



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

**Amebas de vida libre patógenas asociadas a
Legionella spp. en la biopelícula de un géiser en
Tecoautla, estado de Hidalgo.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

PRESENTA:

AMÉRICA ROCÍO LAGARZA HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. ARTURO CALDERÓN VEGA

Tlalnepantla, Estado de México

Agosto, 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi hijo Diego Osmar, gracias por todas esas sonrisas que me regalas a diario, por que aunque fue difícil, juntos lo logramos. Gracias por enseñarme a ver el cielo más azul, por ser mi compañero y darme tú energía, por tu paciencia, por darme fuerzas y alentarme a ser un mejor ser humano, por ser lo mejor de mi vida, por hacerme feliz y sobre todo por existir, te amo.

Mamá, gracias por tu cariño, por tus consejos, por confiar en mí, por ser la mujer tan valiosa que eres, por ser mi mejor amiga y hacerme fuerte como tú, por estar a mi lado apoyándome y empujándome siempre hacia adelante, por la confianza que existe entre las dos y lo más importante por darme la vida. Te quiero mucho mamá.

Papá, gracias por ser el mejor papá, por ser mi mejor amigo, por apoyarme en todo, hasta en lo más absurdo, por quererme tanto, por contar contigo para todo, por hacerme reír tan a menudo, por lo mucho que te admiro, por ser un excelente ser humano y por lo agradable que es estar contigo. Te quiero mucho papá.

A mi hermana Vanessa, por ser mi compañera, por ese amor, cariño y apoyo que solo se da entre hermanas, te quiero Vane.

A mi sobrina Clío, gracias pequeña, por hacer mi vida más feliz, por todo ese amor y esa ternura que solo tú puedes darme, por ser mi pequeña gran amiga y por todos esos maravillosos momentos y esas sonrisas que me has regalado.

Abuelita Paz, te extraño tanto y me haces mucha falta, gracias por todo tu amor, por todo tu apoyo, por que fuiste una mujer maravillosa y por que aprendí de ti puras cosas buenas, por que fuiste casi mi mamá y por que donde quiera que te encuentres, te siento y te llevo siempre conmigo.

A Jaime Alatríste, por ser parte de mi familia, por ser para Diego un buen ejemplo y por todo el apoyo que le has dado a mi hijo y a mí.

A mi primo Miguel, por que aunque ya pasaron muchos años de que no estas con nosotros, te sigo extrañando y estoy segura de que la vida seria mucho mejor si estuvieras conmigo.

AGRADECIMIENTOS

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme formar parte de ella.

A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por todos esos maravillosos momentos que pase dentro de ella.

A mi director de Tesis M. en C. Arturo Calderón Vega, por su valiosa ayuda, por la paciencia, por ser tan comprensivo, por el apoyo que siempre me brindo y por tener siempre la mejor disposición para ayudarme en la realización de este trabajo.

A la Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra, por su apoyo y por compartir conmigo sus conocimientos, por su simpatía, por sus consejos. Por esas clases maravillosas de Parasitología. Y por que además de haber sido mi profesora y revisora de tesis eres mi amiga.

A Carolina, gracias amiga por hacerme reír hasta en los peores momentos, por tantas travesuras compartidas, por ser mi cómplice y confidente, por estar siempre conmigo y por lo bien que la hemos pasado por mas de 20 años.

A Cinthya, mi mejor amiga de la carrera, gracias por ser tan buena amiga, por estar a mi lado en las buenas y en las malas, por conservar secretos en ningún baúl y por todos los momentos tan gratos que hemos vivido.

A Alejandro, que más te puedo decir que no te haya dicho ya. Te reitero que sin duda eres de las mejores personas que he conocido, gracias por todo tú apoyo, algún día tal vez entendamos esa conexión tan extraña, por los 1,500 km. de distancia que nos mantienen juntos y por Mérida.

A Daniel, por lo bien que la hemos pasado, por hacerme sonreír con tanta frecuencia, por aguantar mis malos ratos, por nuestra locura, por tú paciencia y por que a pesar de todo siempre estas junto a mi.

A mis amigos de la infancia que sigo queriendo tanto Gina, Monse, Bombón y Checo, gracias por esa infancia tan divertida.

A todos mis amigos de Iztacala: Chevy por ser la mejor amiga, Victoria por estar tan loca, Shan por ser tan lindita, Sue por que sé que de verdad fuimos amigas, Yacin por la confianza, Sergio por ser la persona tan valiosa que eres, Víctor por todas tus tonterías, Edi por ser mi camarada.

Alicia, Alejandra, Shanik, Era, Lidia, Lalo, Lacho, Alfredo y Jair. Muchas gracias por estar conmigo en todo este tiempo donde he vivido momentos felices y tristes, gracias por ser mis amigos y recuerden que siempre los llevare en mi corazón.

A mis compañeros de laboratorio Melisa y Arturo, por su apoyo, por hacer tan ameno el tiempo en el laboratorio y por que creo que hicimos un muy buen equipo. Y por último a la música que tanto disfruto escuchar, Depeche Mode, gracias por todas esas canciones que me han acompañado en cada momento, gracias por esas letras y ese sonido, me encantan.

No te quedes inmóvil
al borde del camino
no congeles el júbilo
no quieras con desgana
no te salves ahora
ni nunca
no te salves
no te llenes de calma
no reserves del mundo
sólo un rincón tranquilo
no dejes caer los párpados
pesados como juicios
no te quedes sin labios
no te duermas sin sueño
no te pienses sin sangre
no te juzgues sin tiempo

pero si
pese a todo
no puedes evitarlo
y congeles el júbilo
y quieras con desgana
y te salvas ahora
y te llenas de calma
y reservas del mundo
sólo un rincón tranquilo
y dejas caer los párpados
pesados como juicios
y te secas sin labios
y te duermes sin sueño
y te piensas sin sangre
y te juzgas sin tiempo
y te quedas inmóvil
al borde del camino
y te salvas
entonces,
no te quedes conmigo.

(Mario Benedetti)

CONTENIDO

LISTADO DE ABREVIATURAS	1
I. RESUMEN	2
II. INTRODUCCIÓN	3
1. Amebas de vida libre (AVL)	3
2. Antecedentes de las AVL	4
3. Antecedentes en México de las AVL	6
4. Infecciones amebianas en humanos	7
a) Meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP)	8
a. Síntomas de la MEAP	8
b. Diagnóstico para la MEAP	9
Métodos de imagen	9
Métodos microscópicos	9
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	9
c. Tratamiento para la MEAP	10
b) Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) y queratitis amebiana (QA)	10
a. Síntomas de la EAG y de la QA	11
b. Diagnóstico para la EAG	12
Métodos de imagen	12
Métodos microscópicos	12
c. Diagnóstico para la QA	12
Métodos microscópicos	13
Reacción en cadena de la polimerasa	13
d. Tratamiento para la EAG y la QA	13
5. Infecciones por <i>Acanthamoeba</i> en pacientes con VIH/SIDA	13
6. Clasificación de las principales especies patógenas de <i>Acanthamoeba</i>	14
Grupo I	14
Grupo II	14
Grupo III	14
7. Ciclos de Vida	15
a) <i>Naegleria fowleri</i>	15
b) <i>Acanthamoeba</i> spp.	16
8. Ecología de <i>Naegleria</i> spp. y <i>Acanthamoeba</i> spp.	17
9. AVL como hospederos de microorganismos	17
10. Características generales de <i>Legionella</i> spp.	18
11. Patogenia	19
12. Patologías asociadas a <i>Legionella pneumophila</i>	20
a. Diagnóstico microbiológico	21
Métodos directos	22
Aislamiento	22
Detección de antígenos	22
Detección de ácidos nucleicos	22
Métodos indirectos	22
b. Tratamiento	22
13. Antecedentes de <i>Legionella</i> spp.	23
14. Biopelículas	24

III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. OBJETIVOS	26
V. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	27
1. TECOZAUTLA, HIDALGO	27
2. BALNEARIO “EL GÉISER”	28
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. RECOLECTA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS	29
2. REGISTRO DE PARÁMETROS AMBIENTALES	30
3. AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACIÓN DE LAS AVL	30
a. Clonación de las AVL	30
b. Determinación taxonómica de los aislados	31
c. Cultivos axénicos	31
4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Legionella</i> spp.	32
a. Muestras de agua y biopelículas	32
b. Concentración por centrifugación	32
c. Descontaminación ácida para <i>Legionella</i>	32
d. Cultivo en agar BCYE enriquecido e identificación morfológica de <i>Legionella</i>	32
5. IDENTIFICACIÓN DE <i>Legionella pneumophila</i> por ADN	33
a. Extracción y purificación de ADN	33
b. PCR y Electroforesis	33
VII. RESULTADOS	34
1. Amebas de vida libre en la muestras recolectadas	34
2. Descripción morfológica de las AVL encontradas en el balneario “El Géiser”	38
3. Bacterias del género <i>Legionella</i> spp.	44
4. Identificación de <i>Legionella</i> spp. por PCR	45
5. Parámetros fisicoquímicos del sistema hidrotermal “El Géiser”	47
VIII. DISCUSIÓN	50
IX. CONCLUSIONES	58
X. RECOMENDACIONES	59
XI. LITERATURA CITADA	60
ANEXOS	67

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
AVL	amebas de vida libre
CDC	<i>Center for Disease Control</i>
EAG	encefalitis amebiana granulomatosa
INDRE	Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica
LCR	líquido cefalorraquídeo
LPS	lipopolisacáridos
MEAP	meningoencefalitis amebiana primaria
MIP	gen o potenciador de la infectividad del macrófago
MET	microscopía electrónica de transmisión
NNE	agar no nutritivo con <i>Enterobacter aerogenes</i>
PBSGM	medio con fosfatos, biotriptasa, suero y glucosa
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
RM	resonancia magnética
QA	queratitis amebiana
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	sistema nervioso central
TC	tomografía computarizada
VIH	virus de inmunodeficiencia humana

I. RESUMEN

Se describe una investigación realizada en el balneario “El Géiser”, en Tecozautla, estado de Hidalgo para la búsqueda de amebas de vida libre (AVL) con potencial patógeno para el humano. Las amebas de vida libre son un grupo de protozoos que se encuentran en todo tipo de ambientes, estos organismos causan patologías en seres humanos provocando meningoencefalitis, encefalitis y queratitis ocular, estas dos últimas en pacientes inmunocomprometidos.

Por otra parte se investigó la presencia de la bacteria del género *Legionella* y particularmente de la especie *Legionella pneumophila*, agente causal de la enfermedad del legionario o legionelosis (causante de neumonía en los seres humanos) y de la fiebre de Pontiac.

Se ha reportado en la literatura que bacterias del género *Legionella* habitan como endosimbiontes en AVL, por lo tanto es importante hallar una asociación entre estos organismos, ya que la patogenicidad de ambos tipos de organismos puede ser potencializada si estos dos patógenos llegan a contaminar a seres humanos.

Se tomaron muestras de agua y biopelículas del balneario “El Géiser”, el cual posee agua con temperaturas elevadas, ausencia de cloración y suficiente contenido de materia orgánica, factores que favorecen la proliferación de estos organismos. Se obtuvieron 148 aislados de AVL, pertenecientes a siete géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Saccamoeba*, *Rhizamoeba* y *Stachyamoeba*, y de los 148 aislados de AVL, se identificaron 76 aislados a nivel de especie, las cuales fueron: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. astronyxis*, *N. fowleri* y *N. gruberi*.

Se identificó la presencia de la bacteria del género *Legionella* y de acuerdo a los resultados de la técnica de biología molecular, reacción en cadena de la polimerasa, (PCR), se concluyó que la especie *L. pneumophila* se encuentra presente al resultar positiva en 14 de las 30 muestras estudiadas.

Los factores ambientales que más favorecieron la presencia de AVL patógenas y de *L. pneumophila* en este estudio fueron la temperatura del agua y la presencia de materia orgánica que se encontraba en las biopelículas. Esto indica que existe un riesgo para la salud de los usuarios de este sistema recreativo, al encontrarse AVL patógenas y bacterias del género *Legionella* como habitantes comunes de este tipo de ambiente.

II. INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoos cuyo interés e importancia en el área de la salud se ha incrementado notablemente debido a las severas patologías que causan en los seres humanos. La incidencia de casos de infecciones causadas por AVL registrada en las últimas décadas muestran que aunque no constituyen un grave problema de salud pública si deben ser tomadas en cuenta, sobre todo en los casos donde podrían llegar a presentarse como brotes epidémicos con consecuencias graves. En la mayoría de los casos la búsqueda de amebas en muestras clínicas no es considerada en los diagnósticos diferenciales iniciales, además de que los tratamientos para erradicarlas no han resultado ser efectivos en la mayoría de los casos (Omaña, 1997).

Por otra parte existen numerosos estudios *in vitro* que documentan la multiplicación de bacterias del género *Legionella* en AVL y otros protozoos. Se cree que las AVL sirven como células del huésped para la replicación intracelular de ciertas especies de *Legionella* en una variedad de entornos ambientales (Newsome *et al.*, 1998; Visvesvara *et al.*, 2007; Reinares y Ferrer, 2008).

La bacteria *Legionella pneumophila* es el agente responsable de la enfermedad de los legionarios y de la fiebre de Pontiac. La enfermedad de los legionarios es una infección adquirida generalmente por la inhalación o aspiración de legionelas a partir de diversas fuentes de agua contaminada. La enfermedad produce una neumonía severa que generalmente se reporta como brotes epidémicos con más de 10 000 casos por año en los Estados Unidos (CDC, 1997).

1. Amebas de vida libre (AVL)

Las AVL son un pequeño grupo de protozoos de importancia médica y ecológica, son cosmopolitas pues se les encuentra en toda la biósfera, incluyendo los casquetes polares, el suelo, el agua y la atmósfera (Rivera *et al.*, 1987). Las temperaturas elevadas favorecen su proliferación por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales, naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales (De Jonckheere, 1977).

Se han aislado AVL en cuerpos de agua naturales y artificiales por lo que pueden constituir una amenaza de infección, se considera que la ruta de invasión puede ser a través de la cavidad nasal, oral, mucosa o piel lesionada. Se sabe también que debido a sus propiedades termófilas, el riesgo de adquirir una infección por amebas de vida libre es más alto en agua caliente (Górnik y Kúzna-Grygiel, 2004).

Debido a que estas amebas tienen la capacidad de existir como organismos de vida libre en la naturaleza e invadir a un huésped y vivir como parásitos en el tejido de este, también se han llamado amebas anfizóicas (del griego *amphi*, que significa de ambos lados) (Visvesvara *et al.*, 2007), término introducido por Page en 1976, así se diferencia la fase exozóica como el periodo del ciclo de las amebas correspondiente a la vida libre, de la fase endozóica o parasita cuando llegan a invadir el tejido corneal, tejido prostático, vaginal o el sistema nervioso central (SNC), entre otros (Omaña, 1997).

El estudio de las AVL ha demostrado que solo un grupo restringido provoca infecciones humanas incluyendo a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Hartmannella* (John, 1993; Visvesvara, 1993), se considera que las cepas más patógenas pertenecen principalmente a *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria fowleri* y de acuerdo a los informes más recientes también a *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea* y *Sappinia pedata* (Górnika y Kúzna-Grygiel, 2004).

2. Antecedentes de las AVL

En el año de 1899, los investigadores descubrieron la capacidad que tenía una ameba de transformarse en flagelo y la llamaron *Amoeba gruberi* y el nombre del género *Naegleria* se propuso mucho más tarde por Alexeieff en 1912 (De Jonckheere, 2002).

En 1913 Puschkarew aisló una ameba del polvo y la nombró *Amoeba polyphagus*, más tarde en 1930 Castellani aisló e identificó una ameba que se produjo como un contaminante en un cultivo de levadura en una placa, y más tarde la nombró *Acanthamoeba castellanii* (Visvesvara *et al.*, 2007).

La denominación genérica de *Acanthamoeba* fue creada por Volkonsky en 1931 y en 1967 Page redescubrió la ameba denominada *Amoeba polyphagus* por Puschkarew como *Acanthamoeba polyphaga* (Visvesvara *et al.*, 2007).

Desde hace más de 50 años se reconoce que las AVL son capaces de causar enfermedad en el hombre; estos microorganismos eran considerados inocuos y se pensaba que podían formar parte de la microbiota comensal de los mamíferos (Cuevas *et al.*, 2006).

Las investigaciones llevadas a cabo por Culbertson en 1958, fueron determinantes para que a este grupo de protozoos se le tomase en cuenta. Al realizar pruebas rutinarias de seguridad de la vacuna de la polio en cultivos celulares de riñón, se percató de que algunas placas presentaban un cultivo citopático y consideró que el virus era el responsable. Con el contenido de las placas inoculó a ratones por vía intranasal e intracerebral los cuales en pocos días murieron a consecuencia de meningoencefalitis. Los estudios histopatológicos de los órganos afectados y de las placas mismas revelaron la presencia de organismos ameboideos, que más adelante fueron identificados como *Acanthamoeba castellanii*, una ameba de vida libre muy común en la naturaleza. Culbertson sugirió el potencial patógeno de estas amebas de vida libre. El hallazgo más significativo fue referido a la capacidad de estos protozoos de invadir la mucosa nasal de organismos sanos, de migrar hacia el cerebro y producir una patología en el SNC con consecuencias fatales (Visvesvara *et al.*, 2007).

En los años sesenta *Naegleria* se estudió principalmente como un modelo para la transformación, porque las amebas fácilmente se convierten en flagelados. Sin embargo, el género atrajo mucho más la atención, especialmente en el mundo de la biomedicina cuando se descubrió que algunos aislados de *Naegleria* podían causar una infección cerebral fatal en seres humanos (De Jonckheere, 2002).

Fowler y Carter en 1965, en Australia reportaron los cuatro primeros casos de infección amebiana en humanos, denominada como meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) aunque con sorpresa se identificó a una ameba del género *Naegleria* como la responsable del daño y no una del género *Acanthamoeba* como se pensó en un principio (Shin e Im, 2004). El nombre de *N. fowleri* fue propuesto por Malcolm Fowler, que reconoció por primera vez la enfermedad en Australia (De Jonckheere, 2002).

Desde 1965, cuando la MEAP fue descrita por primera vez en Australia un total de 49 casos han sido reportados en Estados Unidos a partir de diciembre de 1980. *Naegleria fowleri* se ha aislado de los lagos y ríos de Florida y de depósitos artificiales en Texas donde han informado que más del 50 % de los lagos de agua dulce en Florida fueron positivos a *N. fowleri* con temperaturas registradas de 30 °C o más (Sykora *et al.*, 1983).

Entre octubre de 1970 y octubre de 1972 cuatro casos de MEAP se diagnosticaron en la ciudad de Amberes, Bélgica en niños de entre 11 y 14 años de edad, como antecedente se reportó que los niños habían nadado en piscinas. Un nuevo caso de MEAP fue diagnosticado en Bélgica sólo seis meses después en un niño que había nadado en un arroyo que recibió agua de una fábrica metalúrgica, y se demostró la presencia de *N. fowleri* en las aguas de refrigeración (De Jonckheere, 2002).

Se reportó en 1972 la primera infección humana por *Acanthamoeba* descrita por Jager y Stamm (Schuster y Visvesvara, 2004).

De Jonckheere *et al.* (1974) aislaron patógenos de *N. fowleri* de un canal de agua donde un niño contrajo MEAP en 1973. Este canal recibió efluente caliente de una fábrica de plomo y zinc en Bélgica (Sykora *et al.*, 1983).

En ese mismo año, 1974, se reportaron los primeros casos de queratitis causada por *Acanthamoeba* que fueron diagnosticados por Naginton y colaboradores en el Reino Unido. La ameba produjo una ulceración crónica y progresiva en la córnea de uno de los pacientes afectados y fue necesario remover quirúrgicamente el ojo infectado del otro paciente. En ambos casos se aisló e identificó a *A. polyphaga* y *A. castellanii* respectivamente (Schuster y Visvesvara, 2004).

La taxonomía del grupo entre las AVL patógenas se actualizó a nivel genérico en 1967 con la clave taxonómica de Page que se publicó en 1976. Se determinó que el género *Naegleria* pertenece a la familia Vahlkampfiidae, mientras que el género *Acanthamoeba* se incorporó a la familia Acanthamoebidae y en 1977 se reconocen tres grupos dentro del género *Acanthamoeba* basándose en las diferencias de tamaño y en características morfológicas de los quistes (Shin e Im, 2004).

En 1977 se registraron cinco casos de MEAP asociados con la natación en los lagos de agua dulce en Florida, y durante los últimos 14 años se ha demostrado la presencia de la ameba *N. fowleri* en lagos de Florida según datos epidemiológicos acumulados en cinco de las siete muertes por MEAP de los casos que ocurrieron en el estado desde 1962. Y ese mismo año, 1977, Butt describió el aislamiento de las amebas patógenas de un lago en el área de Orlando que se consideró la fuente de infección de MEAP en dos de los casos (Wellings *et al.*, 1977).

Las infecciones por *Acanthamoeba* se caracterizaron como infecciones oportunistas por Martínez en 1980, quien reconoció su incidencia en pacientes inmunocomprometidos, debilitados o enfermos crónicos (Schuster y Visvesvara, 2004).

En el año de 1997 en San Antonio Texas, se realizó un informe en el cual se ilustró la necesidad de implementar una estrategia para la evaluación de los beneficios y riesgos de los trasplantes de órganos y tejidos a pacientes. Se presentó en 1995 el primer caso registrado de trasplante de órganos de un niño de 11 años que había muerto al diagnosticarle una infección por *N. fowleri* al haber sido receptor de un órgano (Kramer *et al.*, 1997).

En 2002, se reportó en India un caso de MEAP en un niño que había practicado la natación en agua artificial. Basándose en su capacidad de crecer a temperaturas superiores a 30 °C, la morfología de los trofozoítos, y la presencia de formas flageladas, la ameba fue identificada como *N. fowleri*. Las amebas patógenas de *N. fowleri* fueron recuperadas de las muestras de agua. Este fue el primer caso diagnosticado de MEAP que se informó en Mangalore, India (Shenoy *et al.*, 2002).

Muñoz *et al.* (2003) en Santiago de Chile determinaron la presencia de AVL en muestras de agua obtenidas a partir de ocho piscinas públicas, se realizaron 64 muestras en total. Las amebas fueron localizadas en cinco piscinas (62 %). Los géneros aislados se identificaron como *Hartmannella vermiformis* (12.5 %); *Vanella* sp. (9.4 %); *Naegleria* y *Acanthamoeba*. El 36 % de las cepas aisladas pertenecían a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*.

Se reportó el primer caso de MEAP en Italia en el año 2004, en un niño de 9 años de edad. El curso clínico fue fulminante, y el diagnóstico fue realizado mediante la identificación de la ameba en las secciones del cerebro por análisis de inmunofluorescencia indirecta, *N. fowleri* se caracterizó como genotipo I, sobre la base de la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Hasta el año 2004, se han reportado aproximadamente 200 casos en todo el mundo (Cogo *et al.*, 2004).

En el año 2006, en Chile se diagnosticó un caso de encefalitis por *Balamuthia* de una niña que presentó lesiones cutáneas en la parte central de la cara. La biopsia de piel reveló lesión granulomatosa con PCR positiva para *Mycobacterium*. Se comenzó tratamiento para micobacteriosis atípica extrapulmonar. Sin embargo, la niña presentó una recaída seis meses más tarde, con afectación neurológica progresiva, muriendo alrededor de un año después de la aparición de los síntomas cutáneos. El cerebro de la autopsia reveló la presencia de quistes y trofozoítos de *B. mandrillaris* (Cuevas *et al.*, 2006).

3. Antecedentes en México de las AVL

Rivera *et al.* (1979) realizaron un estudio morfológico y ecológico cuantitativo de la contaminación del agua por protozoos en la Ciudad de México, entre las especies detectadas sólo los pertenecientes a la familia Vahlkampfiidae y Hartmanellidae podrían tener efectos patógenos en los seres humanos. Sin embargo, las especies que se identificaron denotaron un alto grado de contaminación orgánica de las aguas supuestamente potables del Distrito Federal.

En 1984 se informó el primer caso de MEAP en Monterrey, Nuevo León, México, de un paciente que logró sobrevivir con un tratamiento de anfotericina B, una muestra de líquido cefalorraquídeo (LCR) teñida con el colorante de Gomori sirvió para demostrar las características morfológicas de *N. fowleri* así como ayudar a su identificación (Rodríguez-Pérez, 1984).

Rivera *et al.* (1989) realizaron un estudio en tres balnearios de aguas termales en Tecozautla, Hidalgo. Las muestras fueron concentradas por filtración y centrifugación e inoculadas en medios monoxénicos y axénicos. La identificación de las cepas se realizó por la morfología e isoelectroenfoco de isoenzimas y proteínas totales. Se identificaron cepas pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Willaertia*.

López-Corella *et al.* (1989) en Huetamo, Michoacán, publicaron un caso de un joven de 13 años de edad que falleció al tercer día de un cuadro de rápida evolución, la autopsia reveló una meningoencefalitis con necrosis parenquimatosa de estructuras basales y de fosa posterior, se localizaron numerosos trofozoítos de *Naegleria* en las lesiones y fueron identificados como *N. fowleri* por inmunohistoquímica.

Más tarde Lares-Villa *et al.* (1993) aislaron por primera vez en México la ameba *N. fowleri* de pacientes con MEAP en Mexicali, México. Se aislaron cinco cepas de pacientes y una cepa aislada del agua de un canal artificial. Todas las cepas resultaron patógenas para los ratones que se inocularon por vía intranasal y mostraron un efecto citopático en los cultivos celulares, los resultados serológicos, y los patrones de isoenzimas permitieron identificar a las 6 cepas de *N. fowleri*.

Calderón (2008), realizó un programa de muestreo en los canales de riego del Valle de Mexicali en Baja California, México en busca de AVL debido a que se presentaron dos brotes con 12 casos en una población de jóvenes cuyo antecedente solo fue haber nadado en los canales de riego. De los aislados se identificaron los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Willaertia*. Se detectó *N. fowleri* y se determinó que estas cepas podrían estar implicadas en los casos de MEAP ya que las cepas resultaron virulentas en animales de experimentación.

4. Infecciones amebianas en humanos

Las AVL pertenecientes a los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* causan enfermedades del SNC. Clásicamente se describen dos entidades clínicas:

El género *Naegleria* y en particular *N. fowleri* responsable de MEAP, se comporta como una enfermedad necrosante, aguda y fulminante, que en la mayoría de los casos produce la muerte en un plazo de tres a siete días.

El género *Acanthamoeba* responsable de encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) enfermedad subaguda o crónica, que puede provocar la muerte en un plazo que varía entre una semana y un año y la queratitis amebiana (QA), que produce una infección en el tejido corneal (Cuevas *et al.*, 2006).

Las especies de *Acanthamoeba* asociadas a casos clínicos que se han reportado son: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. palestinensis*, *A. healyi*, *A. divionensis* y *A. rhyssodes* (Visvesvara *et al.*, 2007).

En los últimos años, *S. diploidea* otra ameba de vida libre, que habita normalmente en suelos contaminados con heces de alces, bisontes y ganado, fue identificada como causante de encefalitis en un joven lo que indica que hay probablemente otras amebas que son capaces de causar encefalitis en humanos (Visvesvara *et al.*, 2007).

a) Meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP)

La MEAP es una enfermedad que tiene como agente causal a *N. fowleri*, esta ameba afecta al SNC y provoca una enfermedad fulminante, necrotizante y hemorrágica que conduce a la muerte, la mayoría de los casos ocurren durante el verano (Visvesvara *et al.*, 2007), por lo general ocurre en personas sanas, niños y adultos jóvenes inmunocompetentes con antecedentes de contacto reciente con agua contaminada (Goswick y Brenner, 2003). La mayoría de las infecciones se han asociado con el baño en arroyos, lagunas, lagos y piscinas, donde el agua presenta temperaturas elevadas (Shenoy *et al.*, 2002).

La ameba *N. fowleri* entra en la cavidad nasal mediante aspiración de agua o la inhalación de polvo contaminados con trofozoítos o quistes. Puede invadir el SNC a través del olfato y neuroepitelio, y clínicamente se asemeja a la meningitis bacteriana aguda (Kramer *et al.*, 1997).

Si bien hay seis especies del género, *N. fowleri* es el patógeno humano más importante, produciendo MEAP, *Naegleria australiensis* puede ser patógena, en menor medida. Hasta la fecha, se han diagnosticado más de 192 casos de la enfermedad en todo el mundo y más de 64 casos en Estados Unidos (Marshall *et al.*, 1997). Se ha demostrado también que *N. australiensis* y *Naegleria italica* pueden causar infecciones en ratones, pero nunca han sido aisladas a partir de infecciones en humanos (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

La infección puede ocurrir cuando las amebas entran en las fosas nasales, se adhieren a la mucosa olfativa y migran a través de la lámina cribiforme e ingresa al SNC (Goswick y Brenner, 2003). Una vez en los bulbos olfatorios del cerebro, las amebas se dividen rápidamente causando inflamación, hemorragia y necrosis, lo que ocasiona la muerte

(Rocha-Azevedo *et al.*, 2009). La mortalidad entre los pacientes con MEAP es superior al 95 %. Este pronóstico es grave debido a la rápida progresión de la enfermedad y al retraso en el diagnóstico (Goswick y Brenner, 2003).

a. Síntomas de la MEAP

No hay factores predisponentes necesarios para que estas infecciones humanas se desarrollen. Después de un periodo de dos a siete días de incubación, los síntomas de MEAP son evidentes. El comienzo es brusco con rapidez progresiva, al inicio se presentan dolores de cabeza, fiebre, náuseas y vómitos, faringitis y obstrucción nasal. Los síntomas persisten y se presenta letargo, confusión, rigidez en el cuello, convulsiones, puede ocurrir un deterioro progresivo hasta llegar a un coma y la muerte en el lapso de cuatro a seis días. Otros síntomas también incluyen alteraciones del gusto y del olfato, ataxia, rigidez de nuca, fotofobia, aumento de la presión intracraneal y también se pueden presentar anomalías craneales (Marshall *et al.*, 1997).

b. Diagnóstico para la MEAP

Debido a que la mayoría de las infecciones causadas por estas amebas son en última instancia fatales, el diagnóstico se hace a menudo *post mortem*, los países desarrollados cuentan con los medios necesarios para el diagnóstico. Sin embargo, en África y el Sudeste de Asia, donde el VIH/SIDA se ha propagado de una manera elevada, es muy posible que un gran número de casos no hayan sido detectados. Esto es por varias razones, entre ellas, la falta de conocimiento necesario para identificar estas amebas, el gasto que implica realizar las autopsias, y un número elevado de pacientes con enfermedades como el VIH/SIDA, tuberculosis y malaria, la incidencia real de la enfermedad por lo tanto no se sabe realmente (Visvesvara *et al.*, 2007).

La MEAP es una enfermedad rara, pero casi siempre mortal. Por lo tanto, el diagnóstico precoz es importante para iniciar el tratamiento. Entre los métodos comúnmente empleados para diagnosticar la MEAP se encuentran:

🚦 Métodos de imagen.

Se realiza una tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética (RM), sin embargo estas pruebas aunque muestran las lesiones, se consideran inespecíficas (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

🚦 Métodos microscópicos.

El diagnóstico *pre mortem* es raro, pero se puede obtener LCR del paciente. El LCR puede ser purulento, y cuando las bacterias no son encontradas, la meningoencefalitis amebiana debe ser considerada. El LCR es turbio y ligeramente hemorrágico, se puede observar en fresco, ya que este contiene amebas móviles que pueden ser reconocidos con microscopía óptica. Si en el LCR no se detectan las amebas, pueden también ser identificadas por tinción de las preparaciones fijadas con Wright, Giemsa o hematoxilina y eosina. Aunque la tinción de Gram se utiliza en los laboratorios clínicos para la detección de las bacterias en el LCR, la tinción de Gram no es útil para el diagnóstico de

amebas, ya que no representa la característica nuclear y morfología de las amebas (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Nagleria fowleri se puede distinguir de otras AVL que causan infecciones del SNC por que las amebas se pueden transformar en formas flageladas cuando se colocan en agua (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las técnicas moleculares están ahora disponibles en los laboratorios de investigación, pero estos métodos generalmente no están disponibles en la mayoría de los laboratorios clínicos. Se ha desarrollado la técnica de PCR para la detección de *N. fowleri* en muestras clínicas y ambientales (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Un diagnóstico de MEAP se debe sospechar en todos los casos de meningoencefalitis purulenta en la que no se localicen bacterias. Las amebas pueden ser vistas en el LCR que aparece turbio y ligeramente hemorrágico con aumento del número de eritrocitos y leucocitos, sobre todo neutrófilos polimorfonucleares. No es posible observar quistes de *N. fowleri* en LCR, ya que la infección es rápidamente fatal y el paciente muere antes de que los trofozoítos pueden enquistarse (Marshall *et al.*, 1997).

c. Tratamiento para la MEAP

De los medicamentos que han sido evaluados para la MEAP, la anfotericina B, un fármaco antimicótico, es el único agente con eficacia clínica establecida. Los estudios han demostrado *in vitro* e *in vivo* la eficacia de la anfotericina B sobre varias cepas de *N. fowleri* y pacientes con MEAP han sido tratados con éxito con anfotericina B sola o en combinación con otras drogas.

Aunque la anfotericina B sigue siendo la primera opción para el tratamiento de MEAP, su uso es frecuentemente asociado a la toxicidad renal, se manifiesta como azotemia e hipopotasemia. La anfotericina B a menudo causa anemia, y muchos pacientes experimentan escalofríos, fiebre, náuseas, vómitos, y dolor de cabeza (Goswick y Brenner, 2003). La supervivencia del paciente depende del conocimiento inicial del organismo patógeno y la interpretación de laboratorio preciso de LCR en fresco (Marshall *et al.*, 1997).

Por otra parte la anfotericina B y el fluconazol administrado por vía intravenosa seguido por rifampicina oral resultó un éxito en el tratamiento de un niño que desarrollo MEAP. Aunque otros autores han sugerido que una triple combinación de dosis bajas de anfotericina B administrada por vía intravenosa con rifampicina oral y ketoconazol oral, daría lugar a un resultado más favorable.

La azitromicina también ha demostrado ser eficaz contra *N. fowleri in vitro* (cultivos celulares) e *in vivo* (en un modelo de un ratón infectado) (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

b) Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) y Queratitis amebiana (QA)

Las amebas *Acanthamoeba* y *Balamuthia* se consideran los agentes causales de la EAG sobre todo en pacientes inmunodeprimidos (Visvesvara *et al.*, 2007) y se consideran parásitos oportunistas en los seres humanos y otras especies de mamíferos (Shadrach *et al.*, 2005).

La EAG es otra infección también fatal, pero de curso clínico subagudo o crónico, esta infección ocurre por lo general en individuos crónicamente enfermos y debilitados, bajo tratamiento inmunosupresivo o con antibióticos de amplio espectro. Las lesiones en el SNC se caracterizan por una encefalitis crónica, granulomatosa con células gigantes con trofozoítos y quistes (Martínez y Amado-Ledo, 1979).

Cuadro 1. Factores de predisposición y enfermedades asociadas con infecciones por *Acanthamoeba* spp. (Tomado de Gallegos, 1997; Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Factores de predisposición	Enfermedades asociadas
Embarazo	SIDA
Alcoholismo	Diabetes mellitus
Quimioterapia	Falla renal crónica
Diálisis peritoneal	Otitis y faringitis
Trasplantes	Neumonía
Tratamiento con antibióticos	Lupus eritematoso sistémico
Otros parásitos	Cirrosis y hepatitis
Úlceras de la piel	Cáncer
Infarto cerebral	

Además de causar infecciones del SNC, en pulmones y piel *Acanthamoeba* también causa una enfermedad que amenaza la visión, la queratitis amebiana (Visvesvara *et al.*, 2007).

A diferencia de la EAG, que es una infección crónica, la QA es una infección aguda y dolorosa que puede ocurrir en individuos sanos e inmunocompetentes. Esta enfermedad está relacionada con la utilización de lentes de contacto o un traumatismo corneal anterior (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

La enfermedad cutánea se caracteriza por la presencia de nódulos o úlceras en la piel. Las manifestaciones de la acantamebiosis cutánea se convierten en úlceras que no cicatrizan (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Las lesiones cutáneas causadas por *Acanthamoeba* se ha reportado con mayor frecuencia en los pacientes VIH positivos. Las manifestaciones cutáneas de la infección son la presencia de numerosos nódulos eritematosos, pápulas o úlceras a lo largo del cuerpo del paciente (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

El examen histológico de las lesiones cutáneas generalmente muestra focos de necrosis rodeados por células inflamatorias. Sin embargo, el aspecto histológico de las lesiones cutáneas puede confundirse con la de los hongos o virus (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

a. Síntomas de la EAG y de la QA

Cuadro 2. Signos y Síntomas de Infecciones por *Acanthamoeba* spp. (Tomado de Rocha- Azevedo *et al.*, 2009).

Encefalitis amebiana granulomatosa (SNC)	Queratitis amebiana (ojos)
Dolor de cabeza	Enrojecimiento ocular
Fiebre leve	Lagrimeo
Alteraciones del estado mental	Visión borrosa
Convulsiones	Dolor ocular
Rigidez de cuello	Irritación en la córnea
Irritabilidad	Fotofobia
Náusea y vómito	Pérdida del epitelio corneal
Hemiparesia	Hiperemia conjuntival
Disminución del nivel de la conciencia	
Parálisis del nervio craneal	
Alucinaciones	
Ataxia	
Diplopia	
Trastornos del sueño	
Anorexia	
Síndrome de Babinski	
Síndrome de Kerning	

Debido a que los signos clínicos de la EAG no son específicos, la enfermedad puede ser diagnosticada a menudo como bacteriana, leptomeningitis, meningitis tuberculosa, encefalitis viral, toxoplasmosis, infecciones por hongos, neurocisticercosis, o un tumor cerebral (Rocha- Azevedo *et al.*, 2009).

Cuando la QA no es tratada rápidamente se puede presentar pérdida de la agudeza visual hasta la ceguera. La córnea presenta por lo general erosión epitelial, irregularidades y edemas. Las etapas posteriores de la infección pueden dar lugar a denudación epitelial y necrosis estromal (Rocha- Azevedo *et al.*, 2009).

Varias especies de *Acanthamoeba*, incluyendo *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. griffini* y *A. lugdunensis* han sido descritas hasta ahora como causantes de la QA (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

b. Diagnóstico para la EAG

Entre los estudios que pueden realizarse para diagnosticar la EAG se cuenta con lo siguiente:

- ✚ Métodos de imagen.

Los métodos de imágenes cerebrales, como la TC y la RM, se han utilizado para visualizar las lesiones cerebrales causadas por *Acanthamoeba*, pero las lesiones por sí mismas no son específicas para el diagnóstico. Se pueden observar mediante TC

lesiones multifocales de baja densidad en ambas regiones corticales y subcorticales del cerebro (Rocha- Azevedo *et al.*, 2009).

La TC generalmente muestra la presencia de la hidrocefalia progresiva, con engrosamiento de las meninges, lesiones pseudotumorales, grandes lesiones aisladas o múltiples, lesiones ovoides, lesiones multifocales y edema. Las lesiones son comúnmente observadas en los pacientes por RM (Rocha- Azevedo *et al.*, 2009).

Métodos microscópicos.

El diagnóstico definitivo de la EAG es la detección y aislamiento de la ameba en el tejido. Para lograr la detección de quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba* en el tejido cerebral, lesiones de la piel, o LCR, se utiliza la microscopía electrónica. Las amebas también pueden ser detectadas en preparaciones de LCR en fresco o en tinciones de Giemsa. Para el diagnóstico de acantamebiosis cutánea, se utiliza básicamente la microscopía óptica.

La microscopía electrónica de transmisión (MET) también puede ser utilizada como una herramienta para diferenciar los quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba* de las células del huésped y de otras amebas, como por ejemplo *B. mandrillaris*. Sin embargo, esta técnica tiene costos elevados, la preparación de la muestra requiere de tiempo y requiere personal con experiencia (Rocha- Azevedo *et al.*, 2009).

c. Diagnóstico para la QA

El diagnóstico de la QA puede llevarse a cabo mediante el análisis de la córnea y por la demostración de amebas en la misma. El examen microscópico de la biopsia y la identificación en muestras de LCR y los raspados de córnea han sido utilizados en el laboratorio clínico. Los métodos que se utilizan para diagnosticar la QA son los siguientes:

Métodos microscópicos.

La detección de *Acanthamoeba* se puede lograr mediante el análisis microscópico de una biopsia de córnea. Éste método es eficaz y no invasivo para aislar y diagnosticar las amebas. La tinción Giemsa también se ha utilizado con éxito para detectar los trofozoítos y quistes de *Acanthamoeba*. Los quistes y trofozoítos son también fácilmente detectables por MET (Rocha- Azevedo *et al.*, 2009).

Reacción en cadena de la polimerasa.

Por otra parte, la PCR es un método eficiente para detectar *Acanthamoeba* en muestras de lágrima, un modo no invasivo para realizar diagnósticos de QA. Los ensayos de PCR han sido desarrollados también para la identificación de las mismas. Las pruebas por PCR múltiple están diseñadas para la identificación rápida de estos patógenos en tejidos de córnea y LCR, así como muestras de córnea (Rocha- Azevedo *et al.*, 2009).

d. Tratamiento para la EAG y la QA

Tal como sucede en las infecciones por *N. fowleri*, no existe un tratamiento satisfactorio para la EAG, ya que generalmente la mayoría de las infecciones se diagnostican *post mortem*. Sin embargo existen tres reportes de personas que se han recuperado de infección del SNC, utilizando medicamentos como ketoconazol, penicilina, cloranfenicol y sulfametazina. Las amebas aisladas de estos pacientes fueron: *Acanthamoeba palestinensis*, *Acanthamoeba culbertsoni* y *Acanthamoeba rhyssodes* respectivamente (Gallegos, 1997).

Ensayos *in vitro* sugieren que la polimixina B y E, la sufadiazina, el trimetoprim/sulfametoxazol son drogas altamente activas contra *Acanthamoeba* (Gallegos, 1997).

Los medicamentos que se han utilizado para el tratamiento de la acantamebiosis cutánea incluyen itraconazol, pentamidina, gluconato de clorhexidina y ketoconazol en crema (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Los fármacos que han sido utilizados con éxito para la QA son: itraconazol, ketoconazol, miconazol, isotianato de propamidina y trobamicina (Omaña, 1997).

La tasa de mortalidad reportada de la infección cutánea de los individuos sin afectación del SNC es de aproximadamente 73 %, mientras que de la infección cutánea acompañada por la enfermedad del SNC es del 100 % (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

5. Infecciones por *Acanthamoeba* en pacientes con VIH/SIDA

El primer caso reportado de infección por *Acanthamoeba* en un paciente con SIDA fue en 1986. Desde entonces, un aumento de número de casos de infecciones diseminadas por *Acanthamoeba* se han reportado en personas con SIDA. La mayoría de estos han sido diagnosticados *post mortem*. El curso clínico puede ser fulminante, con progresión rápida a muerte. La mayoría de los pacientes mueren en menos de 1 mes después del inicio de síntomas neurológicos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Otras manifestaciones frecuentes de las infecciones por *Acanthamoeba* en personas VIH positivas son la sinusitis crónica, otitis, y lesiones cutáneas. Debido a que otras infecciones oportunistas ocurren en pacientes con SIDA, las producidas por *Acanthamoeba* son a menudo pasadas por alto. De hecho, los pacientes con síntomas de EAG han sido diagnosticados empíricamente con toxoplasmosis, aunque las pruebas serológicas para toxoplasma pueden ser negativas (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

6. Clasificación de las principales especies patógenas de *Acanthamoeba*

Actualmente las clasificaciones de más de 24 especies de *Acanthamoeba* se han basado en criterios morfológicos. Estas especies son asignadas a tres grupos distintos en función de su morfología y el tamaño del quiste. De acuerdo a Visvesvara *et al.*, 2007 y Marciano-Cabral y Cabral, 2003, las características generales de los tres grupos que conforman el género son:

Grupo I

Se compone por especies que se caracterizan por tener quistes grandes, que van en tamaño de 16 a 30 μm . La pared interior o exterior del quiste está separada entre sí y solo se juntan por una extensión a través de los brazos o rayos que presenta. No se considera este grupo muy relevante debido a que carece de representantes patógenos.

Grupo II

Compuesto por el mayor número de especies, con quistes que miden alrededor de 18 μm o menos. El endoquiste tiene una forma estrellada, poligonal, triangular u ovalada, de manera que las dos capas se juntan en las esquinas más que en los brazos del endoquiste, el exoquiste presenta una forma más o menos redondeada y rugosa.

Son las más abundantes en la naturaleza. A este grupo pertenecen las formas de mayor importancia médica como *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*.

Grupo III

También se compone de especies con quistes con un diámetro de 18 μm o menos, pero con diferencias en la morfología del quiste. El exoquiste es muy delgado, el endoquiste es más o menos redondeado y no presenta brazos.

La agrupación de las especies basándose en la morfología, no es confiable, debido a las variaciones en la morfología de los quistes (Visvesvara *et al.*, 2007).

7. Ciclos de vida

Las AVL incluyen al menos dos etapas de desarrollo: 1) un estadio de trofozoíto, que es la forma en la que se alimenta y reproduce, en la cual se llevan a cabo los procesos metabólicos básicos; 2) una fase quística como forma de resistencia, cuando las condiciones del medio son desfavorables. Algunas amebas, como *Naegleria* spp., presentan un estadio flagelar.

a) ***Naegleria fowleri***. Existen tres etapas para el ciclo de vida de *N. fowleri*: El trofozoíto, el ameboflagelado, y el quiste. Los trofozoítos son la forma infectiva, estos son activos y por lo general alargados, su citoplasma es granular y contiene vacuolas, se alimentan de bacterias como *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes*. La etapa flagelada es en forma de pera y son móviles, finalmente, vuelve a la fase trófica. Los quistes son generalmente esféricos, lisos de pared doble y refractantes, de unos 10 μm de diámetro. Las condiciones ambientales pueden causar que los organismos se enquisten (Gallegos, 1997). Las puertas de entrada para la infección humana son el olfato, neuroepitelio y los conductos nasales que suelen estar en contacto a la etapa flagelar durante el período de natación en los baños calientes o termales. La infección también puede ocurrir por la inhalación de quistes infecciosos presentes en el polvo o partículas del suelo. Una vez que el organismo ha inhalado quistes, se produce la exquistación y posteriormente el trofozoíto penetra en la nasofaringe o mucosa y emigra a los nervios olfatorios e invade el cerebro a través de la placa cribosa. No es posible observar quistes de *N. fowleri* en LCR, ya que la infección es rápidamente fatal y el paciente muere antes de que los trofozoítos puedan enquistarse (Marshall *et al.*, 1997).

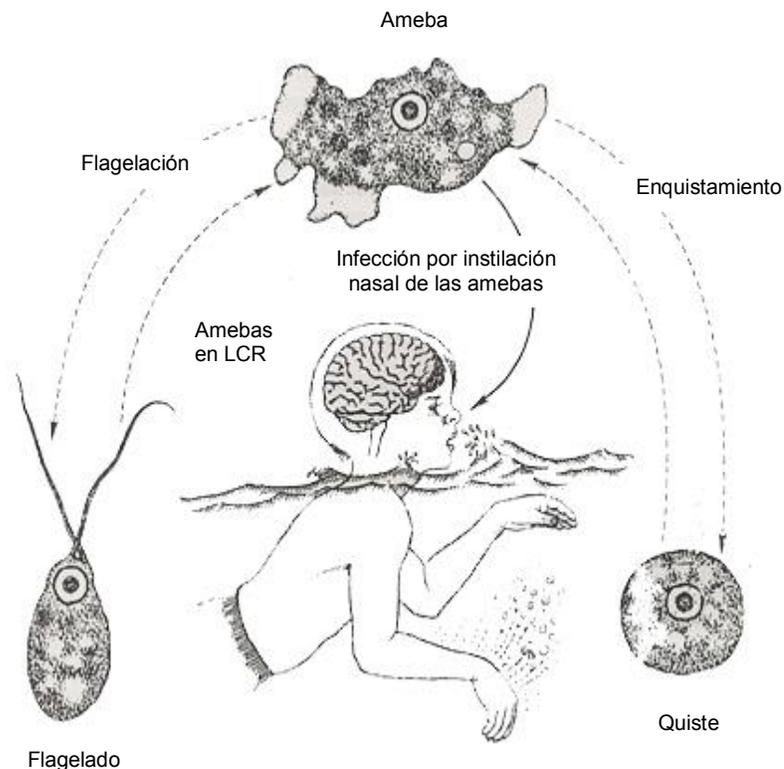


Figura 1. Ciclo de vida de *N. fowleri* en infección humana (Tomada de John, 1993)

b) *Acanthamoeba* spp.

El género *Acanthamoeba* tiene dos formas morfológicas en su ciclo de vida, un trofozoíto y un quiste. Ambas etapas se pueden encontrar en los tejidos de los seres humanos infectados y en el ambiente.

El trofozoíto es la forma en que se divide y se cree que es la fase infecciosa. Los quistes son inactivos y protege a las amebas de ambientes nocivos (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

El trofozoíto varía en tamaño desde 25 hasta 40 μm , se alimenta de bacterias, algas, levaduras y otros protozoos de menor tamaño presentes en el ambiente. La reproducción se produce por fisión binaria. El quiste presenta una doble pared, con un tamaño de 13 a 20 μm . La formación de quistes se produce debido a condiciones ambientales adversas, tales como la privación de alimentos, la desecación, los cambios en la temperatura y el pH. Los quistes son resistentes a los biocidas, cloración y antibióticos y sobreviven a temperaturas de 0 a 2 $^{\circ}\text{C}$ (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). La ruta de la infección se cree que es por inhalación de amebas a través de la nariz o a través de lesiones de la piel. El acceso al SNC es por diseminación hematológica (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

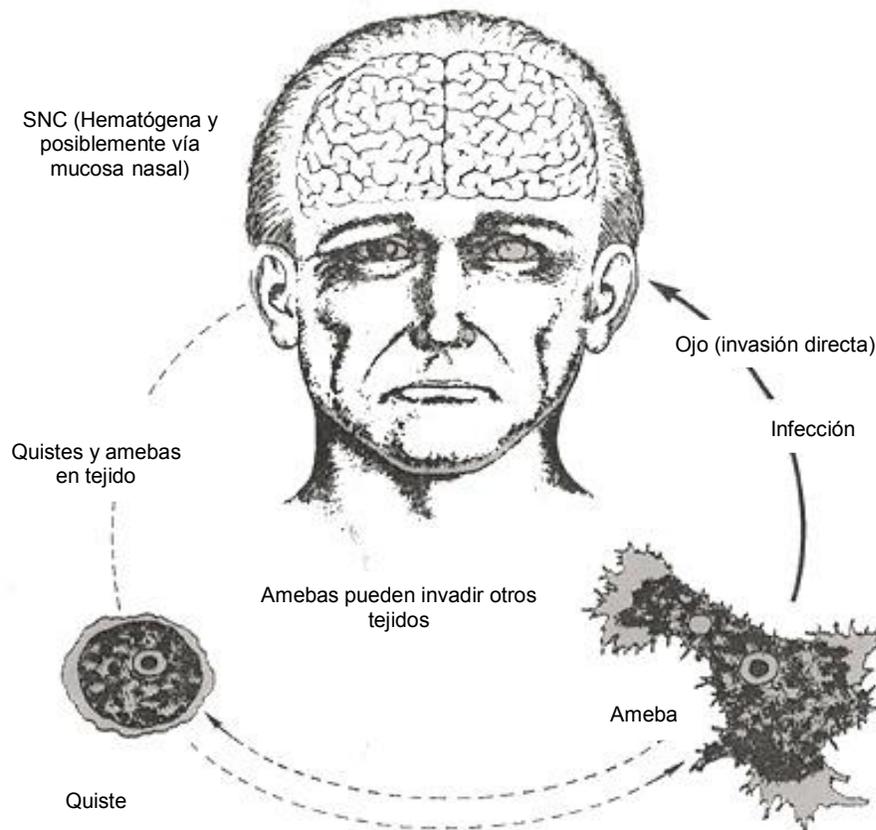


Figura 2. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. (Tomada de John, 1993).

8. Ecología de *Naegleria* spp. y *Acanthamoeba* spp.

La ameba *Naegleria* spp. se distribuye por todo el mundo en arroyos contaminados térmicamente, ya que toleran temperaturas de 40 a 45 °C, también se puede encontrar en las aguas costeras, el agua potable, aguas residuales, calefacción y unidades de ventilación, piscinas artificiales mal cloradas, lagos y agua caliente cerca de orificios de descarga de plantas de energía. Se encuentra en mayor número en las aguas contaminadas con coliformes. Además, algunas especies de *Naegleria* interactúan con la bacteria *Legionella* spp. y se cree que desempeñan un posible papel en la difusión de *Legionella* en el agua (Marshall *et al.*, 1997).

Acanthamoeba spp. es la ameba más común y se considera uno de los protozoos más comunes que se encuentran en el aire, suelo y en las muestras de agua incluyendo agua de uso doméstico (Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

Su distribución es cosmopolita y se ha aislado de una amplia variedad de hábitats, incluyendo aguas dulces, salobres, marinas, residuales, y los suelos que van desde los tropicales hasta las regiones árticas.

También se ha aislado de acuarios, humidificadores, grifos de agua, polvo, estanques de agua mineral, soluciones para lentes de contacto, calefacción, ventilación o aire acondicionado, baños de hidroterapia, tinas calientes y se ha recuperado del ambiente hospitalario en duchas, unidades dentales y máquinas de diálisis (Schuster y Visvesvara, 2004).

9. AVL como hospederos de microorganismos

Las AVL frecuentemente se encuentran también en biopelículas y se consideran portadoras de otros microorganismos patógenos (por ejemplo, *Legionella* spp., *Salmonella* spp., *Cryptosporidium* spp., *Vibrio cholerae*, *Parachlamydiae* y *Mimivirus*) que constituyen una amenaza para la salud humana. Las AVL implican por lo tanto un papel importante en la multiplicación y dispersión de sus parásitos facultativos. También están relacionadas con algunas enfermedades en los organismos acuáticos. Debido a todas estas amenazas y el daño que pueden causar en la salud de los humanos y la salud animal, es importante detectarlas (Behets *et al.*, 2006).

De todos los microorganismos resistentes a amebas, la relación que *Legionella* establece con AVL, es sin duda la mejor conocida (Shadrach *et al.*, 2005). Se han descrito 14 diferentes especies de AVL en los que *Legionella* es capaz de multiplicarse, entre los que destacan los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* y *Dictyostelium*, en particular en los sistemas de agua caliente (Reinares y Ferrer, 2008).

Desconocida como especie bacteriana hasta 1976 *Legionella pneumophila* se aisló por primera vez, al producirse una epidemia de enfermedad de los legionarios entre los asistentes a una convención de la Legión Americana en Filadelfia. En total enfermaron 182 asistentes y murieron 29. Investigadores del *Center for Disease Control* aislaron el patógeno bacteriano en cobayos que fueron inoculados con tejido pulmonar de los pacientes (Llop *et al.*, 2001).

10. Características generales de *Legionella* spp.

Las especies del género *Legionella* son bacterias aeróbicas, Gram negativas, no esporuladas y en forma de bastón; carentes de cápsula y dotadas de flagelos y fimbrias. Tienen un tamaño aproximado de 0.5 a 1 μm de ancho y 2 a 50 μm de longitud, con uno o dos flagelos monopolares, móviles y metabolismo no fermentativo (Llop *et al.*, 2001). Contienen cadenas de ácidos grasos y requieren L-cisteína y sales de hierro para su crecimiento. Han sido colocadas en la familia Legionellaceae, que contiene el único género llamado *Legionella* (Jawetz *et al.*, 1990).

Las legionelas son ubicuas y se les puede encontrar en muchos ambientes, desde lagos, fuentes, piscinas, aguas subterráneas, agua superficial y en biopelículas (ensamblajes de bacterias empaquetadas en matrices poliméricas extracelulares adheridas a superficies o interfases acuáticas) las cuales proveen un medio para la supervivencia y propagación de la bacteria (Thomas, 2006).

La temperatura óptima de crecimiento *in vitro* de *L. pneumophila* es de 36 °C con un límite de 15 a 43 °C. En el hábitat natural de agua dulce y el suelo su crecimiento requiere de la presencia de otras bacterias o protozoos, que se considera que son los huéspedes naturales de legionela (Declerck *et al.*, 2007).

Estas bacterias son generalmente móviles por medio de uno o más flagelos polares o subpolares. La pared celular consta de una membrana citoplasmática en la superficie interior, una capa delgada de peptidoglucano y una membrana externa formada de lipopolisacáridos (LPS) (Jawetz *et al.*, 1990).

No se tiñen bien con la tinción de Gram, siendo necesario recurrir a tinciones especiales para su visualización como la de Giménez o Dieterle. Todos los miembros de esta familia producen catalasa y son relativamente inertes desde el punto de vista bioquímico. *L. pneumophila* es asacarolítica oxidasa negativa, ureasa negativa y es capaz de producir la hidrólisis del hipurato (García-Rodríguez y Picazo, 1999).

Hasta la fecha se han descrito 48 especies de *Legionella* y detectado 70 serogrupos. Aproximadamente la mitad de las 48 especies de *Legionella* se asocian con la enfermedad humana (legionelosis) de *L. pneumophila* con más de 80 % de los casos de la enfermedad (Declerck *et al.*, 2007).

Cuadro 3. Especies de *Legionella* de importancia médica (Tomado de Jawetz *et al.*, 1990).

Espece	Neumonía	Fiebre de Pontiac
<i>L. pneumophila</i>	+	Serogrupos 1 y 6
<i>L. micdadei</i>	+	
<i>L. gormanii</i>	+	
<i>L. dumoff</i>	+	
<i>L. bozemanii</i>	+	
<i>L. longbeachae</i>	+	
<i>L. wadsworthii</i>	+	
<i>L. jordanis</i>	+	
<i>L. feeleii</i>	+	
<i>L. oakridgensis</i>		

La bacteria *L. pneumophila* es el organismo que causa legionelosis o enfermedad del legionario y fiebre de Pontiac, está presente en las aguas naturales o artificiales y en ambientes acuáticos y requiere de un ambiente intracelular de AVL para su replicación (Ohno *et al.*, 2003).

La enfermedad del legionario o legionelosis es una infección humana como resultado de la inhalación o aspiración de aerosoles de (0.5 µm) a través de un ambiente contaminado con bacterias infecciosas (Campos *et al.*, 2003).

Hasta la fecha, la enfermedad debido a *Legionella* se ha detectado exclusivamente en los seres humanos, pero algunos animales (por ejemplo, cobayos, ratas, ratones y monos) son susceptibles a la infección experimental. Un caso de neumonía por *Legionella* se informó también en un ternero. La enfermedad de los legionarios o legionelosis también se puede encontrar en otras especies animales, incluidos los animales salvajes, pero no hay reservorio animal de la bacteria y tampoco se ha demostrado la transmisión entre los animales (Koneman *et al.*, 1992).

11. Patogenia

L. pneumophila posee una proteína de superficie de 24 Kd denominada MIP (o gen potenciador de la infectividad del macrófago por su siglas en inglés), que es requerida para una óptima infección intracelular y para la total expresión de la virulencia. *L. pneumophila* es un patógeno intracelular facultativo, principalmente de los monocitos y de los macrófagos alveolares. El microorganismo penetra por inhalación en el pulmón, donde afecta sobre todo alvéolos y bronquios terminales (García-Rodríguez y Picazo, 1999).

Es común la afección asintomática en todos los grupos de edad y la frecuencia de la enfermedad clínicamente importante es más elevada en los varones de más de 55 años.

La *legionelosis* debe incluirse en el diagnóstico diferencial de pacientes inmnodeprimidos que presenten fiebre e infiltrados pulmonares; pacientes que desarrollan una neumonía que no responde a cefalosporinas o aminoglucosidos; o cualquier paciente con una

neumonía grave. En pacientes en hemodiálisis y con trasplante renal, la enfermedad de los legionarios ha sido una causa importante de morbilidad y mortalidad (Llop *et al.*, 2001).

12. Patologías asociadas a *L. pneumophila*

La bacteria *Legionella* se considera el agente causal de dos patologías en los seres humanos. La enfermedad de los legionarios es una neumonía grave (con un tiempo de incubación de 2 a 10 días), la mortalidad es aproximadamente del 15 % donde la bacteria *Legionella* puede ser detectada en el esputo y tejidos (Koneman *et al.*, 1992).

Por otra parte la fiebre de Pontiac es una enfermedad febril con una duración de 2 a 6 días, con un tiempo de incubación de 1 a 7 (generalmente 3 días), se observa un cuadro de tos en aproximadamente el 50 % de los casos, acompañado de dolor de cabeza y mialgias (García-Rodríguez y Picazo, 1999).

La enfermedad de los legionarios comúnmente se acompaña de manifestaciones extrapulmonares, insuficiencia renal, encefalopatía y abscesos pulmonares. El serogrupo 1 de *L. pneumophila* es el más comúnmente aislado en pacientes (58 % de los casos) seguido del serogrupo 6 (Jawetz *et al.*, 1990).

Otros serogrupos de *L. pneumophila* y otras 19 especies de *Legionella* se asocian a patologías en humanos. En EE.UU., *Legionella micdadei* es la segunda causa más frecuente de la enfermedad de los legionarios y también se ha identificado repetidamente como el agente causal de la fiebre de Pontiac. La patogenicidad de *Legionella* en los seres humanos depende en gran medida de la susceptibilidad del huésped. Los niños y los jóvenes rara vez son afectados, mientras que los individuos inmunodeprimidos, en especial los beneficiarios de trasplantes se encuentran en un alto riesgo a la enfermedad. Sin embargo la legionelosis puede afectar a cualquier miembro de una población, aunque es más común en hombres que en mujeres y en personas mayores de 40 años. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud la gente sana también puede llegar a enfermarse, por el contrario la fiebre de Pontiac afecta por lo general a niños y adultos sanos con tanta frecuencia como a individuos inmunodeprimidos (Huerta-Torrijos *et al.*, 1995).

En Australia, *Legionella longbeachae* es una causa importante de la enfermedad del legionario, entre 9.3 % y el 29 % de las infecciones son causadas por otras especies de *Legionella* (Llop, *et al.*, 2001).

Cuadro 4. Factores de predisposición y enfermedades asociadas con legionelosis (Tomado de Koneman *et al.*, 1992).

Factores de predisposición	Enfermedades asociadas
Tabaquismo	Enfermedad pulmonar crónica
Alcoholismo	Cirrosis hepática
Edad avanzada	Diabetes mellitus
Insuficiencia renal	
Enfermedad Terminal (cáncer)	
Enfermedades malignas en la sangre	
Tratamiento con esteroides	
Inmunodepresión grave (VIH/SIDA)	

Cuadro 5. Manifestaciones clínicas de dos tipos de legionelosis (Tomado de Koneman *et al.*, 1992).

Manifestación	Enfermedad de los legionarios	Fiebre de Pontiac
Mortalidad	15 a 20 %	0 %
Periodo de incubación	2 a 10 días.	1 a 2 días.
Síntomas	Fiebre, escalofríos, tos, mialgias cefalea, dolor torácico, esputo y diarrea (confusión y alteraciones mentales).	Similares a los de influenza: fiebre, escalofríos y mialgias, tos en algunas.
Pulmones	Neumonía y derrame pleural (absceso pulmonar en algunos)	Dolor pleural; sin neumonía ni absceso pulmonar.
Riñones	Insuficiencia renal (proteinuria, azoemia y hematuria en algunos).	Sin manifestaciones renales.
Hígado	Moderadas anormalidades de la función hepática.	Sin anormalidades de la función hepática.
Tracto gastrointestinal	Diarrea acuosa, dolor abdominal, náuseas y vómitos.	Sin anormalidades.
SNC	Somnolencia, delirio, confusión desorientación, (rara vez se han documentado convulsiones).	Sin manifestaciones.

Ciertas legionelas también han sido asociadas con la enfermedad denominada fiebre de Pontiac. Esta dolencia fue reconocida por primera vez durante una epidemia en el Edificio del Departamento de Salud del Condado en Pontiac, Michigan en 1968. El 95 % de los empleados de ese departamento presentó la enfermedad, con fiebre, dolores musculares, cefaleas y mareos que remitieron de forma espontánea de 2 a 5 días. El cultivo del tejido pulmonar de los pacientes en los cobayos dio como resultado el crecimiento de *L. pneumophila*.

A diferencia de la enfermedad de los legionarios, la fiebre de Pontiac no produce una neumonía y nunca es letal. Puede que no se trate de una infección sino de una manifestación de hipersensibilidad. Aún no se tienen evidencias de como es que las mismas bacterias pueden producir dos síndromes clínicos tan diferentes (Llop *et al.*, 2001).

a. Diagnóstico microbiológico

Legionella pneumophila no crece en los medios bacteriológicos de rutina, pero se pueden desarrollar en medios complejos como agar con extracto de levadura y carbón amortiguado (BCYE, del inglés *buffered charcoal yeast extract*).

Las especies de *Legionella* crecen con lentitud, suelen observarse colonias visibles después de 3 días de incubación, estas son redondas o planas o tienen bordes íntegros. Su color varía desde ninguno hasta rosado o azul iridiscente y son translúcidos o moteadas (Llop *et al.*, 2001).

Para realizar el diagnóstico de *Legionella* se realiza lo siguiente:

Métodos directos

Aislamiento

El esputo y las muestras obtenidas por broncoscopia son las que más se utilizan, sin embargo *Legionella* también puede ser aislada a partir de sangre, líquidos corporales, abscesos y heridas.

Todos los miembros del género crecen lentamente sobre medios sólidos y requieren L-cisteína para su aislamiento inicial. El medio de cultivo más utilizado es el BCYE (un medio especial para cubrir las necesidades nutricionales de este organismo) ya que la bacteria requiere L-cisteína y suplementos de hierro inorgánico para el crecimiento óptimo, suplementado con antibióticos. Deben incubarse al menos durante 3 a 5 días a 37 °C. La identificación de los organismos aislados se verifica mediante la determinación de la dependencia de cisteína. Posteriormente se confirma el diagnóstico mediante métodos serológicos, genéticos o por cromatografía de gases.

Detección de antígenos

Puede realizarse inmunofluorescencia directa, mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos de especie, la prueba de antigenuria detecta antígenos bacterianos presentes en la orina mediante técnicas de radioinmunoanálisis.

Detección de ácidos nucleicos

La reacción en cadena de la polimerasa es un método rápido para la detección de especies de *Legionella*.

Métodos Indirectos

La detección serológica de anticuerpos tiene más utilidad para los estudios epidemiológicos que para el diagnóstico inmediato de la enfermedad por *Legionella*. Puede llevarse a cabo mediante técnicas de inmunofluorescencia indirecta, la prueba de ELISA y microaglutinación (García-Rodríguez y Picazo, 1999).

b. Tratamiento

El tratamiento generalmente es el mismo para todos los tipos de neumonía, sin embargo hay diferencias importantes en el abordaje del diagnóstico y en el manejo empírico de los antimicrobianos. La mayor parte de las neumonías adquiridas en la comunidad son secundarias a bacterias patógenas comunes como el *Staphylococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* (Huerta-Torrijos *et al*, 1995).

Deben utilizarse agentes antimicrobianos con capacidad para penetrar en el interior de las células fagocitarias y alcanzar concentraciones adecuadas en dicho medio. Los macrólidos, las quinolonas, rifampicina, trimetoprim-sulfametoxazol y algunas tetraciclinas, han demostrado su eficacia *in vivo* frente a *L. pneumophila*. El tratamiento de primera elección es la eritromicina sola o asociada a rifampicina (Llop *et al*, 2001).

13. Antecedentes de *Legionella* spp.

Rowbotham en 1980 describió la capacidad de *L. pneumophila* de multiplicarse al interior de las células dentro de los protozoos y propuso que las AVL podrían ser un reservorio para las especies de *Legionella* (Greub y Raoult, 2004).

Newsome *et al.* (1998) realizaron un estudio, en el cual describen el aislamiento y la caracterización de una bacteria que se observó en primer lugar dentro de una ameba de una muestra de suelo. En el laboratorio, la bacteria se multiplicó dentro de *Acanthamoeba polyphaga*. La multiplicación extracelular se observó en agar BCYE.

Marciano-Cabral y Cabral (2003) informaron que el crecimiento en *A. castellanii* aumenta la capacidad de *Legionella* a invadir los macrófagos y aumenta la concentración intracelular de la replicación de la bacteria.

Borella *et al.* (2004) realizaron una investigación donde estudiaron la bacteria *Legionella* y la contaminación de *Pseudomonas* en agua caliente en Italia, en donde *Legionella* spp. fue detectada en 22.6 % de 146 muestras.

Por otra parte Türetgen *et al.* (2005) realizaron un estudio en el que analizaron 103 muestras de 50 torres de enfriamiento de agua las cuales fueron examinadas por un periodo de cinco años, *L. pneumophila* fue localizada en el 44 % de las muestras. La mayoría de las torres examinadas tuvo niveles elevados de *L. pneumophila*, estas torres de agua se asociaron a muchos brotes de la enfermedad de los legionarios.

En otra investigación, Guerrieri *et al.* (2005) determinaron la supervivencia de *L. pneumophila* en aguas superficiales variando algunas condiciones del ambiente como la cantidad de nutrientes y la temperatura. Posteriormente determinaron que *A. polyphaga* es indispensable para la supervivencia de *L. pneumophila*.

Declerk *et al.* (2007) demostraron que la ameba *A. castellanii* puede jugar un papel crucial en el aumento y la propagación de *L. pneumophila* en los sistemas acuáticos antropogénicos y por lo tanto en la ocurrencia de la enfermedad de los legionarios. Reportaron también la presencia simultánea de la bacteria *Legionella* spp. con *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp., *Willaertia* spp., *Vahlkampfia* spp. y *Hartmannella* spp. en

biopelículas. Al mismo tiempo realizaron un estudio en el cual se tomaron muestras de los ambientes acuáticos, en los que el 81 % de todas las muestras de biopelícula flotante fueron positivas para *Legionella* spp. y el 70 % de estas muestras fueron positivas para *L. pneumophila*. La bacteria *Legionella* se localizó en el sustrato asociado a biopelículas donde sobrevivió y se replicó dentro de las AVL.

Legionella spp. se ha aislado de agua con una temperatura de hasta 63 °C y contaminada con otras bacterias y protozoos. La formación de biopelículas puede proporcionar un medio para la supervivencia y la difusión de *L. pneumophila* (Borella *et al.*, 2004).

Las neumonías continúan siendo una de las principales causas de muerte en nuestro país, y es la infección nosocomial con más alta mortalidad que complica el tratamiento de los pacientes admitidos en la unidad de terapia intensiva con una mortalidad del 30 al 50 %. La legionelosis es una enfermedad de distribución mundial, en México solo se han diagnosticado dos casos, posiblemente por no considerarse en el diagnóstico diferencial de las neumonías adquiridas (Huerta-Torrijos *et al.*, 1995).

En 1990 se informó el primer caso en México de neumonía por *L. pneumophila*, en un varón de 39 años de edad con alcoholismo y tabaquismo como factores de riesgo. Ingresó al Hospital de Especialidades del ISSEMYM Toluca, el inicio del padecimiento fue con fiebre y malestar general, acompañándose posteriormente de tos seca, disnea progresiva, cefalea intensa y radiológicamente presentaba neumonía intersticial atípica. Se trató con eritromicina y rifampicina. Un mes después, se encontró asintomático y con resolución radiológica completa, reportándose tinción de Giménez positiva en el Instituto Nacional de Referencia Epidemiológica (INDRE) para *L. pneumophila* (Marín y Montes, 1990).

En la Clínica Londres, se informa el segundo caso en México de neumonía atípica por *L. pneumophila* en una mujer de 36 años de edad, que reportó como antecedente el tabaquismo y haber ingresado a las cuevas de Tolantongo, Hidalgo, la paciente presentaba como cuadro clínico neumonía atípica, después de administrarle una terapia empírica con penicilina, amikacina y fluconazol no presentó mejoría. Posteriormente se inició un tratamiento con eritromicina, los resultados de la serología para legionela fueron positivos, y después de una semana de tratamiento se observó mejoría clínica, superando favorablemente su cuadro clínico (Huerta-Torrijos *et al.*, 1995).

14. Biopelículas

El término biopelícula (*biofilm*) se define como comunidades integradas por organismos procariontes y eucariontes, como bacterias, algas, hongos y protozoos, en el seno de una estructura o matriz polimérica que se encuentran agregados en un exopolímero compuesto de glicocálix (75 %) y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas estableciendo interacciones que contribuyen al mantenimiento de las mismas (Reinares y Ferrer, 2008; Betancourth, 2004).

El exopolímero que es producido por los mismos microorganismos forma una matriz adherente, en donde estos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos. Se ha visto entonces, que los microorganismos al ser variados dentro de esta organización, presentan diferentes microambientes de pH,

concentración de oxígeno, iones, carbono y nitrógeno (Reinares y Ferrer, 2008). La estructura así creada se va repoblando con otras formas procariotas y eucariotas que constituyen los organismos de la biopelícula y que se benefician de la protección que ofrece la matriz polimérica contra las perturbaciones (Betancourth, 2004).

Las biopelículas tienen un tamaño aproximadamente de 30 a 300 μm y contienen numerosos microorganismos, algunos patógenos para los seres humanos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Vibrio cholerae* y *Salmonella* spp. (Declerck *et al.*, 2007).

La perturbación de biopelículas fijas o flotantes por medios mecánicos o naturales lleva a la formación de aerosoles (partículas de $<5\mu\text{m}$) que permiten la transmisión de *L. pneumophila* a distancias considerables hasta que son inhaladas por personas susceptibles, pudiendo causar neumonía la cual es una causa importante de enfermedad y mortalidad (Fields, 2002; Jennings, 2003).

III. JUSTIFICACIÓN

La importancia de hallar una asociación entre amebas de vida libre patógenas y bacterias del género *Legionella* causantes de neumonía se destaca ya que la patogenicidad de ambos tipos de organismos puede ser potencializada si estos dos patógenos llegan a contaminar a un ser humano.

En este estudio se investigó si *Legionella* spp. y particularmente *L. pneumophila* es habitante común de las biopelículas del balneario “El Géiser”, y paralelamente determinar si las amebas de vida libre patógenas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* están presentes en el sistema acuático estudiado y si son hospederos de *Legionella* spp.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia y asociación que existe entre amebas de vida libre patógenas y *Legionella* spp. en la biopelícula de un géiser en Tecozautla, estado de Hidalgo.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

a) Detectar la presencia de amebas de vida libre patógenas de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, en la biopelícula de un sistema de aguas termales originado por un géiser en Tecozautla, estado de Hidalgo.

b) Determinar la presencia de *L. pneumophila* en la biopelícula de un sistema de aguas termales originado por un géiser en Tecozautla, estado de Hidalgo.

c) Investigar si *Legionella* spp. es habitante común de las biopelículas fijas y flotantes del agua y de los alrededores del géiser.

d) Establecer si *L. pneumophila* tiene la habilidad para sobrevivir en términos de la formación de biopelículas en un sistema de temperaturas extremas en un géiser en Tecozautla, estado de Hidalgo.

V. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

1. TECOZAUTLA, HIDALGO

Tecoautla, es un municipio del estado de Hidalgo, que es famoso por tener un corredor turístico de balnearios de aguas termales a las cuales acuden personas de toda la república, en busca de las propiedades medicinales que se dice contiene esta agua.



Figura 3. Mapa de la localización del municipio de Tecozautla en el estado de Hidalgo (Tomado de Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002).

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

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

Las principales fuentes hidrológicas de este municipio son: la cuenca del río Panuco, el río Tecozautla, el río San Francisco y el río Moctezuma, este último es muy importante no solo por su afluencia de agua sino porque también sirve como límite político estatal.

Cuenta además con pozos y manantiales. Tecozautla está ubicado en una zona rica en manantiales de aguas termales, situación que lo coloca como un importante municipio turístico de Hidalgo, con una veintena de balnearios con aguas termales, cuya temperatura oscila entre 30 y 40 °C. Taxhidó, Gandhó, Uxdejhe y Carrizal del Lago son algunos de los balnearios más visitados (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo, 2002).

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

2. BALNEARIO “EL GÉISER”

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

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

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

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

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo de investigación se realizaron tres muestreos en Tecozautla, estado de Hidalgo, considerando cuerpos de aguas naturales y sustratos asociados (biopelículas) en el balneario de aguas termales “El Géiser”. Los muestreos se realizaron en noviembre de 2007, octubre de 2008 y febrero de 2009. En este estudio se recolectaron muestras de agua y de biopelícula ya que ambas poseen temperaturas elevadas lo que favorece la proliferación de AVL.

1. RECOLECTA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

Por cuestiones de logística y disponibilidad de recursos (de tiempo y materiales) durante el primer muestreo se tomaron muestras de agua de piscinas que son alimentadas por el agua del géiser, mientras que en el segundo y tercer muestreo se recolectaron muestras de biopelículas formadas sobre las superficies adyacentes al origen del géiser, bañadas por la misma agua que alimenta a las piscinas del sistema hidrotermal.

Muestras de agua.

Se recolectaron muestras de agua en volúmenes de un 1 L en frascos esterilizados de polipropileno de boca ancha (NALGENE), las muestras de agua se tomaron de las piscinas que son abastecidas con el agua proveniente del géiser que se encuentra en el lugar y la decisión de seleccionar los sitios de muestreo se basó en ubicar aquellos lugares en donde la gente gusta de nadar. Todas las muestras de agua contenían de manera visible biopelículas flotantes que por centrifugación fueron concentradas y analizadas como se describe posteriormente.

Muestras de biopelícula.

Este material se recolectó raspando las superficies de las paredes interiores y exteriores de la superficie de influencia del géiser, el material obtenido fue recogido en tubos estériles de polipropileno de 50 ml con agua del mismo lugar para evitar su desecación.

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

2. REGISTRO DE PARÁMETROS AMBIENTALES

Se registraron los parámetros fisicoquímicos para comprobar si las condiciones que existen en el agua y sedimentos del balneario termal podían sustentar la presencia de AVL además de establecer su posible relación con los microorganismos aislados para lo cual se hicieron las siguientes determinaciones *in situ*:

Temperatura de agua y biopelícula con un termómetro digital Hanna Instruments modelo H 9040.

pH, con un potenciómetro digital Oakton modelo Testr1.

Conductividad, con el conductímetro digital WalkLAB Instruments.

3. AISLAMIENTO, CULTIVO E IDENTIFICACION DE LAS AVL

Las muestras de agua se procesaron según el método descrito por De Jonckheere (1984) para aislar AVL, se tomaron volúmenes de agua de 50 ml y se concentraron por centrifugación en una centrifuga BOECO U-32 a 15 000 g durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla fue sembrada sobre placas con medio de agar no nutritivo (NNE) con una capa de bacteria *Enterobacter aerogenes* inactivándola por calor. El medio NNE proporciona las sales y la fuente de carbono, en forma de bacterias, necesarios para el sostenimiento de las AVL (De Jonckheere, 1984).

Para las muestras de biopelícula se cortó un fragmento de sedimento de aproximadamente 5 mm y se sembró directamente sobre placas con medio de agar NNE. Todo el manejo de las muestras se llevó a cabo con material estéril en campanas de flujo laminar con un nivel de bioseguridad II.

Todas las placas sembradas de esta manera se guardaron de forma invertida dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación, y se incubaron a 37 °C por 24 horas. A las 24 horas de incubación se realizó la primera observación de las placas en un microscopio invertido de contraste de fases Nikon Eclipse TS 100. Una vez detectado el crecimiento de amebas en las placas, se marcó la zona de mayor abundancia y se cortó un trozo de agar (aproximadamente 5 mm) en condiciones de esterilidad, para resembrar en una placa nueva y así evitar cualquier tipo de contaminación, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 horas.

a. Clonación de las AVL

Transcurridas 24 horas de cultivo, las placas de agar NNE sembradas con las muestras del balneario, se revisaron en el microscopio invertido para observar la presencia de trofozoítos o quistes amebianos.

Los aislados con trofozoítos y quistes libres de contaminación se seleccionaron marcando la zona de mayor abundancia y fueron resembrados en placas con agar NNE, transfiriendo una porción del agar (aproximadamente 5 mm) NNE con trofozoítos a otra

placa con agar NNE y se incubó a 37 °C (De Jonckheere, 1977). Posteriormente se hicieron nuevas resiembras, para separar totalmente un aislado de otro, y para mantener los aislados libres de contaminación y así llevar a cabo la identificación morfológica.

b. Determinación taxonómica de los aislados

Para efectuar la determinación taxonómica, se aseguró que las placas de NNE tuvieran trofozoítos y quistes, y que no tuviera ningún tipo de contaminación.

Una vez crecidas las amebas en las placas se siguió el procedimiento estándar para la identificación. En condiciones de esterilidad, se vertió 1 ml de solución fisiológica (PBS) sobre la placa y se realizó un barrido sobre la placa del cultivo, concentrando la suspensión acuosa con amebas para su observación al microscopio invertido de contraste de fases.

El primer paso para la identificación fue la observación de quistes y trofozoítos en el microscopio con los objetivos de 10, 20 y 40 X. Se utilizaron las claves taxonómicas de Page (1966, 1975, 1976 y 1988), tomando en cuenta la morfología de los organismos, las formas del quiste, del trofozoíto, del uroide y la presencia o no de gránulos perinucleares (John y De Jonckheere, 1985).

Se realizaron también mediciones con el microscopio invertido a 20 y 40 X de los quistes y de los trofozoítos de cada uno de los aislados para confirmar con base a las claves taxonómicas de Page, 1988, la identificación morfológica. Asimismo se realizaron registros fotográficos de las AVL a 10, 20 y 40 X.

c. Cultivos Axénicos

Una vez identificado y clonado el aislado de AVL se transfirió a tubos con medio líquido para cultivo axénico PBSGM (Fosfato, Biotriptasa, Suero, Glucosa Medio, por sus siglas en inglés). Este medio se utiliza para aislar, axenizar y mantener los aislados de AVL que hayan crecido en el medio NNE (De Jonckheere, 1984) y se hicieron crecer trofozoítos libres de bacterias.

En condiciones de esterilidad los trofozoítos que habían crecido en las placas fueron transferidos al medio líquido, cortando pequeños trozos de agar (aproximadamente 5 mm), en donde se observó el mejor crecimiento amebiano, se introdujeron en el medio y se incubaron a 37 °C, manteniendo inclinados los tubos y sin agitación (De Jonckheere, 1977).

Para mantener los aislados por periodos prolongados se hicieron resiembras con tubos con el mismo medio PBSGM. Los medios axénicos contenían sales y fuente de carbono como aminoácidos y glucosa, además de suero fetal de bovino.

Se tomaron alícuotas de 1 ml de cada uno de los aislados axénicos para la identificación y se realizó de la misma forma que para los aislados contenidos en las placas de agar con medio NNE.

4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE *Legionella* spp.

a. Muestras de agua y biopelículas

Para el aislamiento de bacterias del género *Legionella* spp. se recolectaron muestras de agua y biopelícula con el mismo procedimiento que el usado para la identificación de AVL.

Las muestras de agua y biopelícula se transportaron a temperatura ambiente, desde el balneario "El Géiser" al Laboratorio de investigación en Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE), en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FESI), UNAM.

Una vez en el laboratorio las muestras de agua y biopelículas se mantuvieron a temperatura ambiente durante siete días.

b. Concentración por centrifugación

Las muestras de agua y biopelícula se concentraron por centrifugación, se tomaron 15 ml de agua y 1 ml de agua contenida en el frasco de la biopelícula de cada una de las muestras y se centrifugaron en una centrifuga BOECO U-32 a 16 000 x g durante 30 minutos.

c. Descontaminación ácida para *Legionella*

Después de la centrifugación, las muestras se sometieron a una descontaminación en solución ácida (KCl/HCl), en una dilución (1:1). Para algunas muestras de agua con altas concentraciones de bacterias es necesario utilizar este procedimiento para reducir el número de bacterias que no pertenezcan al género *Legionella*. El tratamiento ácido se utiliza habitualmente para este fin (este procedimiento es utilizado por laboratorios de los CDC (*Center for Disease Control*) (para preparar las muestras para cultivo). Una vez que se realizó la dilución, la solución acidificada se mantuvo a temperatura ambiente.

d. Cultivo en agar BCYE enriquecido e identificación morfológica de *Legionella* spp.

El agar BCYE, se utiliza para el aislamiento primario y cultivo de las especies de *Legionella* a partir de muestras clínicas y ambientales.

Se sembraron 0.1 ml de la solución acidificada sobre placas de agar BCYE enriquecido y se incubaron a 37 °C durante tres días. Posteriormente se identificaron las bacterias del género *Legionella* de acuerdo a su morfología colonial. Estas colonias se identificaron por poseer bordes redondos y enteros.

El centro de la colonia es generalmente de color blanco brillante, con una apariencia moteada. El centro de la colonia también puede tener un color azul, morado, verde o rojo, algunas otras colonias pueden ser también fluorescentes. Posteriormente se resembró cada colonia sospechosa sobre una placa de agar BCYE y se incubó durante 24 horas. El manejo de las muestras se llevó a cabo con material estéril en campanas de flujo laminar con un nivel de bioseguridad II.

5. IDENTIFICACION DE *Legionella pneumophila* por ADN

a. Extracción y purificación de ADN

Una vez aislados los microorganismos del género *Legionella* se llevó a cabo una extracción y purificación de ADN con el Kit Wizard Genomic ADN Purification Kit (Promega, Madison, WI) y posteriormente se utilizó la técnica de biología molecular PCR (kit Maxim Biotec. Inc.) para determinar su posición taxonómica.

b. PCR y electroforesis

Para la detección de *L. pneumophila* se utilizaron un par de iniciadores basados en Lmp1 y Lmp2 descritos por Jaulhac (1992). Este par de iniciadores tienen como blanco el gen potenciador de la infectividad a macrófagos (mip). Después de la amplificación los productos fueron analizados por electroforesis en agarosa al 2% (Hajia, 2004) visualizados en un transiluminador UV y fotografiados para buscar un fragmento de 232 pb.

VII. RESULTADOS

Se realizaron tres muestreos en el balneario de aguas termales “El Géiser” en Tecozautla, estado de Hidalgo en busca de AVL patógenas y bacterias del género *Legionella* spp. En el balneario se seleccionaron 15 sitios de muestreo que abarcaron todo el sistema hidrotermal.

1. Amebas de vida libre en las muestras recolectadas

A partir de 70 muestras (40 muestras de agua y 30 de biopelículas) se obtuvieron 148 aislados identificándose siete géneros y seis especies de AVL, incluyendo algunas reportadas como patógenas para los seres humanos. Los géneros identificados fueron: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella*, *Saccamoeba*, *Rhizamoeba* y *Stachyamoeba* (Cuadro 6). Los aislados fueron identificados a nivel de género por morfometría a partir de cultivos.

Cuadro 6. Relación de géneros de amebas de vida libre aisladas e identificadas a partir de muestras ambientales en el balneario “El Géiser”.

Aislado amebiano	Muestreo			Total de aislados
	I	II	III	
<i>Acanthamoeba</i>	17	41	45	103
<i>Naegleria</i>	7	11	6	24
<i>Vahlkampfia</i>	4	1	2	7
<i>Rhizamoeba</i>	2	0	3	5
<i>Hartmannella</i>	3	1	0	4
<i>Saccamoeba</i>	3	0	0	3
<i>Stachyamoeba</i>	0	0	2	2
Total	36	54	58	148

De las amebas potencialmente patógenas el género que se encontró en mayor número fue *Acanthamoeba* con 103 aislados lo que representa el 70 % del total, mientras que el género *Naegleria* con 24 organismos identificados representó el 16 %. Estos dos géneros representaron el 86 % del total de aislados en el sistema de agua termal en Tecozautla (Figura 4), cabe destacar aquí que los dos géneros mencionados son en la literatura los que potencialmente constituyen mayor riesgo para producir infecciones severas en los seres humanos pudiéndoles causar meningoencefalitis, meningitis y queratitis amebiana (Gallegos, 1997; Marciano-Cabral y Cabral, 2003 Muñoz *et al.*, 2003; Rocha-Azevedo *et al.*, 2009).

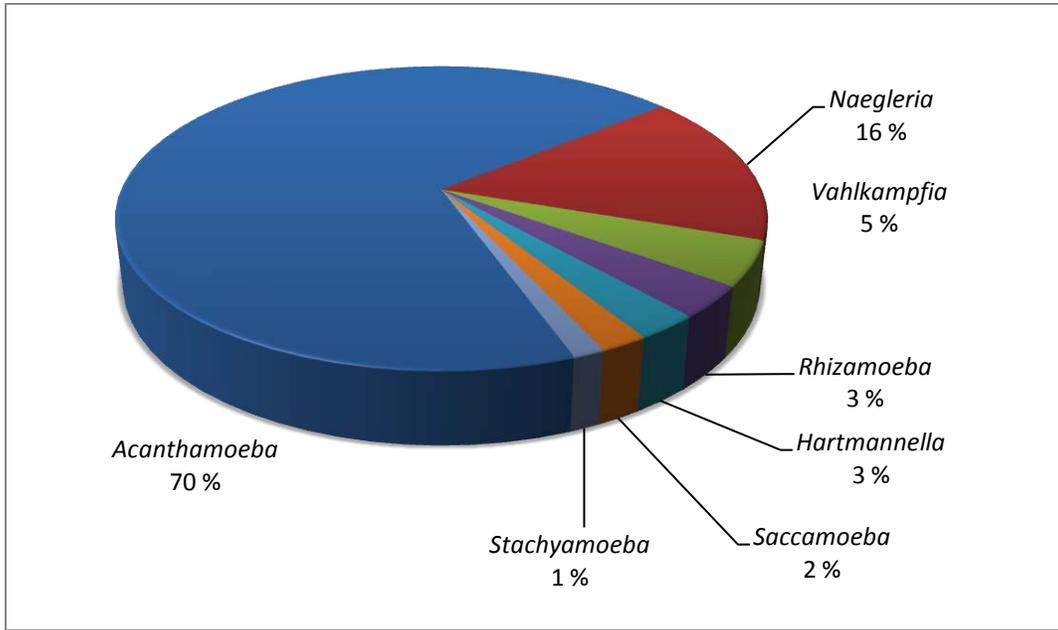


Figura 4. Porcentaje de los géneros amebianos aislados a partir de agua y biopelícula en tres muestreos en el balneario “El Géiser” en Tecozautla, estado de Hidalgo.

Por otra parte a partir de las muestras analizadas de los muestreos se identificaron seis, cuatro y cinco géneros respectivamente de AVL, siendo los más frecuentemente aislados aquellos pertenecientes a *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Vahlkampfia* (Figura 5).

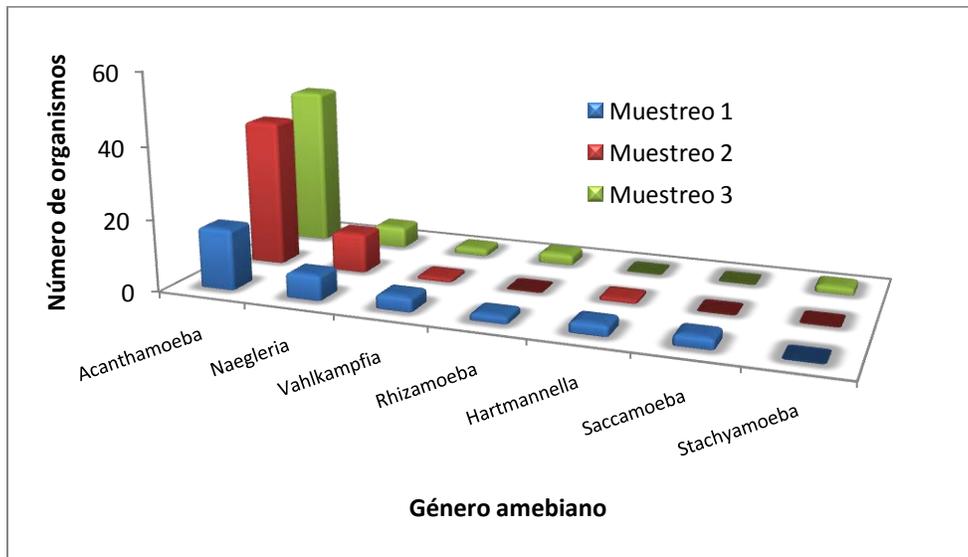


Figura 5. Géneros amebianos aislados en tres muestreos en el sistema hidrotermal “El Géiser”

La identificación morfométrica de los aislados a nivel de especie, se muestra en la Figura 6, en la cual se aprecia una alta incidencia de organismos amebianos de la especie *A. polyphaga*, mientras que *A. culbertsoni* y *A. castellanii* tuvieron 18 y 16 aislados respectivamente. También se aprecia que la presencia de estos microorganismos del género *Acanthamoeba* registraron una mayor abundancia en el segundo y tercer muestreo, mientras que en el primero solo se obtuvieron cuatro, sin embargo, en este último se aisló al organismo más patógeno que fue *N. fowleri*.

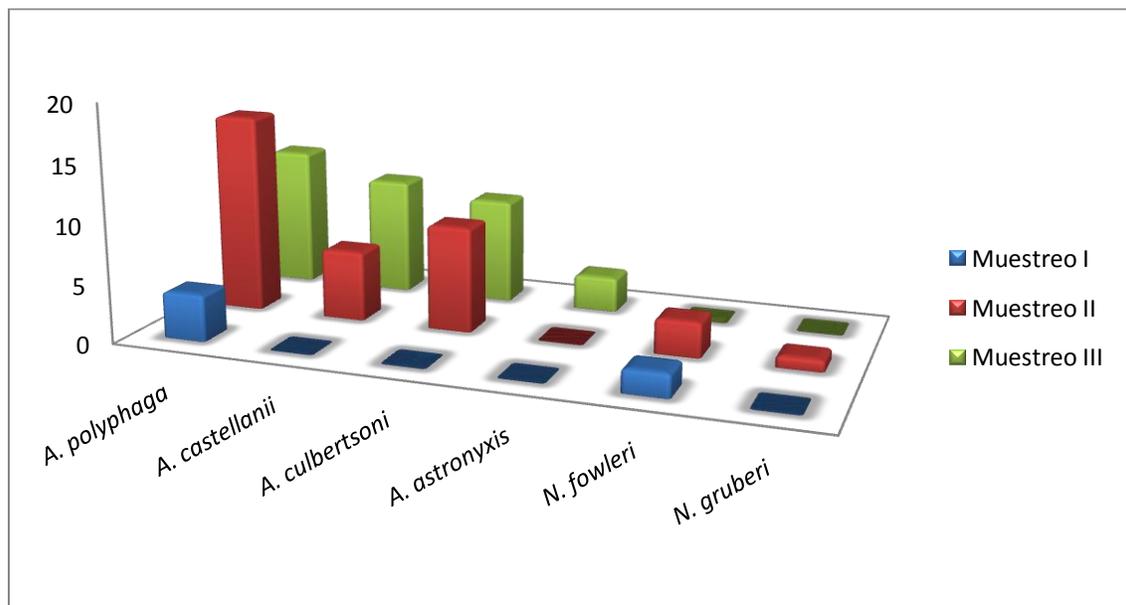


Figura 6. Número de especies aisladas de AVL en los tres muestreos en el balneario “El Géiser” en Tecozautla, estado de Hidalgo.

En el muestreo I solo se identificaron dos especies de AVL los cuales fueron *N. fowleri* y *A. polyphaga*, En el muestreo II en lo que se refiere a especies, se pudieron describir cinco especies de AVL, de las cuales tres pertenecen al género *Acanthamoeba* y dos al género *Naegleria*.

En lo que se refiere al muestreo III solo se identificaron cuatro especies del género *Acanthamoeba*, en donde *A. polyphaga* con 12 registros fue la especie más frecuente, *A. castellanii* y *A. culbertsoni* se encontraron casi en la misma proporción con 10 y 9 organismos respectivamente y por ultimo *A. astronyxis* con una menor abundancia de 3 organismos.

Detallando el análisis de la taxonomía de los aislados, en el Cuadro 7 se muestra el listado de especies amebianas encontradas en las muestras tomadas del sistema hidrotermal “El Géiser” en Tecozautla, estado de Hidalgo.

Cuadro 7. Relación de los géneros y especies de AVL identificados en tres muestreos en el balneario “El Géiser”.

Muestreo		
I	II	III
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	<i>Acanthamoeba astronyxis</i>
<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
<i>Naegleria</i> spp.	<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
<i>Vahlkampfia</i> spp.	<i>Hartmannella</i> spp.	<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Saccamoeba</i> spp.	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria</i> spp.
<i>Hartmannella</i> spp.	<i>Naegleria gruberi</i>	<i>Rhizamoeba</i> spp.
<i>Rhizamoeba</i> spp.	<i>Naegleria</i> spp.	<i>Stachyamoeba</i> spp.
	<i>Vahlkampfia</i> spp.	<i>Vahlkampfia</i> spp.

Del total de aislados positivos de acantamebas, *A. polyphaga* representó el 32 %, *A. culbertsoni* 17 %, *A. castellanii* el 16 % y *A. astronyxis* el 3 %, algunas amebas del género no pudieron ser identificadas a nivel de especie quedando como *Acanthamoeba* spp y representaron el 32 % del total de los aislados del género (Figura 7).

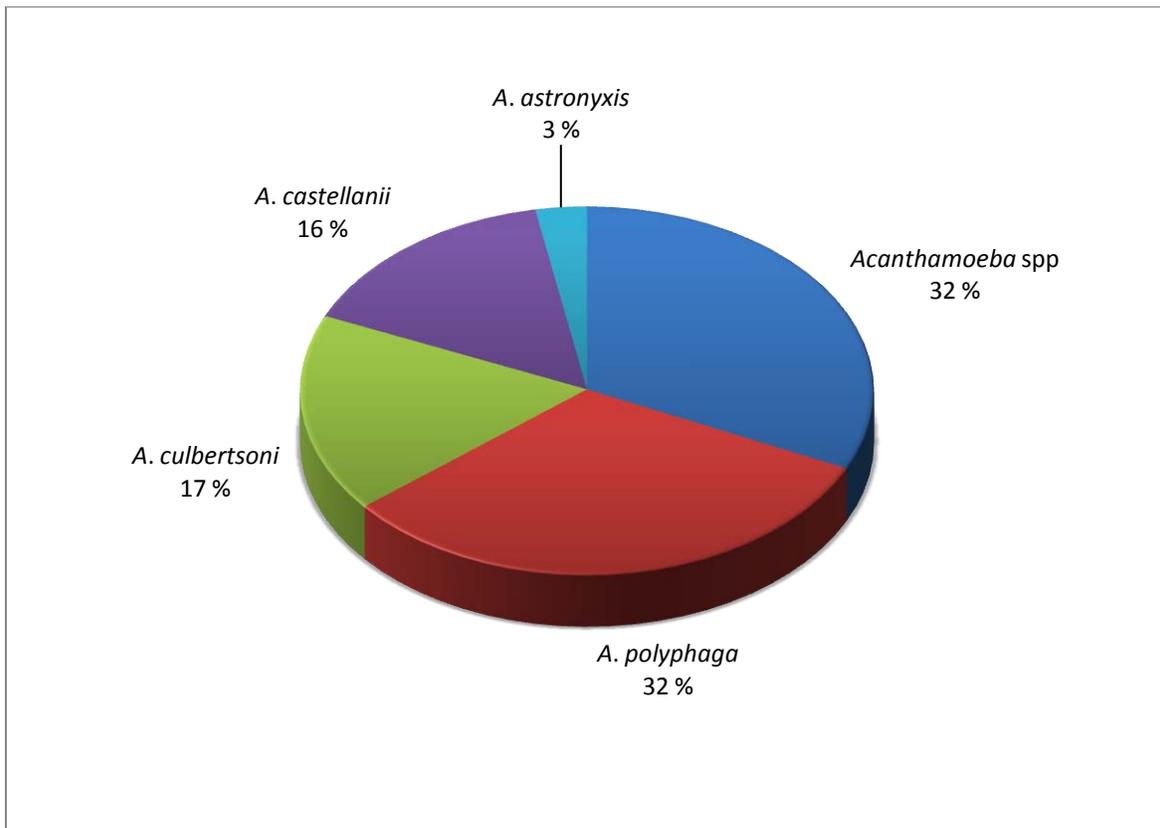


Figura 7. Porcentaje de los aislados amebianos del género *Acanthamoeba* aislados a partir de agua y biopelículas en el balneario “El Géiser” en Tecozautla, estado de Hidalgo.

2. Descripción morfológica de las AVL encontradas en el balneario “El Géiser”

Género *Acanthamoeba* spp.

El estado trófico del género se distingue por presentar proyecciones finas a lo largo de todo el cuerpo ameboideo llamadas acantópodos (del griego *Acantos*=espinas), que le dan el nombre al género. Los trofozoítos de las amebas del género *Acanthamoeba* son irregulares y algo aplanados y tienen una longitud promedio que va de 13 a 24 μm . El estado quístico es característico y de la observación de este se diferencian y ubican las especies que conforman al género. El tamaño promedio del quiste es de 15 a 28 μm y este se conforma de una doble pared; la externa o exoquiste es moderadamente redondeada mientras que el endoquiste o pared interna puede ser redondo, angular o estrellado. El género *Acanthamoeba* no presenta una fase flagelar.

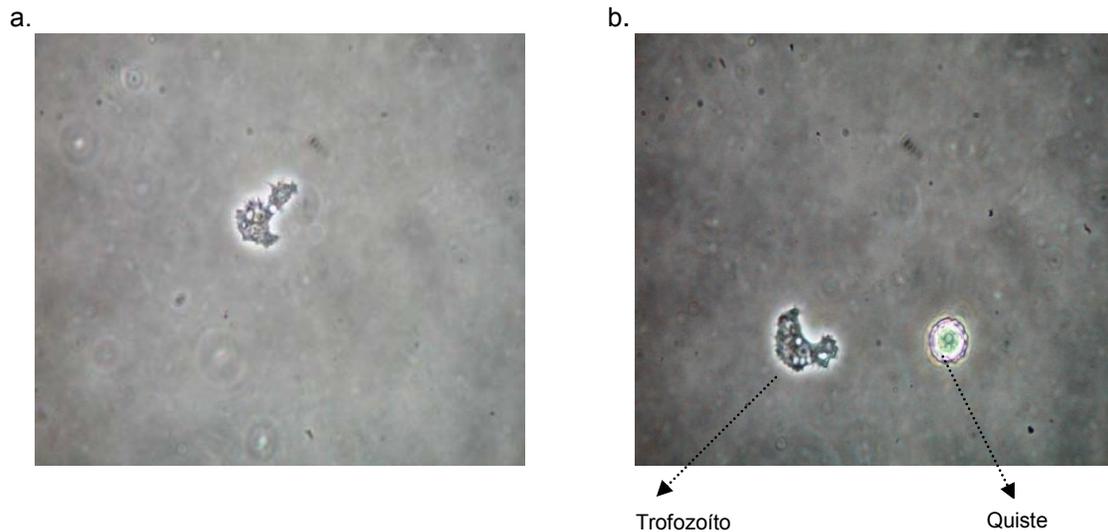


Figura 8. a. Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. y b. Quiste y trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. (40 X). Microscopía de contraste de fases.

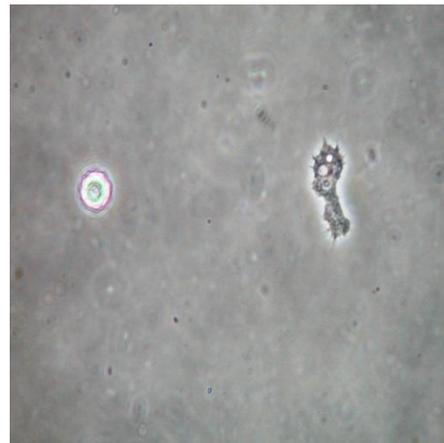


Figura 9. Quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. (40 X). Microscopía de contraste de fases.
Acanthamoeba castellanii

Son amebas que presentan un endoquiste más o menos esférico conectado al exoquiste por pequeños brazos cónicos, ectoquiste grueso y muy rugoso; el diámetro del quiste tiene un promedio de 14 a 16 μm . Es un organismo patógeno para el hombre con capacidad para provocar infecciones en el sistema nervioso central (EAG), ojos (queratitis), pulmón (neumonía), próstata, hueso, músculo y piel. Estas amebas pertenecen al grupo II.

Acanthamoeba culbertsoni

Presentan un endoquiste regularmente redondeado y ocasionalmente poligonal; el ectoquiste es delgado, ondulado o rugoso. El diámetro del quiste tiene un promedio de 15 a 18 μm . Se considera una especie patógena para los seres humanos infectando también al SNC. Estas amebas se ubican dentro del grupo III.

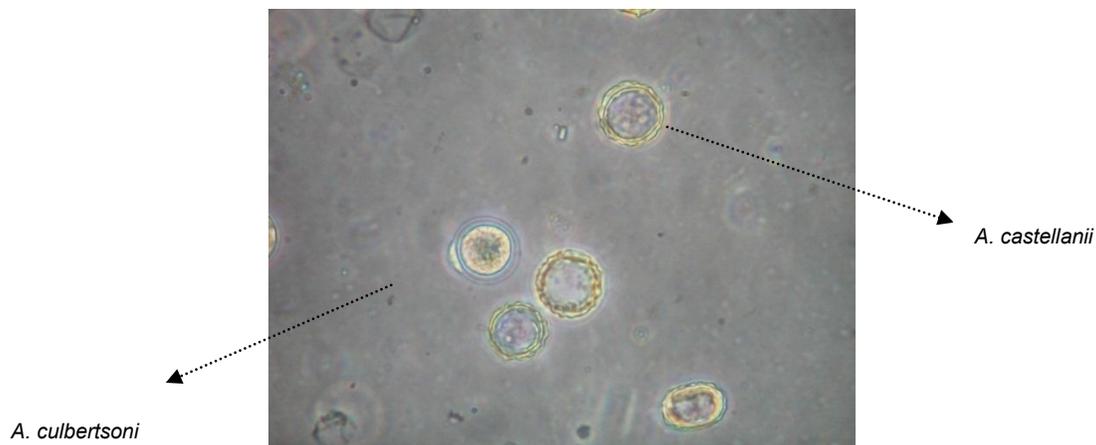


Figura 10. Quistes de *A. castellanii* y *A. culbertsoni* (40 X). Microscopía de contraste de fases.

Acanthamoeba astronyxis

La mayoría de los brazos endoquísticos de estas amebas están en contacto estrecho con el ectoquiste, de 7 a 9 brazos; el diámetro promedio del quiste es de 10 a 22 μm . Esta especie es patógena para el hombre: EAG, nódulos linfáticos adrenales, piel (ulceraciones), tiroides y senos nasales. Estas amebas pertenecen al grupo I.

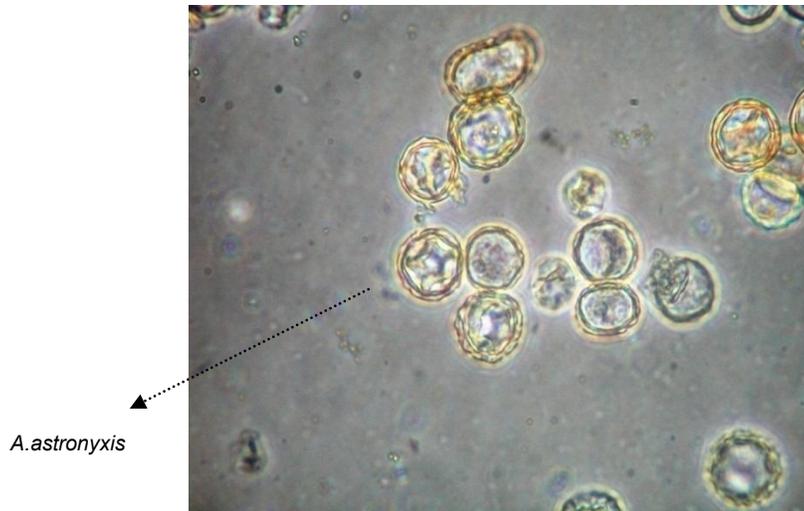


Figura 11. Quiste de *A. astronyxis* (40 X). Microscopía de contraste de fases.

Acanthamoeba polyphaga

Endoquiste muy irregular y prácticamente nunca estrellado; el ectoquiste está menos rugoso que *A. castellanii*, es delgado y está ampliamente separado del endoquiste; el número promedio de las esquinas del endoquiste (brazos) es de 5; el diámetro medio de quiste es de 14 μm . Amebas patógenas para el hombre; EAG y queratitis. Amebas pertenecientes al grupo II.

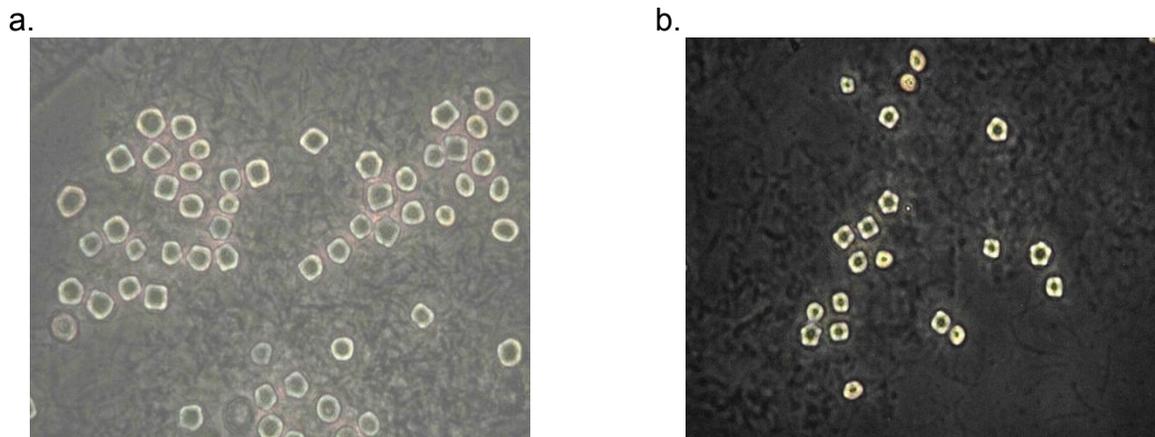


Figura 12. Quistes de *A. polyphaga* a. (40 X); b. (20 X). Microscopía de contraste de fases.

Género *Vahlkampfia* sp.

Los quistes de este género carecen de poros de exquistamiento; gránulos perinucleares ausentes o irregulares en forma y tamaño; la separación de las paredes varía con las especies. No existe una fase flagelar.

Género *Naegleria* spp.

Las amebas del género *Naegleria* presentan un trofozoíto de tamaño variable de 15 a 28 μm . El desplazamiento es muy rápido en todas las especies de *Naegleria* por la formación de lobópodos eruptivos hialinos. El quiste tiene forma esférica y varía de tamaño de 8.4 a 22.9 μm . En observaciones al microscopio de contraste de fases son fácilmente visibles uno o varios poros sobre la pared del quiste, los cuales son más conspicuos en quistes vacíos que en quistes maduros o prequistes.

Una característica notable del género es que presenta una fase temporal ameboflagelar que es aparente cuando las amebas son puestas en contacto con agua destilada a 37 °C. Después de 60 a 90 minutos, se forman de uno a dos flagelos en uno de los extremos del trofozoíto de *Naegleria* y el desplazamiento de la ameba por el movimiento flagelar se acelera.

Naegleria fowleri

El diámetro del quiste está en el ámbito de 7 a 15 μm . El quiste es esférico y presenta una doble pared con dos a tres poros. El trofozoíto es alargado y mide entre 15 a 30 μm . El cariosoma es grande y se observa rodeado de un halo; el citoplasma presenta granulaciones irregulares en tamaño.

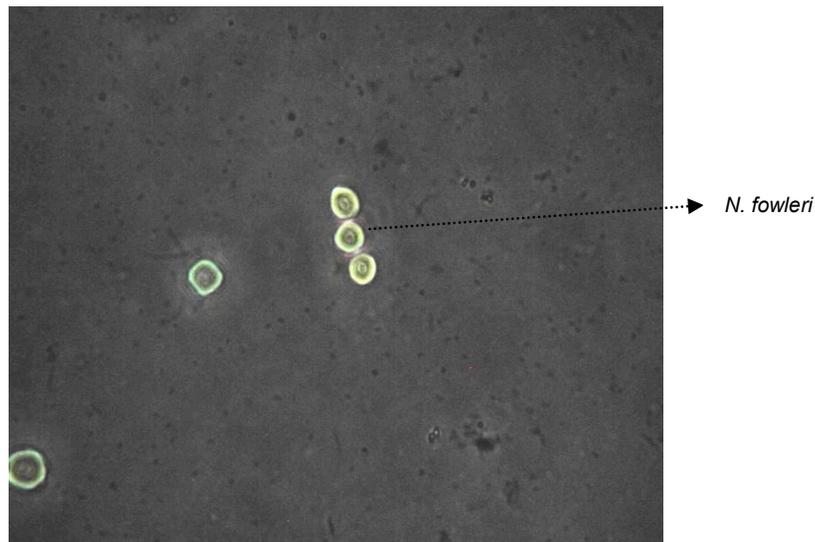


Figura 13. Quistes de *N. fowleri* con un diámetro de 9.84 μm (40 X). Microscopía de contraste de fases.

Naegleria gruberi

Presentan un quiste con un diámetro promedio de 10 a 16 μm . La morfología del quiste es variable. Los poros del quiste poseen un grueso anillo sobresaliente; la pared del quiste puede ser lisa, áspera o angular.

Género *Hartmannella* sp.

Las amebas del género *Hartmannella* son organismos pequeños que tienen un trofozoíto alargado y monopodial, su forma es "límax" y se desplazan por suaves movimientos de extensión del pseudópodo anterior redondeado. Los trofozoítos tienen una longitud promedio de 12 a 35 μm . Los quistes son esféricos o ligeramente ovoides con paredes simples y diámetro de 4.0 a 9.5 μm . No muestran una fase flagelar. *H. vermiformis* es patógena para el hombre, al cual causa EAG. Se han aislado amebas de las especies *H. tahitiensis*, *H. biparia* y *H. quadriparia* de tejidos de moluscos y peces.

Género *Rhizamoeba* sp.

Amebas con forma de límax cuando están en movimiento (locomoción muy rápida), con capa hialina y uroide posterior; a menudo flabeladas o con formas irregulares cuando no están en movimiento; los filamentos que forman al estar adheridas a un sustrato son los que le dan el nombre al género; uni y multinucleadas, el trofozoíto mide según los núcleos que contenga desde 40 a 500 μm . Quistes con paredes lisas sencillas o dobles con un promedio de 10 a 65 μm de diámetro.

Género *Saccamoeba* sp.

Es una ameba con apariencia sencilla que se mueven a un flujo constante (algunas especies pueden tener locomoción eruptiva); presentan una capa hialina y posee también uroide en la parte posterior así como finas proyecciones. El diámetro del quiste oscila entre 20 a 30 μm de longitud.

Género *Stachyamoeba* sp.

Las amebas pertenecientes a este género tienen forma aplanada con actividad eruptiva y la pared del quiste sin presencia de poros; presenta pseudópodos pequeños y finos. El diámetro del quiste con un promedio de 15 a 33 μm .

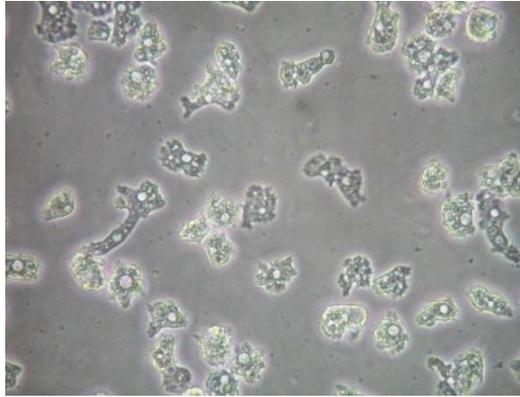


Figura 14. Trofozoítos de *Stachyamoeba* sp. (40 X). Microscopía de contraste de fases.



Figura 15. División de una ameba de vida libre por fisión binaria. a. (40 X) b. (20 X). Microscopía de contraste de fases.

3. Bacterias del género *Legionella* spp.

Por cuestiones metodológicas y de suministro de material y reactivos, en el primer muestreo no se tomaron muestras para la búsqueda de bacterias del género *Legionella* sin embargo, a partir del segundo y tercer muestreo se analizaron por métodos microbiológicos y de biología molecular el agua y biopelículas para detectar a la bacteria.

Alícuotas de agua y biopelícula fueron sembradas en placas de agar BCYE a 35 °C de temperatura. En promedio, después de siete días crecieron sobre la superficie de las placas colonias pequeñas, aperladas, de superficie tersa que fueron identificadas por morfología colonial como *Legionella* spp.

Todas las placas con medio selectivo de agar BCYE enriquecido con cisteína tanto para el muestreo II como para el III dieron positivo para el crecimiento de bacterias identificadas como *Legionella* spp. El medio enriquecido impone requerimientos de L-cisteína y pirofosfato férrico que muy pocas bacterias comparten. Sin estos dos compuestos las bacterias del género *Legionella* son incapaces de crecer. De acuerdo a la morfología colonial se determinó la presencia de *Legionella* ya que sus colonias poseen bordes redondos, enteros, de color blanco, con una tonalidad azul casi morado y con un diámetro de 3 mm aproximadamente (Figura 16).



Figura 16. Bacterias del género *Legionella* spp. en placas con agar BCYE

Por otra parte se analizaron 30 muestras de biopelícula del segundo y tercer muestreo con el fin de determinar si se encontraba presente la bacteria del genero *Legionella*, resultando todos los aislados positivo para *Legionella* spp.

4. Identificación de *Legionella pneumophila* por PCR.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

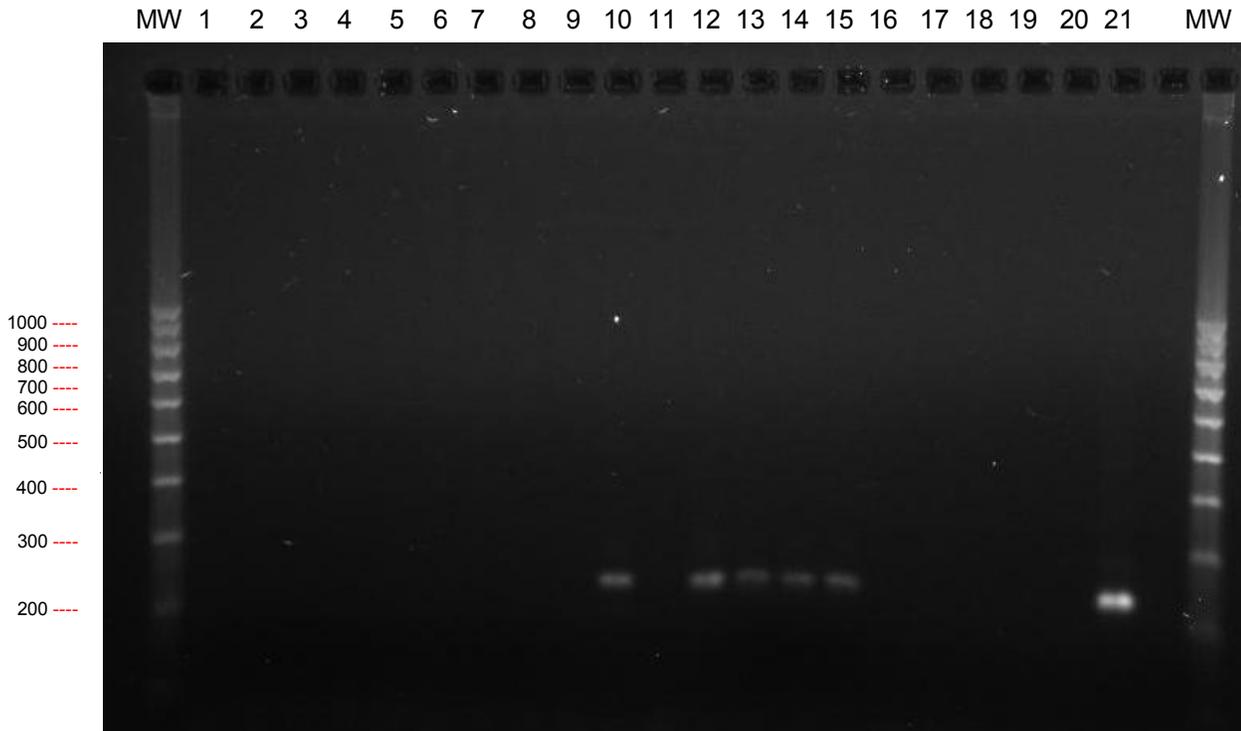


Figura 17. Amplificación positiva de cinco amplicones (carriles 10, 12, 13, 14 y 15) con un peso de 232 pb a partir de 20 aislados. En el carril 21 se amplificó una muestra de ADN de la cepa de *L. pneumophila* del ATCC. El pozo número 1 contiene un blanco de agua destilada. MW marcador molecular 1Kb.

Se llevó a cabo la extracción y purificación de ADN de los cultivos en agar BCYE del segundo y tercer muestreo y posteriormente se realizó la técnica de biología molecular PCR, reacción en cadena de la polimerasa, para demostrar la presencia de la bacteria *L. pneumophila* de los aislados.

De los aislados del segundo y tercer muestreo se realizó extracción y purificación de 30 muestras, los resultados del análisis de PCR evaluados a los aislados del segundo y tercer muestreo indican la presencia de 14 aislados positivos para *L. pneumophila*.

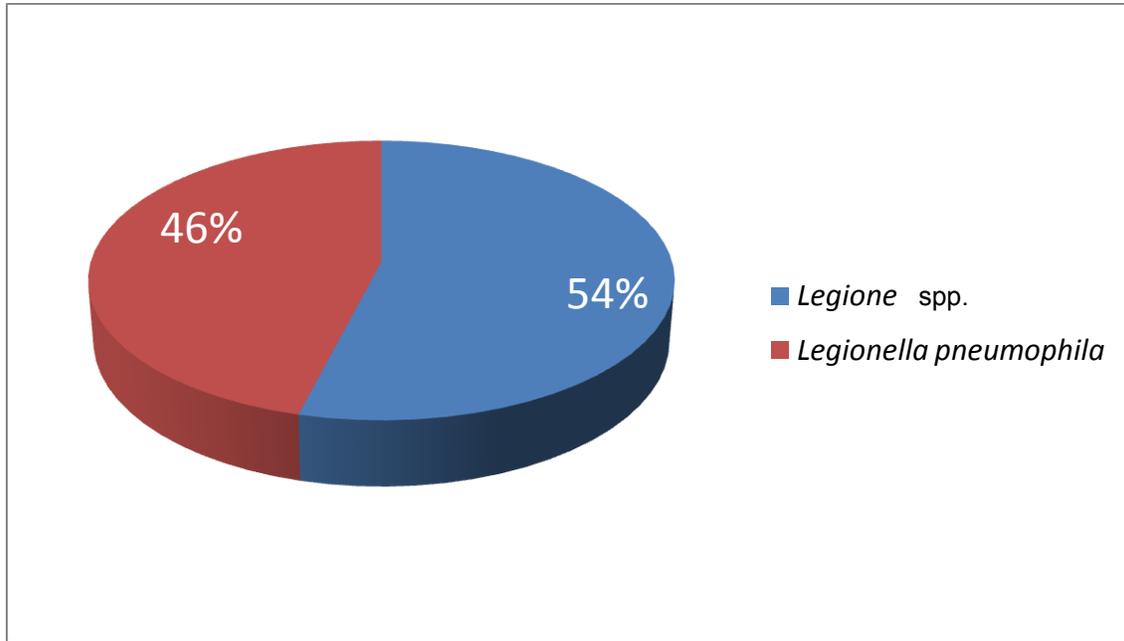


Figura 18. Se muestra el porcentaje de bacterias de la especie *L. pneumophila* identificada por biología molecular a partir del total de aislados bacterianos identificados como *Legionella spp.*

Una vez que se realizó la extracción y purificación de los aislados se hicieron tres ensayos de PCR con los mismos corrimientos en gel de agarosa al 2 % para comprobar la presencia o ausencia de la especie. Los resultados de los aislados positivos para *L. pneumophila* se muestran en el cuadro 8.

Cuadro 8. Identificación de la especie *L. pneumophila* por PCR.

Sitios de muestreo	Muestreo II		Muestreo III	
	<i>Legionella spp.</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella spp.</i>	<i>L. pneumophila</i>
1	+	-	+	+
2	+	-	+	+
3	+	-	+	+
4	+	-	+	+
5	+	-	+	+
6	+	-	+	+
7	+	-	+	-
8	+	+	+	+
9	+	-	+	+
10	+	+	+	-
11	+	-	+	+
12	+	-	+	+
13	+	+	+	-
14	+	-	+	-
15	+	-	+	+

5. Parámetros fisicoquímicos del sistema hidrotermal “El Géiser”

Temperatura del agua y de las biopelículas.

Con el objeto de determinar las condiciones ambientales en las que se desarrollan las AVL se evaluaron algunos parámetros fisicoquímicos en los sitios de muestreo. Los cuales fueron temperatura del agua y de las biopelículas, conductividad y pH.

De la información contenida en la figura 19 se resumen las temperaturas medidas durante los tres muestreos, la menor temperatura registrada correspondió para la estación 1 en el muestreo II y las temperaturas mayores fueron de 55.5 y de 59.0°C para los sitios 1 y 2 respectivamente en el muestreo I. Se observa también que en el transcurso de los tres muestreos hubo cambios en la temperatura del agua, siendo el promedio del agua de aproximadamente 35°C. En general durante el primer muestreo se registraron en el sistema hidrotermal las temperaturas más altas. Por lo que corresponde al segundo y tercer muestreo donde se tomo la temperatura directamente de las biopelículas, en la figura 19 se aprecia una disminución con respecto a la temperatura del agua, sin embargo en los sitios del 5 al 8 la temperatura continua siendo elevada a pesar de existir una barrera física entre el agua circundante del géiser y el interior de las biopelículas.

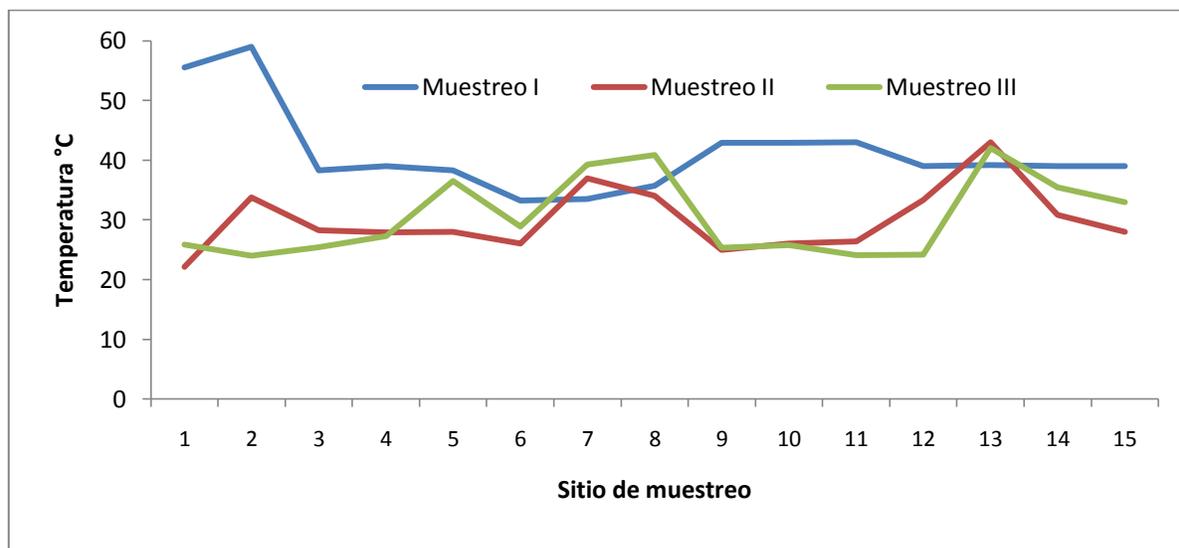


Figura 19. Datos de temperatura obtenidos durante tres muestreos en el sistema hidrotermal “El Géiser”.

pH

Los valores de pH de la figura 20, muestran las mediciones registradas en los tres muestreos, los datos indican un valor mínimo de 9.0 en el muestreo II y el mayor de 9.6 para el mismo muestreo. Las mediciones para los otros sitios de muestreos indican que el sistema no estuvo sometido a variaciones notables de pH, por lo que el sistema se comportó de manera estable durante el periodo de estudio.

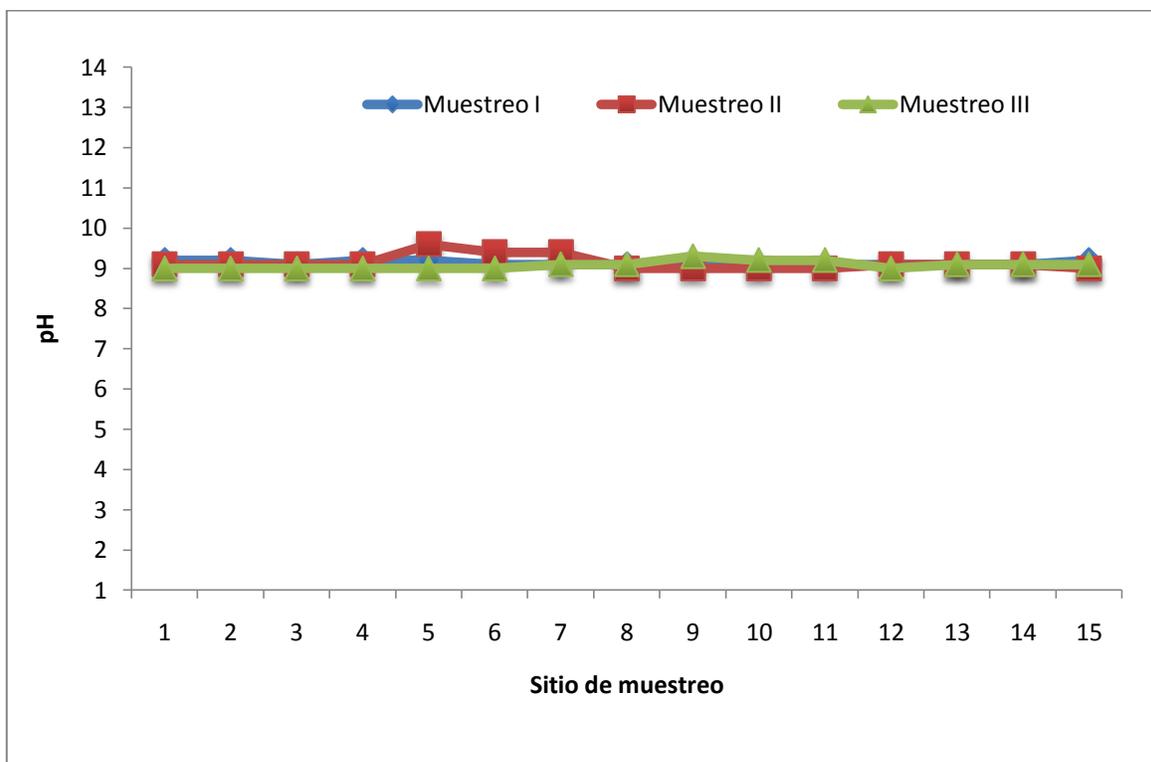


Figura 20. Datos de pH obtenidos durante tres muestreos en el sistema hidrotermal "El Géiser".

Conductividad

En la figura 21, se presentan los valores de conductividad medidos para las estaciones en los tres muestreos. El valor mínimo encontrado en el sistema fue de 1.1 mS y el máximo de 1.6 mS en los muestreos II y I respectivamente. La conductividad en el sistema es alta comparada con aquella medida en agua dulce, debido a la alta concentración de iones de azufre disueltos en el agua que llega al géiser. Sin embargo, las diferencias en la conductividad entre los diferentes sitios de muestreo se consideran mínimas por lo que este parámetro se considera muy estable para el lugar.

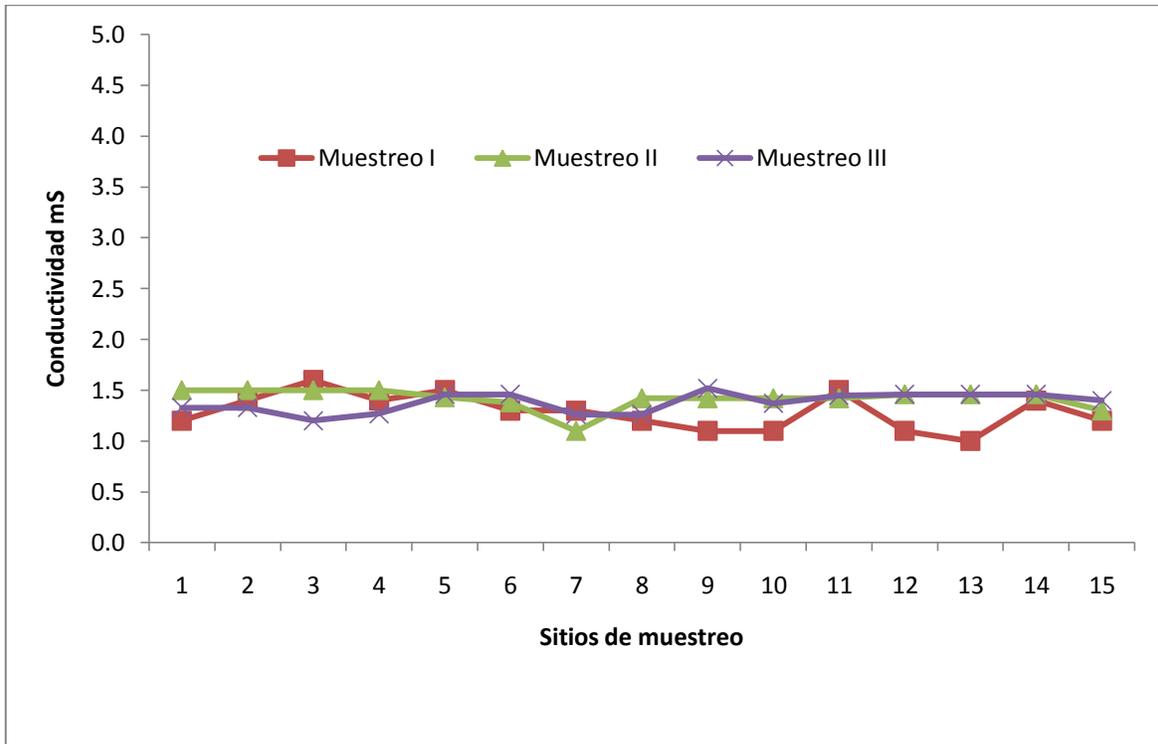


Figura 21. Registro de los valores de conductividad medido en los tres muestreos en el balneario hidrotermal "El Géiser".

VIII. DISCUSIÓN

En México son pocos los estudios que se han realizado y poca la información que se tiene en la actualidad de AVL y sobre todo de la relación que pueden tener estos protozoos con otros microorganismos, como por ejemplo con bacterias que puedan aumentar el potencial patógeno de las AVL si llegan a causar alguna patología en el ser humano. Por otra parte, el tratamiento de las enfermedades causadas por AVL aún no es completamente satisfactorio, de ahí sigue habiendo interés en el estudio de las AVL y de los hábitats en los que pueden estar en contacto con humanos (Rivera *et al.*, 1993).

Es evidente que en México existen tanto los parásitos como las condiciones ambientales para que se presenten la EAG como la MEAP y salta a la vista la necesidad de precisar su ecología. La presencia de AVL y en particular del género *Naegleria* ha sido detectada en varias fuentes en México por Rivera y colaboradores del grupo de la FES Iztacala de la UNAM. Una de ellas en 1984 realizada con muestras de agua de tres balnearios de aguas termales al igual que en este estudio en Hidalgo.

En este trabajo muestras de agua y biopelículas fueron concentradas por centrifugación, y luego inoculadas en medios de cultivo para el crecimiento de AVL. Aproximadamente siete días después crecieron sobre la superficie de las placas de cultivo organismos amebianos. La identificación de los aislados se realizó por la morfología, características del quiste y trofozoítos así como por la observación de su crecimiento a diferentes temperaturas, formación ameboflagelar. Los resultados mostraron 148 aislados de AVL pertenecientes a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Rhizamoeba*, *Hartmannella*, *Saccamoeba* y *Stachyamoeba*. Y veinticuatro de estas cepas pertenecían al género *Naegleria*. Con respecto al género *Acanthamoeba*, se lograron identificar a cuatro especies, *A. castellanii* y *A. culbertsoni*, *A. astronyxis* y *A. polyphaga* todas ellas reportadas como patógenas para el ser humano por Rivera *et al.*, (1989).

En la figura 4, se aprecian los géneros amebianos aislados en el balneario de aguas termales "El Géiser", los cuales fueron, *Acanthamoeba* spp., *Naegleria* spp., *Hartmannella* sp., *Vahlkampfia* spp., *Saccamoeba* spp., *Rhizamoeba* spp. y *Stachyamoeba* spp. Estos resultados demuestran que las AVL en esta área de estudio, están ampliamente distribuidas en todo el sistema y representan una amenaza para la salud de los usuarios de este tipo de ambientes.

Estudios previos en sistemas de balnearios que concuerdan con los resultados obtenidos para este tipo de organismos, es decir, con los géneros aislados en el balneario "El Géiser" fue realizado por Rivera *et al.* (1992) en piscinas y bañeras de fisioterapia en la Ciudad de México. La identificación de las amebas se realizó por la morfología utilizando claves taxonómicas especializadas y mediante isoelectroenfoque de las proteínas totales e isoenzimas en agarosa, en ese estudio se aislaron e identificaron géneros pertenecientes a *Acanthamoeba* spp., *Vahlkampfia* spp., *Hartmannella* sp. y *Naegleria* spp. los mismos que los hallados en este trabajo (Rivera *et al.*, 1993).

Otros cuerpos de agua de uso recreativo en México que han sido estudiados y comparados con este son los realizados por Gallegos en 1997, en la Huasteca potosina en el estado de San Luis Potosí, en el cual se lograron identificar amebas de los géneros *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp., *Hartmannella* spp. *Vahlkampfia* spp. y de manera importante *N. fowleri* así como varias especies de *Acanthamoeba*, como ya se ha mencionado estas amebas son consideradas muy patógenas para los seres humanos, organismos identificados también en los cuerpos de agua del área de estudio del presente trabajo.

Por lo que se refiere a las especies los resultados de la figura 6, muestran las especies aisladas, las cuales fueron, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. astronyxis*, *N. fowleri* y *N. gruberi*. Esto confirma que en este balneario existen especies consideradas patógenas para el ser humano, según Muñoz *et al.* (2003), *N. fowleri*, *A. polyphaga*, *A. castellanii* y *A. culbertsoni* han sido aisladas de numerosos cuadros meníngeos.

Otra investigación en la cual se demostró la presencia de AVL en piscinas fue realizada en Chile por Muñoz y colaboradores en 2003, en la cual utilizaron muestras de agua obtenidas de ocho piscinas públicas. La recolección fue de las superficies, fondo, canales y filtros. Las amebas fueron encontradas en cinco piscinas (62 %) dentro de las cuales estuvieron presentes los géneros *Naegleria* spp. y *Acanthamoeba* spp., así como también *N. fowleri*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni* y *A. castellanii*. Los sitios donde Muñoz *et al.* (2003) concentraron la mayor cantidad de muestras positivas de AVL fueron sitios que generalmente contenían desperdicios y residuos, siendo estos puntos ricos en materia orgánica. Este hallazgo es similar a lo encontrado en este trabajo ya que en el muestreo II y muestreo III, que fueron muestras únicamente de biopelícula, fue donde se logró aislar una mayor cantidad de aislados amebianos lo cual se explica por la alta concentración de amebas, hongos y bacterias.

Górnika y Kúzna-Grygiel, en 2003, estudiaron 10 piscinas cubiertas y tres al aire libre en la ciudad de Szczecin, con el propósito de determinar la presencia de cepas virulentas de amebas anfozóicas. Demostraron la presencia de *Acanthamoeba* spp. en todas las piscinas. Los estudios *post-mortem* de los ratones que habían sido inoculados con estas cepas revelaron las invasiones de las amebas en el cerebro, pulmones, hígado, riñones y bazo. Los resultados de esta investigación, coinciden con los obtenidos en “El Géiser”, ya que *Acanthamoeba* spp. fue también la ameba más frecuentemente aislada, como lo muestra la figura 4. Esto puede deberse a que este género soporta amplios ámbitos de temperatura, a diferencia del género *Naegleria* spp. que prefiere temperaturas mas elevadas.

Los resultados mostrados en la figura 5 también confirman que en los tres muestreos se presentaron relativamente los mismos géneros de AVL, lo que puede explicarse en gran medida debido a que el sistema hidrotermal de “El Géiser” no presenta una marcada variedad estacional. El sistema fue muy estable en sus parámetros fisicoquímicos durante el periodo de estudio y la temperatura del agua en el sistema tuvo pocos cambios en las diferentes épocas del año.

La presencia de AVL en el balneario "El Géiser" puede deberse a varios factores. Las amebas son el grupo más importante de protozoos en el suelo, comprendiendo cerca del 95 % de la biomasa total de los protozoos, lo cual es razonable ya que estos microorganismos son el grupo mejor adaptado para vivir en películas delgadas de agua, ya que en estas zonas se concentra la mayor cantidad de materia orgánica y bacterias, organismos de los cuales se alimentan (Bonilla y Ramírez, 1993). En las piscinas, pero sobre todo en las paredes del géiser, se acumula una gran cantidad de materia orgánica en las cuales se detectaron bacterias, hongos, algas y protozoos que pudieron haber favorecido la proliferación de amebas.

Las AVL incluyendo a las especies patógenas se encuentran en un amplio intervalo de habitats incluyendo sedimento, agua y suelo. En el suelo y en los ambientes acuáticos las AVL se alimentan selectivamente de bacterias y pueden controlar el número de estas y la diversidad de especies.

En los cuerpos de agua, las amebas se desarrollan también adheridas a partículas flotantes en la columna de agua o en los sedimentos. Las condiciones básicas que necesitan las amebas para sobrevivir en cualquier ambiente son alimento, oxígeno, agua y temperatura adecuada (Bonilla y Ramírez, 1993).

Otro de los factores que puede ser importante es que los bañistas posan sobre el géiser y de nuevo se introducen en las piscinas o viceversa y esto hace que los visitantes inoculen de AVL y bacterias al sistema hidrotermal estudiado. Esto confirma la opinión de Rivera *et al.* (1991), que sugieren que las amebas no se producen continuamente en el agua clorada de las piscinas, pero se van introduciendo una y otra vez con el suelo por las personas que se introducen a estas.

El agua caliente que produce el vapor que emana del géiser (que puede ser de hasta 80 °C) y la temperatura de las albercas también es un factor que aumenta la presencia de AVL ya que las amebas patógenas se consideran amebas termotolerantes. En general se acepta que los cuerpos de agua con temperaturas elevadas ofrecen un lugar libre de competencia y con escasa o nula depredación para AVL que son especialmente termotolerantes (Griffin, 1983).

Otro de los factores que influyó directamente sobre la presencia de AVL fueron las condiciones ambientales que se presentaron en este lugar al realizar los muestreos, ya que los resultados de estos apoyan la proliferación y supervivencia de las AVL (Figuras 19, 20 y 21).

Relación de las amebas con los factores ambientales.

Temperatura del agua

Uno de los factores que tiene un efecto directo en la supervivencia y abundancia de las AVL en el ambiente es la temperatura del agua. Algunos géneros como *Naegleria* y *Acanthamoeba* con representantes patógenos para el hombre, pueden tolerar, e incluso, se desarrollan más rápidamente por disminución de competencia con otros organismos termotolerantes en agua con temperaturas elevadas (Rivera *et al.*, 1983).

Se considera que algunas especies amebianas son capaces de sobrevivir a temperaturas mayores de 45 °C. En general las especies patógenas toleran temperaturas mayores de 40 °C; sin embargo, no todas las amebas que crecen a estas temperaturas son patógenas (Bonilla y Ramírez, 1993). Se tienen reportes también de que los quistes de *Acanthamoeba* pueden llegar a sobrevivir calentamientos momentáneos de hasta 80 °C (Reinares y Ferrer, 2008).

Los datos de laboratorio indican que más del 50 % de los quistes de *Naegleria* sobreviven durante 35 días con temperaturas de 22 a 40 °C. (Wellings *et al.*, 1977) y aunque las amebas se pueden encontrar en aguas costeras, dulces, residuales, calefacción y ventilación, piscinas mal cloradas, lagos artificiales, y en el agua caliente de descarga de plantas de energía el agua caliente a temperaturas por arriba de 30 °C, la contaminación del agua con la materia orgánica son ideales para la proliferación de *N. fowleri* (Shenoy *et al.*, 2002).

De acuerdo a los resultados de los parámetros fisicoquímicos la temperatura del agua se encontró en un ámbito entre 25.9 y 59 °C, es decir, agua caliente que sugiere que este factor pudo estimular directamente la presencia de AVL, ya que estos organismos toleran e incluso se desarrollan bien en aguas con temperaturas elevadas.

pH

Los valores de pH registrados fueron constantes a pH alcalino de 9.1 a 9.6 lo que se considera muy estable. Estudios previos indican que las AVL toleran bien ámbitos de pH entre 4 y 12 (Kinnear, 2003) y en el ambiente acuático se considera que las AVL pueden encontrarse en un intervalo de pH en entre 4.5 y 9.5. (Bonilla y Ramírez, 1993) Por otra parte el ámbito de pH tolerado por las AVL potencialmente patógenas *in vitro* fluctúa de 4.6 a 9.5 (Gallegos, 1997).

Los resultados de pH para los muestreos están en un ámbito óptimo para soportar el crecimiento y supervivencia de estos organismos y los valores del parámetro en el sistema no son un factor limitante para su desarrollo.

Estudios de la ameba *Naegleria* spp. *in vitro* han mostrado que es capaz de tolerar ámbitos de pH amplios (4.6-9.5) e incluso sus quistes soportan hasta un pH de 2.1 (Reinares y Ferrer, 2008). Por otra parte se considera que los valores de pH mayores a 7.6 disminuyen la eficiencia desinfectante del cloro aunque el sistema de "El Géiser" es un balneario de agua corriente no clorada.

Conductividad

Los datos de conductividad medidos en el géiser fueron de 1.1 a 1.6 mS/cm, lo cual indica una alta concentración de solutos entre los que destacan la presencia de sulfatos. Kinnear (2003) menciona que los productos disueltos sulfatados aumentan las poblaciones de bacterias del azufre las cuales pueden ser utilizadas por las amebas como fuente de carbono.

De los parámetros fisicoquímicos que fueron medidos se considera que los dos factores que tuvieron una gran importancia y que sostienen la supervivencia de AVL en estos ambientes es la temperatura del agua y la temperatura de las biopelículas, ya que en los tres muestreos en las piscinas o en las biopelículas se registraron temperaturas óptimas en las cuales pueden crecer las AVL.

Por lo que respecta al mantenimiento de este balneario, se observó que al haber presencia de materia orgánica en el géiser y en las piscinas, esto representa una entrada para numerosos microorganismos y aunque el número de aislamientos fue menor en las piscinas que en el géiser se encontraba materia orgánica en piscinas lo cual no debería de haberse presentando ya que se supone que estas albercas tienen un periodo seguido de mantenimiento.

Es importante mencionar que existen reportes en los que se afirma que algunas veces la concentración de cloro que se les administra a las piscinas es insuficiente para eliminar la flora amebiana. Górnika y Kuzna-Grygiel (2004) demostraron resultados positivos de aislamiento de amebas en agua clorada con una concentración aceptable de 0.2 a 0.5 mg/ml y tratamiento adicional de ozono, sin embargo, este hallazgo confirma que en algunas ocasiones esta concentración de cloro no destruye AVL.

El mismo autor también ha demostrado que *A. culbertsoni* muestra un crecimiento positivo en cultivos, incluso después de 3 horas de contacto con 40 mg/ml de cloro.

Según Rivera *et al.* (1993), el cloro a concentraciones superiores de 1.5 mg/ml destruye efectivamente formas de quistes de AVL. Por otra parte (Griffin, 1972) sugiere que la calefacción y la cloración del agua elimina otros microbios que pueden ser una competencia para las amebas y crea mejores condiciones para las amebas resistentes. Esto puede ser otra explicación de la presencia de AVL en las piscinas, además de que el agua de estas es abastecida por "El Géiser".

Las AVL están ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos de importancia cada vez mayor y lamentablemente no existen referencias acerca del número de organismos que deben estar presentes en el ambiente para producir infecciones, tampoco existe una norma que estipule cual es el número máximo permisible de AVL en cuerpos de agua (Gallegos, 1997) pero es importante mencionar que Hoffmann y Michel (2001), demostraron la presencia de AVL en seis plantas potabilizadoras en el proceso de la purificación de la superficie de agua y en un suministro de agua potable. Los resultados de este estudio confirmaron que las AVL están ampliamente distribuidas incluso en la purificación de agua potable y de suministro lo que confirma que las amebas pueden representar un riesgo para salud de los usuarios también en este tipo de ambientes.

Este trabajo muestra que se debe profundizar más en las investigaciones sobre el comportamiento y la ecología de estos protozoos causantes de enfermedades del SNC. Algunos autores plantean que los casos subclínicos debidos a AVL son posiblemente mas

frecuentes de lo que se piensa ya que se han descrito las amebas como parte de la flora orofaríngea. Otros autores han planteado el posible papel de las amebas como vectores para la entrada de otros microorganismos al SNC.

La afectación producida por amebas es un evento raro mundialmente, ya que se estima un riesgo de infección por *Naegleria* de siete casos por mil millones de episodios de natación en aguas contaminadas, sin precisar la concentración del protozoo. En EE.UU. en el periodo de 1989-2000, el CDC, documentó 24 casos de MEAP (Cubero-Menendez y Cubero-Rego, 2004) y aunque la incidencia exacta de las infecciones humanas por estas amebas no es conocida, hasta la fecha se han documentado al menos 440 casos en todo el mundo de infecciones del SNC causadas por *N. fowleri*, *Acanthamoeba* spp., y *B. mandrillaris* (Qvarnstrom *et al.*, 2006).

Pero quizá uno de los puntos más importantes se refiere al diagnóstico clínico oportuno. En dos casos de MEAP ocurridos en México, los desenlaces fueron distintos debido a que uno de los casos ocurridos en Monterrey fue diagnosticado mediante punción de LCR con observación de trofozoítos. La misma observación fue hecha por Valenzuela en otro de los casos que se presentó en Mexicali aunque en este no dio tiempo de iniciar el tratamiento. Conviene recalcar pues la importancia del examen inmediato y dirigido del LCR en fresco ya que es la única posibilidad de identificación oportuna del parásito y de iniciar el tratamiento (Valenzuela *et al.*, 1984).

La identificación rápida y específica de AVL en muestras clínicas es de crucial importancia. En situaciones en las que el LCR se recoge de los pacientes todavía vivos y en fase de evaluación, los tiempos de respuesta rápida en el laboratorio puede hacer toda la diferencia. El elevado número de casos mortales de MEAP se debe en parte a la alta frecuencia de diagnóstico erróneo de la infección como meningitis bacteriana y el posterior tratamiento con fármacos antibacterianos que no afectan a la ameba (Qvarnstrom *et al.*, 2006). Pero si se considera a las AVL como causantes de meningoencefalitis en los diagnósticos diferenciales iniciales, tal vez podría aumentarse la probabilidad de supervivencia de los pacientes, especialmente en los casos de infecciones por MEAP.

Este trabajo recalca también la importancia de estudiar a las biopelículas ya que estas comunidades se consideran el puerto de entrada de numerosos microorganismos, algunos de los cuales son patógenos humanos, como *L. pneumophila* (Declerck *et al.*, 2007). Se ha encontrado la asociación *Legionella*-protozoo y también a la bacteria libre, la amplia disponibilidad de nutrientes en las biopelículas ha llevado a algunos investigadores a plantear que la bacteria *Legionella* podría sobrevivir y multiplicarse extracelularmente en ausencia de protozoos hospederos. Sin embargo, se acepta de modo generalizado que esta bacteria, en ausencia de protozoos, puede persistir en biopelículas durante largos periodos, pero no multiplicarse (Reinares y Ferrer, 2008).

Los resultados de esta investigación también confirman que las biopelículas flotantes de fuentes antropogénicas y ambientes naturales acuáticos albergan una gran diversidad de microorganismos, entre estos un gran número de bacterias Gram negativas que son mutuamente unidas por un matriz de polisacáridos. Además, ofrece un sustrato adecuado para todos los protozoos, AVL y ciliados (Declerck *et al.*, 2009). Esto puede ayudar a explicar la presencia de AVL en las biopelículas de "El Géiser", ya que al haber una gran cantidad de materia orgánica, existe una gran variedad de microorganismos, algunos de estos utilizados como alimento para las amebas. El género *Naegleria* spp. Puede albergar

bacterias patógenas como *Legionella* spp. y puede actuar como vector de enfermedades bacterianas (Macleod et al., 2004), y *Acanthamoeba* spp, *N. fowleri* y *Hartmannella* spp. pueden servir también como un vehículo para el transporte de *Legionella* spp. (Rivera et al., 1993).

En este estudio se demostró la presencia de AVL, así como también la de la bacteria *Legionella* spp, en los medios de cultivo en agar BCYE, esto puede explicarse porque las amebas le proporcionan a *Legionella* spp. un micronicho que les ofrece una fuente de nutrientes, así como la protección de tensiones ambientales y la competencia microbiana (Storey et al., 2004).

En este punto es importante recalcar que durante los muestreos se encontró la presencia de bacterias del género *Legionella* spp. en todos los sitios de muestreo al igual que en amebas de vida libre por lo que posiblemente ambos organismos están asociados estableciendo relaciones endosimbióticas.

En esta investigación se atribuye la presencia de la bacteria *Legionella* spp, básicamente a dos factores: a) la temperatura de las biopelículas, que prevalecieron durante los dos últimos muestreos, ya que los valores de temperatura fueron los óptimos para su crecimiento y supervivencia, ya que la temperatura óptima de crecimiento de *L. pneumophila* es de 36 °C con un límite de 15 a 43 °C (Declerck et al., 2007); b) la presencia de materia orgánica que le confiere protección a las amebas y estas a su vez a la bacteria. La multiplicación y acumulación de las bacterias en amebas y la correspondiente pérdida de amebas son características comúnmente observadas en los estudios *in vitro* de *Legionella* con amebas (Newsome et al., 1998).

Winięcka-Krusnell y Linder (2001) afirman que las epidemias de legionelosis y los casos mortales de meningitis, tanto en hospitales y en la comunidad, parecen ser la punta visible del iceberg acerca de la compleja relación entre amebas y bacterias que habitan biopelículas. En México solo existen dos casos de neumonía causados presuntamente por *Legionella* spp, sin embargo, el reporte de los mismos no menciona el aislamiento del agente causal en dos adultos que presentaban tabaquismo como factores de riesgo.

En la presente investigación se utilizó la técnica de biología molecular, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como una herramienta para demostrar la presencia de *L. pneumophila*, al igual que Mahbubani et al. (1990), que siguieron los métodos para la detección de *Legionella* en fuentes de agua del medio ambiente, basándose también en la técnica de PCR. Todas las especies de *Legionella*, incluyendo 15 serogrupos de *L. pneumophila* probados, fueron detectados mediante amplificación por PCR de una secuencia de 104 pb. Las cepas de *L. pneumophila* fueron detectadas basadas en la amplificación de una parte de la región codificante del gen potenciador de la infectividad del macrófago (MIP).

En el año 2007, Declerck y colaboradores realizaron una investigación en biopelículas presentes en tuberías de distribución en sistemas acuáticos de origen antropogénico, revelaron el impacto de esta comunidad y *A. castellanii* en la reproducción de *L. pneumophila*. Utilizando cultivos y PCR en tiempo real, los resultados mostraron claramente que la biopelícula asociada a la bacteria *Legionella* spp. sólo aumentó después de la replicación intracelular en *A. castellanii*. La tinción de muestras de biopelícula reveló que 48 horas después de la adición de amebas, la población de estas

disminuyó y se replicaba aun mas la bacteria *Legionella* spp. En este estudio se demostró que las amebas como *A. castellanii* pueden desempeñar un papel crucial en el aumento y la proliferación de *L. pneumophila* en los sistemas acuáticos antropogénicos y por lo tanto en la ocurrencia de la enfermedad del legionario.

En el sistema hidrotermal “El Géiser” se mostró que *A. castellanii* estuvo presente en un 16% en los tres muestreos (Figura 7), lo que sugiere que la presencia de esta ameba pueda ayudar a aumentar la proliferación y la supervivencia de *Legionella* spp.

Otra de las amebas presentes en éste estudio fue *A. polyphaga* con una abundancia de 32 % en los tres muestreos, (Figura 7), lo cual coincide con lo estudios realizados por Newsome *et al.* (1998) quienes describen el aislamiento y la caracterización de una bacteria dentro de una ameba de una muestra de suelo. En el laboratorio, la bacteria se multiplicó dentro de *A. polyphaga*. La multiplicación extracelular se observó en agar BCYE medio utilizado también para demostrar la presencia de *Legionella* spp. en esta investigación. En cuanto a los cultivos bacterianos, el 100 % de los aislados resultaron positivos para *Legionella* spp. en agar BCYE. De acuerdo a la morfología colonial se determinó la presencia de *Legionella* spp.

Rogers *et al.* (1994) aislaron *L. pneumophila* de biopelículas a 40 °C, a su vez, demostraron que *L. pneumophila* tiene la capacidad de crecer y sobrevivir en una amplia gama de temperaturas de hasta 50 °C. Sin embargo, la viabilidad de los organismos de *L. pneumophila* se mantuvo durante extensos períodos de tiempo, lo que indica que las biopelículas les confieren protección a las bacterias. Esto sugiere que los sistemas de agua caliente de funcionamiento a 50 °C pueden contener una reserva de *L. pneumophila* y de una gran población de microorganismos en biopelículas. Por lo tanto, no es de extrañar que los resultados obtenidos en este trabajo coincidan con otras observaciones.

Estos estudios demuestran la importancia de realizar pruebas de biología molecular para detectar la presencia de ciertas especies patógenas para el ser humano, ya que el diagnóstico oportuno es esencial para el pronóstico de enfermedades causadas por AVL o por bacterias del genero *Legionella* spp, y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa se considera una prueba rápida y confiable.

IX. CONCLUSIONES

1.- La diversidad de amebas de vida libre recolectadas en el balneario "El Géiser" estuvo representada por 148 aislados pertenecientes a siete géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Saccamoeba*, *Rhizamoeba* y *Stachyamoeba*.

2.- Se identificaron 76 aislados a nivel de especie, del género *Acanthamoeba* las especies aisladas en el área de estudio fueron: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni* y *A. astronyxis*, todas reportadas en la literatura como patógenas para el humano, lo cual representa un riesgo para la integridad de la salud de los usuarios en este sistema acuático.

3.- Cinco aislados fueron identificados como *Naegleria fowleri*, una ameba que se han descrito extensamente en la literatura como altamente patógena por producir MEAP en los seres humanos.

4.- Se identificó la presencia de la bacteria del género *Legionella* y de acuerdo a los resultados de la técnica de biología molecular (PCR), se concluye que la especie *L. pneumophila* (causante de neumonía) se encuentra presente al resultar positiva en 14 de las 30 muestras estudiadas.

5.- Los datos muestran la presencia de *L. pneumophila* y amebas de vida libre, conviviendo de manera estrecha y como habitantes comunes de las biopelículas fijas y flotantes presentes en el balneario "El Géiser" en Tecozautla, estado de Hidalgo.

6.- Los factores ambientales que favorecieron la presencia de amebas de vida libre patógenas y *L. pneumophila* en este estudio fueron la temperatura del agua y del ambiente, además de la presencia de materia orgánica que se encontraba en las biopelículas, lo cual puede promover el crecimiento y proliferación de estos organismos.

7.- Estas observaciones sugieren que existe un potencial riesgo para los usuarios del balneario "EL Geiser" ya que se han aislado e identificado AVL y *Legionella pneumophila*, y la patogenicidad de ambos tipos de organismos puede ser potencializada y causar infecciones en los humanos que se bañan en las aguas estudiadas.

X. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos, considerando las conclusiones anteriores y reconociendo que en este sistema recreacional hay presencia de AVL con potencial patógeno, así como la presencia de *L. pneumophila* es necesario crear un sistema de vigilancia en el cual se consideren los lineamientos específicos para la detección de casos, estudio de áreas y factores de riesgo así como la implementación de medidas de prevención y control. En lo que se refiere a la vigilancia epidemiológica las acciones que se podrían realizar son las siguientes:

1. Difundir información sobre AVL y *L. pneumophila* a los usuarios de los sistemas recreacionales artificiales y naturales, así como también al personal médico y de laboratorio.
2. Capacitar al personal médico para detectar posibles casos de encefalitis, meningoencefalitis y QA por AVL y posibles casos de neumonía por *L. pneumophila*, para prescribir y administrar la terapia adecuada para cada uno de los pacientes. Se debe capacitar también al personal de los laboratorios para identificar estos organismos y para el monitoreo de posibles fuentes de infección en las áreas de alto riesgo.

Se debe enfocar también la atención a los hábitos de los bañistas, por ejemplo por negligencia o falta de infraestructura, los usuarios no se bañan previamente o no se lavan los pies antes de meterse a las piscinas, esto hace que remuevan los sedimentos de las piscinas al géiser y viceversa e incorporan materia orgánica que sirve como alimento para las amebas.

Se recomienda también establecer campañas para los usuarios de estos sistemas promoviendo el uso de narigueras en caso de practicar clavados, esto para evitar que el agua entre violentamente a la nariz, facilitando la inoculación directa de AVL.

Es importante vigilar y analizar con mayor frecuencia la calidad microbiológica de las aguas de los sistemas recreacionales.

Por último se recomienda un adecuado mantenimiento de las piscinas añadiendo (en aquellas donde sea posible), niveles de cloro suficientes para eliminar quistes de AVL y a la bacteria *L. pneumophila*. En el caso del balneario "El Géiser" la cloración no sería conveniente debido al flujo continuo del agua en las albercas, en cambio la limpieza frecuente para remover los sedimentos parece una mejor estrategia de prevención para AVL y *L. pneumophila*.

El hallazgo de AVL y *L. pneumophila* causantes de meningoencefalitis y neumonía respectivamente, en el balneario "El Géiser" sugiere un llamado de alerta para mantener una vigilancia hacia los casos de meningoencefalitis y neumonías de etiología desconocida en los hospitales.

XI. LITERATURA CITADA

Behets, J., Declerck, P., Delaedt, Y., Verelst, L. y Ollevier, F. 2006. Survey for the presence of specific free-living amoebae in cooling waters from Belgian power plants. *Parasitol. Res.* **100** (6):1249-1256.

Betancourth, M., Botero, J. E. y Rivera, S. P. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colomb. Med.*: **35** (1):34-39.

Bonilla, L. P. y Ramírez, F. E. 1993. Sistema de tratamiento de lechos de raíces. Las amebas de vida libre. *Rev. Inf. Tec.* **15**:22-25.

Borella, P., Montagna, M. T., Romano–Spica, V., Stampi, S., Stancanelli, G., Triassi, M., Neglia, R., Marchesi, I., Fantuzzi, G., Tato, D., Napoli, C., Quaranta, G., Laurenti, P., Leoni, E., De Luca, G., Ossi, C., Moro, M. y Ribera D'Alcala, G. 2004. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg. Infect. Dis.* **10** (3):457-464.

Calderón, V. A. 2008. Aislamiento de la Ameba Patógena *Naegleria fowleri* del Agua de los Canales de Riego de Mexicali, Baja California. Tesis para obtener el título de: Maestro en Ciencias (Biología Celular). México. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 84 pp.

Campos, C., Loret, J. F., Cooper, A. J. y Kelly, R. F. 2003. Disinfection of domestic water systems for *Legionella pneumophila*. *J. Water SRT – Aqua.* **52**:341-354.

CDC. 1997, Legionnaires disease associated with a whirlpool spa display. *MMWR.* **46** (4):82-86.

Cubero-Menéndez, O. y Cubero-Rego. D. 2004. Meningoencefalitis amebiana primaria: comunicación de un caso. *Rev. Neurol.* **38** (4):336-338.

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, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* **10** (10):1835-1837.

Cuevas, P. M., Smoje, P. G., Jofré, M. L., Lederman, D. W., Noemí, H. I., Berwart, C. F., Latorre, L. J. y González, B. S. 2006. Meningoencefalitis granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Rev. Chil. Infect.* **23** (3):237-242.

Declerck, P., Behets, J., Van Hoef, V. y Ollevier, F. 2007. Detection of *Legionella* spp. and some of their amoeba hosts in floating biofilms from anthropogenic and natural aquatic environments. *Wat. Res.* **41**:3159-3167.

Declerck, P., Behets, J., Margineanu, A., Van Hoef, V., De Keersmaecker, B. y Ollevier, F. 2009. Replication of *Legionella pneumophila* in biofilms of water distribution pipes. *Microbiol. Res.* **164** (6):593-603.

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

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. 2002. A Century of Research on the Amoeboflagellate Genus *Naegleria*. *Acta Protozool.* **41**:309–342 .

Fields, B. S., Benson, R. F. y Besser, R. E. 2002. *Legionella* and Legionnaires disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (3):506-526.

Gallegos, N, E. 1997. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuerpos de agua de uso recreativo en el estado de San Luis Potosí. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias. Facultad de Ciencias. UNAM. 132 pp.

García-Rodríguez, J. A. y Picazo, J. J. 1999. *Compendio de Microbiología Médica*. 2ª Ed. Harcourt. España. 172-173 pp.

Guerrieri, E., Bondi, M., Ciancio, C., Borella, P. y Messi, P., 2005. Micro-and macromethod assays for the ecological study of *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiol Lett.* **252**:113-129.

Górnika K. y Kúzna-Grygiel. 2004. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of Szczecin. *Ann. Agric. Environ. Med.* 2004. **11**:233–236.

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. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* **47** (2):524-528.

Greub, G. y Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **17** (2):413-433.

Griffin, J, L. 1972. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amebas. *Science.* **178**:6.

Griffin, J. L. 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: Isolations, competitors, ecologic interations and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J. Protozool.* **30**:403-409.

Hajia, M., Hossieni-Doust, R. y Rahbar, M. 2004. Identificación of *Legionella pneumophila* in bronchoalveolar lavage specimens by PCR. *Arch. Iranian Med.* **7** (4): 287– 291.

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

Huerta-Torrijos, J., Lisker-Halpert, A., Nuñez-Pérez, R. C., Kimura-Fujikami, K., Vazquez-Figueroa, S. y Lázaro-Castillo, J. 1995. La neumonía atípica por *Legionella pneumophila*. Informe del segundo caso en México. *Gac. Méd.Mex.* **131**: (5-6)587-590.

Jaulhac, B., Nowicki, M., Borstein, M., Meunier, O., Prevost, G., Piemont, Y., Fleurette, J. y Monteil, H. 1992. Detection of *Legionella* spp. in bronchoalveolar lavage fluids by DNA amplificación. *J. Clin. Microbiol.* **30** (4): 920-924.

Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brocks, G. F., Butel, J. S. y Ornston, L. N. 1990. *Microbiología Médica*. El Manual Moderno. México. 279-284 pp.

Jennings, S. G., Moran, A. P. y Carroll, C. V. 2003. Bioaerosols and Biofilms. In *Biofilms in Medicine, Industry and Environmental Biotechnology; characteristics, analysis and control*. IWA Publishing, London, UK. 10: 160-178 pp.

John, D. T. 1993. Oportunistically pathogenic free-living amoebae. *En parasite Protozoa*, Ed. Por Kreier J. P. y Baker J. R. Academic Press, Nueva York. 140-246.

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

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

Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Janda, W. M., Sommers, H. M. y Winn, W. C., 1992. *Diagnóstico Microbiológico*. 2ª Ed. Panamericana. México. 353-371 pp.

Kramer, M. H., Lerner, C. J. y Visvesvara, G. S. 1997. Kidney and liver transplants from a donor Infected with *Naegleria fowleri*. *J. Clin. Microbiol.* **35** (4): 1032-1033.

Lares-Villa, F., De Jonckheere, J. F., De Moura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernandez-Quintanilla, G., Ruiz-Matus, C. y Visvesvara, G. S. 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, México: Study of the Isolates. *J. Clin.Microbiol.* **31** (3):685-688.

Llop, H. A., Valdés-Dapena, V. M. y Zuazo, D. J. L. 2001. Microbiología y Parasitología Médica. Tomo I. Ciencias Médicas. La Habana. 325-332 pp.

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

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.

Mahbubani, M. H., Bej, A. K., Millar, R., Haff, L., DiCesare, J. y Atlas, R. M., 1990. Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Molecular and Cellular Probes.* **4**:175-187.

Marciano-Cabral, F. y Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. *Clin. Microbiol. Rev.* **6** (2):273-307.

Marín, V. I. y Montes, L. D. 1990. Neumonía por *Legionella pneumophila* Informe de un caso. *Investigación Medica Internacional.* **17** (1):205-209.

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

Martínez, A. J. y Amado-Ledo, D. E. 1979. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amebas de vida libre. *Protozoología, epidemiología y neuropatología. Morfología Normal y Patológica.* **B3**:679-704.

Muñoz, V., Reyes, H., Toche, P., Cárcamo, C. y Gottlieb, B. 2003. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol. Latinoam.* **58**: 106 – 11.

Newsome, A. L., Scott, T. M., Benson, R. F. y Fields, B. S. 1998. Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* **64** (5):1688-1693.

Ohno, A., Kato, N., Yamada, K. y Yamaguchil, K. 2003. Factors Influencing Survival of *Legionella pneumophila* Serotype 1 in Hot Spring Water and Tap Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (5):2540-2547.

Omaña, M. M. 1997. Estudio comparativo de tres cepas del género *Acanthamoeba* responsables de los primeros casos detectados de queratitis amebiana en México. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Microbiología. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM. 163 pp.

Page, F. C. 1966. *Taxonomical Criteria for Small Amoebae, with a Redefinition of the Genera Hartmanella and Acanthamoeba and Descriptions of Three New Species*. Tesis Doctoral, University of Wisconsin. 150 pp.

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

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

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

Qvarnstrom, Y., Visvesvara, G. S., Sriram, R. y Da Silva, A. J. 2006. Multiplex Real-Time PCR Assay for Simultaneous Detection of *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, and *Naegleria fowleri*. *J. of Clin. Microbiol.* **44**:10.3589-3595.

Reinares, O. J. y Ferrer, S. B. 2008. Notas sobre la ecología de *Legionella*: “ El caballo de Troya”. *Salud pública*. 54-59.

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

Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E. y Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming-pool waters in Mexico City. *J. Environ. Res.* **32**:295-211.

Rivera, F., Medina, F., Ramírez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G. y Robles, E. 1984. Pathogenic and free-living protozoa isolated by culture from the nasopharyngeal and oral regions of odontological patients. *J. Environ. Res.* **33**:428-440.

Rivera, F., Sánchez, M. R., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P. y Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *J. Environ. Res.* **42**:149-154.

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

Rivera, F., Gallegos, E., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Ortiz, R. y Rodríguez, S. 1991. Félix Dujardín (semblanza histórica). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* **42**:13-17.

Rivera, F., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos, E. Labastida, A. y Chávez, M. 1992. Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution*. **61**:17-33.

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

Rocha-Azevedo, B., Tanowitz, H. B. y Marciano-Cabral, F. 2009. Diagnosis of Infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 1-19.

Rogers, J., Dowset, A. B., Dennis, P. J., Lee, J. V. y Keevil, C. W. 1994. Influence of Temperature and Plumbing Material Selection on Biofilm Formation and Growth of *Legionella pneumophila* in a Model Potable Water System Containing Complex Microbial Flora. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (5):1585-1592.

Rodríguez-Pérez, E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. *Infectol.* **4** (10):263-266.

Schuster, F. L. y Visvesvara, G. S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal for Parasitology*. **34**:1001-1027.

Shadrach, W. S., Rydzewski, K., Laube, U., Holland, G., Ozel, M., Kiderlen, A. F., y Flieger, A. 2005. *Balamuthia mandrillaris*, Free-Living amoeba and opportunistic agent of encephalitis, is a potential host for *Legionella pneumophila* bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **71** (5):2244-2249.

Shenoy, S., Wilson, G., Prashanth, 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.

Shin, Ho-Joon e Im, Kyung-IlJ. 2004. Pathogenic free-living amoebae in Korea. *Korean J. Parasitol.* **42** (3):93-119.

Storey, M. V., Winiacka-Krusnell, J., Ashbolt, N. J. y Stenstrom, T-A. 2004. The efficacy of heat and chlorine treatment against thermotolerant *Acanthamoebae* and *Legionellae*. *Scand. J. Infect. Dis.* **36**:656-662.

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

Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D. y Greub, G. 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a Hospital water Network. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (4):2428-2438.

Türegten, I., Sungur, E. I. y Cotuk, A. 2005. Enumeration of *Legionella pneumophila* in cooling tower water systems. *Environmental Monitoring and Assessment.* **100**:53-58.

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.

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

Visvesvara, G. S., Moura, H. y Schuster, F. L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Immunol Med Microbiol.* **50**:1-26.

Wellings, F. M., Amuso, S. L. y A. L. Lewis. 1977. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* **34** (6):661-667.

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

ANEXOS

1. MEDIO NNE.

2. Medio PBSGM (Medio de Chang).

3. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS.

4. PROTOCOLO PARA PCR ESTÁNDAR.

5. GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.

ANEXO 1. Medio NNE.

Para aislar AVL se utilizaron placas de agar no nutritivo con una capa de bacteria *Enterobacter aerogenes*. Este medio se conoce como medio NNE. El medio NNE proporciona las sales y la fuente de carbono, en forma de bacterias, necesarios para el sostenimiento de las AVL.

Se prepara con los componentes de la solución salina de Neff y agar bacteriológico a una concentración de 1.5 % (De Jonckheere, 1984).

Medio NNE

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

El medio NNE se prepara mezclando los componentes en seco y después agregando el agua destilada que se calienta hasta ebullición. Se esteriliza a 121°C durante 15 min y cuando se enfría un poco se vacían de 15 a 20 ml de agar en placas de Petri previamente esterilizadas.

Cuando el agar solidifica en las placas, se inocula una solución de la bacteria *E. aerogenes*. La bacteria se obtiene cosechándola a partir de cultivos puros en solución con agua destilada e inactivándola en baño de agua a 70°C por 30 min.

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

ANEXO 2. Medio PBSGM (Medio de Chang).

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

Medio PBSGM

Biotriptasa	16.6 g
Dextrosa	2.7 g
Na ₂ HPO ₄	1.5 g
KH ₂ PO ₄	0.9 g
Agua destilada	1000 ml

Esta solución se envasa en tubos con tapón de rosca, vaciando en cada tubo 2.7 ml de medio. Se esterilizan los tubos con el medio a 15 lb de presión durante 15 min. Después de esterilizado el medio y ya frío, se agrega a cada tubo 0.3 ml de suero fetal de ternera adicionado con penicilina y kanamicina a una concentración de 200 mg/ ml de cada antibiótico. Los tubos se conservan en refrigeración.

ANEXO 3. AISLAMIENTO DE ADN GENÓMICO DE BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

Wizard Genomic ADN Purification Kit (Promega, Madison, WI)

1. Agregar 1ML de cultivo a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ML.
2. Centrifugar a 13 000 – 16 000 X G por 2 minutos y quitar el sobrenadante.
3. Agregar 600 µl de la solución para lisar el núcleo. Pipetear suavemente.
4. Incubar a 80 °C por 5 min para lisar las células. Enfriar a temperatura ambiente.
5. Agregar 3 µl de solución RNASE a las células lisadas. Invertir 2 - 5 veces el tubo para mezclar.
6. Incubar a 37 °C de 15 a 60 min. Enfriar a temperatura ambiente.
7. Agregar 200 µl de solución de precipitación de proteínas. Agitar vigorosamente en el vórtex por 20 segundos.
8. Incubar la muestra en hielo por 5 minutos.
9. Centrifugar a 13 000 – 16 000 X G por 3 minutos.
10. Transferir el sobrenadante (con el ADN) a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ML limpio que contenga 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
11. Mezclar suavemente por inversión hasta que se vea como una masa de hilos de ADN.
12. Centrifugar a 13 000 – 16 000 X G por 2 minutos.
13. Con cuidado verter el sobrenadante sobre un papel absorbente limpio.
14. Agregar 600 µl de etanol 70% a temperatura ambiente e invertir el tubo unas cuantas veces para lavar el pellet de ADN.
15. Centrifugar a 13 000 – 16 000 X G por 2 minutos. Con cuidado aspirar el etanol.
16. Drenar el tubo sobre papel absorbente y dejarlo al aire libre por 10–15 minutos.
17. Agregar 100 µl de solución rehidratante de ADN al tubo.
18. Incubar a 65 °C por una hora mezclando la solución periódicamente, ó
19. Dejar la solución toda la noche a 4 °C
20. Conservar el ADN a 2-8 °C.

ANEXO 4. PROTOCOLO PARA PCR ESTÁNDAR.

Maxim Biotech Kit Inc. Cat. No.: SP-10486

A. Preparación de la Mezcla Maestra.

Agregar 250 µl de Primers pre-mezclados a cada tubo de Buffer para PCR. Esta mezcla se puede guardar a -20 °C.

Solución	Por prueba de PCR
Solución maestra (A)	40 µl
Muestra o control (ADNc)	10 µl
Taq polimerasa	0.2 µl

Llevar los tubos a un volumen final de 50 µl con agua destilada si la muestra o control utilizado es menor a 10 µl.

Puesto que la cantidad de Taq polimerasa necesaria para cada reacción es muy baja, se recomienda que la mezcla maestra (A) y la polimerasa se mezclen en suficiente cantidad para las muestras necesarias del día. La mezcla maestra junto con la polimerasa se deberá etiquetar como "*Mezcla maestra lista para usar*", la cual se deberá guardar en un tubo de reacción individual antes de agregar la muestra o el control de ADN.

La "*Mezcla maestra lista para usar*" puede prepararse diariamente y guardarse a 4 °C.

B. Perfiles de la reacción de PCR.

Los perfiles de la reacción deberán ser ajustados de acuerdo al tipo de máquina y las necesidades del usuario. Sin embargo, un perfil de tiempo-temperatura para la reacción de PCR se ha ajustado para las máquinas Perkin Elmer tipos 2400 y 9600 y se proporciona lo siguiente:

°C	Tiempo		Número de ciclos
96 °C	1 min		1 x
94 °C		1 min	
58 °C	1 min		30 – 35 x
72 °C		1 min	
72 °C	10 min		1 x
4-25 °C		Detener	

Análisis de las muestras amplificadas.

Una décima parte de la muestra amplificada puede ser estudiada por electroforesis en gel de agarosa que contenga 0.5 µg/ml de bromuro de etidio. Una franja de 232 pares de bases (pb) indica un resultado positivo o la presencia de secuencias blanco en las muestras.

ANEXO 5. GEL DE AGAROSA PARA ELECTROFORESIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

1. Disolver agarosa en la concentración requerida (*) en buffer TBE 0.5 X a ebullición.
2. Enfriar a 55 °C y agregar 0.5 µg/ml de bromuro de etidio si se requiere (**).
3. Sellar los extremos de la bandeja con el gel en la autoclave y ponerla en la posición correcta del peine.
4. Verter la agarosa en el recipiente y evitar la formación de burbujas de aire (flamear suavemente el fluido para remover el gel). Obtener un gel de 0.5 cm de grosor.
5. Permitir que el gel se asiente a temperatura ambiente y llevarlo al refrigerador durante 30 minutos.
6. Remover el masking tape de los extremos de la bandeja de fundición y cuidadosamente remover bien la formación del peine.
7. Dejar el gel en la bandeja de fundición y ponerlo dentro del aparato para electroforesis.
8. Poner en el aparato para electroforesis el buffer TBE 0.5 X hasta que el gel quede sumergido unos cuantos milímetros en el buffer.
9. Poner 2 µl de buffer de carga en 8 µl de muestra de ADN, mezclar vigorosamente mediante short spin y agregar a cada uno de los pozos.
10. Conectar la fuente de poder y el aparato de electroforesis y dejarlo que funcione por el tiempo elegido (65V por 120 minutos).
11. Si la electroforesis se lleva a cabo en presencia de bromuro de etidio, cuidadosamente remover la bandeja de fundición con el gel y ver el gel bajo luz ultravioleta a 305 nm.
12. Si la electroforesis no se realiza en presencia de bromuro de etidio, teñir el gel por una hora en agua destilada que contenga 1 µl/ml de bromuro de etidio y destañir por 20 min en agua destilada después observar bajo la luz ultravioleta.
13. Fotografiar el gel bajo la luz ultravioleta usando una Polaroid 665 instatamic film y un sistema Polaroid MP-4. Un filtro anaranjado Wratten 23^a es puesto entre el gel y la cámara y un filtro Wratten 2^a es solo usado entre la fuente de luz y el filtro 23^a. Los tiempos de exposición comunes con una apertura de lentes de 4.5 es de 30 segundos. La película se desarrolla de acuerdo a las instrucciones de manejo.

Las imágenes producidas con la Polaroid 665 son de mediana calidad de impresión, pero de alta calidad en negativos.

Soluciones:

BUFFER PARA ELECTROFORESIS TRIS-BORATE-EDTA (TBE)

Tris base	53.9 g/500 ml	0.89 M
Ácido bórico	27.5 g/500 ml	0.89 M
EDTA (Na ₂)	4.65 g/500 ml	0.025 M

Ajustar el pH a 8.2 – 8.3 si es necesario.

BROMURO DE ETIDIO

Disolver bromuro de etidio (toda la noche usando un agitador magnético) a una concentración de 10 mg/ml en agua bidestilada. Envolver el frasco en papel aluminio y guardar en la oscuridad a 4 °C.

Agregar 50 µl EBr/L en buffer TBE y 5 µl EBr/100 ml de gel de agarosa (concentración final de 0.5 µg/ml) o 100 µl/L de agua destilada si el gel de agarosa se encuentra manchado después de la electroforesis

