., Bonilla P., Ramírez E., Calderón A., Rodríguez S., Ortiz R., Hernández D. and Rivera V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air, Soil Pollut.* **74** (1-2): 65-87.

Robinson B., Christy P., Hayes S. y Dobson P. 1992. Analytical Methods Manual. Protozoology. State Water Laboratory Engineering and Water Supply Department South Australia.. SWL Report N. 39.

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

Rodriguez R. Mendez O. Molina O. Luzardo G. Martinez A. J. Visvesvara G. S. Cardozo J. 1998. Central nervous system infection by free-living amebas: report of 3 Venezuelan cases. *Rev Neurol.* **26**(154):1005-8.

Rodríguez P. E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri* informe de un caso. *Infectología.* **IV** (10): pp. 263-266.

Rodríguez, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology.* **20** (3): 225-241.

Rogerson A. y Gwaltner C. 2000. High numbers of naked amoebae in the planktonic waters of a mangrove stand in southern Florida, USA. *J. Eukaryot. Microbiol.* **47** (3): 235-241.

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.* **64** (5): 1822-1824.

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

Scaglia M., Strosselli M., Grazioli V., Gatti S., Bernuzzi M. y De Jonckheere J. F. 1983. Isolation and Identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *App. Environ. Microbiol.* **46** (6):1282-1285.

Scaglia M., Gatti S., Bernuzzi A. M., Cevini C., Chichino G., and Rondanelli E. G. 1988. An in vitro comparative study on the effect of amphotericin B, econazole, and 5 fluorocytosine on *Naegleria fowleri*, *australiensis*, and *Naegleria australiensis* s.sp. *Italica. Microbiologica.* **11**: 279–288.

- Scaglia M. 1997. Human pathology caused by free-living amoebae. *Ann Ist Super Sanita.* **33** (4):551-66, 1997.
- Schuster F. 1963. An electron microscope study of the amoeboid-flagellate, *Naegleria gruberi* (Schardinger). I. The amoeboid and flagellate stages. *J. Protozool.* **10**: 297-313.
- Schuster F. 1975. Ultrastructure of cyst of *Naegleria* spp.: A comparative study. *J. Protozool.* **22**: 352-359.
- Schuster F. L. y Visvesvara G. S. 1998. Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas. *J. Euk. Microbiol.* **45** (6): 612-618.
- Schuster F. L. y Visvesvara G. S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International J. Parasitol.* **34**: 1001–1027.
- Seidel, J. S., Harmatz P., Visvesvera G. S., Cohen A., Edwards J., and Turner J. 1982. Successful treatment of primary amoebic meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* **306**: 346–348.
- Shalini S., Wilson G., Prashanth H., Vidyalakshmi K., Dhanashree B. y Bharath R. 2002. Primary meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: First reported case from Mangalore, South India. *J. Clin. Microbiol.* **40** (1): 309-310.
- Sheehan K. B., Fagg J. A., Ferris M. J. y Henson J. M. 2003. PCR detection and analysis of the free-living amoeba *Naegleria* in hot springs in Yellowstone and Grand Teton National Parks. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (10): 5914-5918.
- Shenoy S., Wilson G., Prashant H. V., Vidyalakshmi K., Dhanashree B. y Bharath R. 2002 Primary meningoencephalitis by *Naegleria fowleri*: First reported case from Mangalore south India. *J. Clin. Microbiol.* **40** (1): 309-310.
- Singh S. N., Patwari A. K., Dutta R., Taneja N. y Anand V. K. 1998. *Naegleria* meningitis. *Indian Pediatr.* **35** (10):1012-5.
- Smego, R. A., and D. T. Durack. 1984. In vitro susceptibility of *Naegleria fowleri* to ketoconazole, BAYn7133, and allopurinol riboside. *J. Parasitol.* **70**: 317-318.
- Smirnov A. V. 2002. Vertical distribution and abundance of Gymnamoebae (Rhizopoda) in bottom sediments of the brackish water Nivå Bay (Baltic Sea, The Sound). *Protist.* **153**: 239-250.
- Sparagano O. 1993. Differentiation of *Naegleria fowleri* and other Naegleriae by polymerase chain reaction and hybridization methods. *FEMS Microbiol. Lett.* **110**: 325-330.

Stevens, A. R., S. T. Shulman, T. A. Lansen, M. J. Cichon, y E. Willaert. 1981. Primary amoebic meningoencephalitis: a report of two cases and antibiotic and immunologic studies. *J. Infect. Dis.* **143**:193-199.

Sugita Y., Fujii T., Hayashi I., Aoki T., Yokoyama T., Morimatsu M., Fukuma T. y Takamiya Y. 1999. Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: an autopsy case in Japan. *Path. Int.* **49** (5): 468-70.

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

Szenasi Z., Endo T., Yagita K. y Nagy E. 1998. Isolation, identification and increasing importance of 'free-living' amoebae causing human disease. *J. Med. Microbiol.* **47** (1): 5-16.

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

Tiewchaloren S. y Junnu V. 2001. Distribution of pathogenic *Naegleria* spp. In Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. & Pub. Health.* **32** (2): 172-178.

Tsvetkova N., Schild M., Panaiotov S., Kurdova-Mintcheva R., Gottstein B., Walochnik J., Aspöck H., Lucas M. R. y Müller N. 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol. Res.* **92**: 405-413.

Tyndall R. L., Ironside K. S., Metler P. L., Tan E. L., Hazen T. C. y Fliermans C. B. 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl. Environ. Microbiol.* **55** (3): 722-732.

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

Van Belkum A., De Jonckheere J. F. y Quint W. G. 1992. Genotyping *Naegleria* spp. and *Naegleria fowleri* isolates by interrepeat polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30** (10): 2595-2598.

Vargas Z. J., Gómez A. A. V., Vásquez M. J. A., Licea A.L., De Jonckheere J.F. y Lares V. F. 2005. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin. *Arch. Med. Res.* **36**(1):83-86.

Wang A., R. Kay W. S. Poon, y H. K. Ng. 1993. Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **95**: 249–252.

Weik, R, R, y John, D. T. 1977a. Cell size, macromolecular composition and O₂ consumption during agitated cultivation of *Naegleria gruberi*. *J Protozool.* **24**: 196-200.

Weik, R, R, y John, D. T. 1977b. Agitated mass cultivation of *Naegleria fowleri*. *J Parasitol.* **63**: 868-871.

Winiiecka, K. J. y Linder, E. 2001. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* **152**: 613-619.

Xinyao L., Miao S., Yonghong L., Yin G., Zhongkai Z., Donghui W., Weizhong W y Chencai A. 2005. Feeding characteristics of an amoebae (*Lobosea: Naegleria*) grazing upon cyanobacteria: food selection, ingestion and digestion progress. *Microb Ecol.* **51**(3):315-325.

Yun H. C., Park S. J., Kong H. H. y Chung D. 2002. Isolation of genes induced in *Naegleria fowleri* during mouse brain passage. *Europ. J. Protistol.* **38**: 105-111.