



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“Amebas patógenas termotolerantes en las
biopelículas de un balneario de aguas termales
en el Estado de Hidalgo, México”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGO
PRESENTA:**

ARTURO MORENO MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. ARTURO CALDERÓN VEGA



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MEXICO

2012



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.

Agradecimientos y dedicatorias

Primeramente agradezco al Dios omnisciente, creador y omnipotente, por permitirme la vida y haber logrado una de mis metas.

A mis padres por ser los pilares en mi persona, al igual que a mis hermanas, por apoyarme incondicionalmente durante mi carrera.

Y a todos mis amigos y compañeros a quienes aprecio cada día más.

*Mejor es adquirir sabiduría que oro preciado;
Y adquirir inteligencia vale más que la plata*

Pr.

Agradecimientos:

Extiendo este agradecimiento a mi director de tesis M. en C. Arturo Calderón Vega y a la Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra por aceptarme y abrir las puertas del laboratorio y ayudarme a realizar este trabajo de tesis.

A mis revisores de tesis:

M. en C. María Dolores Hernández Martínez

M. en C. Gloria Luz Paniagua Contreras

M. en C. Eric Monroy Pérez

Gracias por su esfuerzo y dedicación de tiempo valioso y por las sugerencias y comentarios emitidos para el mejoramiento de este trabajo. ¡Muchas gracias!

También agradezco al personal de laboratorio, por haberme facilitado el uso de material, durante mi trabajo en el laboratorio de Biología Molecular.

Agradezco así mismo a quienes durante mi formación académica formaron parte dentro de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

CONTENIDO	pág.
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Ecología	4
AVL patógenas.....	6
<i>Naegleria fowleri</i>	6
<i>Acanthamoeba</i> spp.	9
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	11
<i>Sappinia</i> spp.....	11
Epidemiología.....	12
JUSTIFICACIÓN	14
OBJETIVOS	15
DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	16
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Parámetros ambientales y fisicoquímicos	18
Temperatura ambiente y del agua	18
Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$)	18
pH	18
Aislamiento de AVL	19
Axenización	19
Pruebas de temperatura.....	20
Identificación morfológica de AVL	20
Aislamiento de ADN	20
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	20
Electroforesis.....	21
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
Morfometría	26
Temperatura.....	30
pH.....	33
Conductividad.....	34
CONCLUSIONES	36
LITERATURA CITADA	38
ANEXO 1	45
ANEXO 2	47

RESUMEN

Las gimnamoebas también conocidas como amebas de vida libre (AVL) son microorganismos cosmopolitas que habitan en ambientes acuáticos, suelo y que además pueden encontrarse en el aire el cual sirve como vehículo de dispersión. Forman así mismo parte de microcomunidades llamadas biopelículas desempeñando un papel ecológico trófico, sin embargo, son capaces de vivir como endoparásitos, causando infecciones en el sistema nervioso central (SNC), de los cuales se ha identificado a los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Hartmannella*, *Naegleria* y *Sappinia*. Algunas especies de estos géneros causan meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) la cual es una infección fulminante, que causa la muerte en un lapso de tres a siete días, o bien causar encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) la cual es una infección crónica, en la que puede haber infección de ojos, oídos, piel u órganos internos. Las características de estas amebas es que proliferan en cuerpos de agua a temperaturas superiores a los 37 °C, favoreciendo sus estadios: trofozoíto, quiste y en algunos ameboflagelar. El objetivo de este trabajo es determinar la presencia de amebas termotolerantes potencialmente patógenas a partir del muestreo de biopelículas presentes en el balneario de aguas termales “El Géiser” Hidalgo, México; en un área recreativa que se encuentra en el municipio de Tecozautla. Se tomaron muestras de biopelículas de 15 estaciones durante tres muestreos, midiendo los parámetros fisicoquímicos *in situ*: conductividad, pH, temperatura de agua, temperatura de biopelículas. De las muestras tomadas se aislaron amebas termotolerantes a 45 °C, identificando por claves taxonómicas en un microscopio de contraste de fases, los géneros y especies, así mismo, se realizó la extracción de genoma de los aislados pertenecientes al género *Naegleria* para identificar la especie *Naegleria fowleri*, analizándolo por PCR anidado y una electroforesis en gel de agarosa 1.5 %, la cual es identificada con un amplicón de 110 pb, en el cual se obtuvo su presencia en 17 aislados. En el reconocimiento de géneros se identificaron 10 géneros. El género de mayor presencia fue *Naegleria* (32 %) con cuatro especies, seguida de *Acanthamoeba* (23 %) con seis especies, *Vahlkampfia* (18 %) con una especie y posteriormente *Hartmannella* (11 %) con una especie y seis géneros que constituyeron el 16 % restante, entre los que se mencionan a los géneros *Leptomyxa*, *Nuclearia*, *Rhizamoeba*, *Saccamoeba*, *Vannella* y *Willaertia*. En cuanto a los parámetros fisicoquímicos los ámbitos de temperatura registrados en las biopelículas, oscilaban entre los 19 y 43 °C hallando una mayor incidencia de géneros entre los gradientes 19 y 33 °C, con una mayor proliferación de *Naegleria* y *Vahlkampfia* en 43 °C, por lo que respecta al pH y conductividad no hubo influencia en cuanto en la proliferación de amebas. Por lo tanto se concluye que este lugar recreativo es apropiado para el crecimiento de amebas altamente patógenas para el ser humano, trayendo posibles consecuencias si el bañista presenta algún tipo de lesión y esta entra en contacto con las biopelículas perturbadas.

INTRODUCCIÓN

Las amebas son un grupo de protozoos que se ha ubicado en el Subfilo Sarcodina (Haro, 2002), aquellas de particular importancia entre estos microorganismos son las amebas de vida libre (AVL) facultativas que forman parte de las microcomunidades aerobias (Cubero y col., 2004), cuentan con la capacidad de alimentarse y reproducirse en forma exozóica o endozóica, pueden, también, parasitar a seres humanos y animales (Hoffmann, 2001). A estos microorganismos se les puede encontrar en todo el planeta, en ambientes acuáticos, terrestres o en el aire ampliándolo como vehículo de dispersión, por ello las AVL son reconocidas como organismos cosmopolitas (Rodríguez, 1994; Visvesvara, 2007).

Hasta la fecha han sido descritas no más de diez especies de AVL potencialmente patógenas, considerando los siguientes géneros con sus especies: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Hartmannella* spp., *Naegleria fowleri* y *Sappinia pedata*, presentes en casos clínicos por su alta virulencia y rápida evolución de la encefalitis que causa en sus hospederos (Schuster, 2004; Visvesvara, 2007; Rocha, 2009).

Las AVL presentan, de manera general, dos fases. La primera es la fase trófica en la cual las amebas se encuentran metabólicamente más activas, con capacidad para alimentarse y reproducirse, pudiendo medir de 10 μm a 3 mm. La segunda es la fase quística, en la cual forma una estructura de resistencia constituida de dos capas, el ectoquiste y el endoquiste; algunas especies presentan una tercera capa llamada mesoquiste, apareciendo cuando los factores ambientales son adversos (cambio de presión osmótica, temperaturas extremas, variación de pH, baja concentración de oxígeno, humedad), en esta etapa las vacuolas digestivas y el volumen del protoplasma son eliminados para disminuir su metabolismo y no perder energía. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables pueden exquistar a través de un poro u ostiolo que mide de 2 a 10 μm (Rodríguez, 1994; Greub, 2004, Calderón, 2008), después de haber estado mantenido en un estado de suspensión inanimada por varios días. Sin embargo, las amebas del género *Naegleria*, poseen una tercera fase en su ciclo vital, que es transitoria, conocida como ameboflagelar, intermedia entre el estadio trófico y quístico, después de hallar condiciones favorables, puede ser revertida a trofozoíto o a quiste cuando el ambiente es inadecuado (Marshall, 1997; Visvesvara, 2007).

Diversos géneros de AVL como *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Hartmannella*, *Naegleria* y *Sappinia* entre otros, son capaces de vivir en ambientes acuáticos con temperaturas que van desde los 10 hasta los 55 °C, e incluso, a *Acanthamoeba polyphaga* se le ha encontrado a 4 °C (Rodríguez, 1994; Rohr, 1998) y algunas otras han sido aisladas en sustratos sometidos a 70 °C por algunos minutos. Estas amebas son principalmente encontradas en microhábitats formados por comunidades microbianas que segregan

polisacáridos, que forman biopelículas a orillas de géisers, lagos, ríos y en ambientes artificiales húmedos, adheridas o flotantes a los sustratos por sustancias pegajosas como el glicocálix. Estas biopelículas brindan protección a diversos microorganismos que se desarrollan dentro de su estructura, formando un microambiente diverso por su sistema de organización (Betancourth, 2004).

Las biopelículas pueden tener varios centímetros de espesor, poseen un aspecto viscoso, forman comunidades anaerobias en el interior y aerobias en el exterior, presentan diversos gradientes, forman microhábitats que permiten la organización en diferentes niveles de temperatura, concentraciones de oxígeno, pH, carbono, nitrógeno, entre otros. Estas particularidades son ideales para el desarrollo microbiano (Betancourth, 2004); para la proliferación de estas comunidades, una parte de la biopelícula matriz debe desprenderse y adherirse a una superficie húmeda y formar un nuevo sistema para la captación de nutrientes y eliminación de desechos, continuando con su extensión y ciclo (Guerrero, 2006).

Al desprenderse parte de las biopelículas, se libera en el medio una gran cantidad de microorganismos, entre ellos, AVL algunas de las cuales pueden ser patógenas y presentar una amenaza de infección para los seres humanos y animales (Morales, 2006), conteniendo algunos de los principales géneros: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Hartmannella* spp., *Naegleria* spp y *Sappinia pedata*, causantes de enfermedades del sistema nervioso central (SNC) en África, América, Asia, Europa y Oceanía; donde las infecciones por AVL ocurren en pacientes que entraron en contacto con aguas cálidas de ambientes naturales o artificiales, contaminados con estas amebas facultativas (Kramer, 1997; Gómik, 2004; Schuster, 2004; Shin, 2004; Behets, 2006; Morales, 2006; Schuster, 2006; Visvesvara, 2007).

Algunas especies de amebas patógenas invaden al ser humano, propagándose al sistema nervioso central (SNC) y provocando infecciones crónicas, como la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) cuyos signos y síntomas pueden ser agudos, o bien, tardar meses en aparecer. Tal es el caso de algunas amebas del género *Acanthamoeba*, que pueden tener rutas alternas al SNC, como lesiones en piel, ojos y oídos, aumentando de esta forma su posibilidad de infección (Cubero, 2004; Galarza, 2006).

Por otra parte, existen especies de amebas termotolerantes del género *Naegleria* que tienen la capacidad de causar meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) en seres humanos y animales, causando infección aguda, que se presenta generalmente después de tener contacto con aguas termales contaminadas por *N. fowleri*; el paciente, al aspirar y ocasionar accidentalmente algún contacto de estas aguas contaminadas con sus fosas nasales, facilita su infección, desencadenándose así severa inflamación con hemorragias, necrosis y finalmente la muerte del individuo en un lapso de 2 a 15 días (Shenoy, 2002; Goswick, 2003; Greub, 2004; Shin, 2004; Morales, 2004). Por otra parte, se han

realizado pruebas de infección en ratones de laboratorio, el haber logrado la infección de estos, por especies del género *Naegleria*, demuestra la capacidad de *N. australiensis*, *N. fowleri*, *N. italica*, *N. philippinensis*, entre otras, para adaptarse a otros ambientes cambiando su forma libre a parasitaria (Lares, 1993; Hoffmann, 2001; Robinson, 2003; Schuster, 2004; Eddyani, 2008; Guzmán, 2008).

Ecología

Las AVL son protozoos capaces de colonizar lugares extremos, sean ambientes naturales o artificiales. Estas amebas se desarrollan principalmente en climas cálidos de ambientes dulceacuícolas como ríos, lagos, aguas de riego, centros recreativos, canales de plantas termoeléctricas, agua doméstica, etc.; habitando normalmente en temperaturas por encima de 25 °C, también, han sido aisladas de géiseres con temperaturas de más de 60 °C y de otros ambientes, aunque con menor frecuencia con temperaturas de 10 °C; de suelos húmedos (principalmente tropicales) y de barro con 16 °C. Comúnmente proliferan en temperaturas de 37 °C, con mayor presencia en verano – otoño y menor presencia en invierno – primavera, resistiendo importantes cambios de temperatura (Cubero, 2004; Oddo, 2006; Caderón, 2008; Jones, 2009). En estudios posteriores se han aislado y desarrollado a temperaturas de 46 °C y superiores en presencia de comunidades bacterianas o en cultivos de tejido. Aislándose, también, del aire (Marciano - Cabral, 1988) e incluso se ha encontrado presencia de *Sappinia* en heces de mamíferos y lagartos; por lo que se han catalogado como amebas cosmopolitas (Huizinga, 1990; Rodríguez, 1994; Calderón, 2008).

La gran capacidad de las AVL para colonizar ambientes termales, también les ha permitido sobrevivir y adaptarse a diversas condiciones fisicoquímicas como el pH (Sykora, 1983; Rodríguez, 1994). Por otra parte, la abundancia de materia orgánica e inorgánica en estos microhábitats, implica una descomposición, principalmente bacteriana, que promueve una variación de pH que obliga a la distribución microbiana y modificación de nutrientes, dando ventaja a estas amebas extremas para colonizar estos gradientes donde las comunidades bacterianas sirven como principal fuente de carbono.

Las AVL son estrictamente heterótrofas, lo que permite desempeñar un papel fundamental en el control de poblaciones bacterianas, hongos, levaduras, algas, protozoos, larvas de copépodos y nematodos (Barnes, 2003); manteniendo así, un equilibrio tal que al detectar presencia de bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* induce el enquistamiento de *N. fowleri* y otras amebas patógenas como *Acanthamoeba* spp., por su pigmentación tóxica (Marciano - Cabral, 1988; Greub, 2004); contribuyendo, así mismo, al control del crecimiento amebiano. No obstante, las amebas que parasitan pueden alimentarse de las células de su

hospedero, lacerándolas hasta ingerirlas completamente, realizando procesos de trogocitosis (Schuster, 2004; Sohn, 2010).

La diversidad de amebas es frecuente en microsistemas como biopelículas (Hoffmann, 2001), que pueden estar sésiles en superficies animadas, inanimadas de forma encostrada o flotantes y que son inicialmente conformadas por comunidades bacterianas unidas por secreciones de exopolímeros a partir de una adecuación del medio para formar una matriz extracelular que sirve de soporte a la biopelícula y una secreción de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Castrillón, 2010), lo que les da la viscosidad donde las amebas pueden desarrollarse y sobrevivir sin formar quistes.

Dentro de las biopelículas se generan señales químicas (*quorum sensing*) que ayudan a evitar el crecimiento excesivo de la misma, promover su maduración, dispersión o, incluso la eliminación del microsistema así como la formación de canales para la captación de nutrientes y eliminación de desechos metabólicos de cualquier microorganismo (Betancourt, 2004; Pemán, 2008); estos procesos son en su mayoría inducidos por bacterias Gram negativas que generan principalmente N - acilhomoserina lactona (acil HSL), y las bacterias Gram positivas que generan péptidos que, al unirse con algunas de las señales emitidas, pueden alterar la expresión de sus genes y expresar virulencia (Castrillón, 2010). A su vez, las diversas AVL como *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia* sp., *Hartmannella* spp., *Naegleria* spp., y *Sappinia* sp., pueden establecer asociaciones simbióticas con virus, hongos y bacterias, lo que, cuando ocurre una perturbación directa de las biopelículas, puede causar mayores infecciones al ser humano (Winiecka, 2001; Ford, 2004; Visvesvara, 2007).

Las biopelículas son microhábitats heterogéneos y organizados, formados por diferentes tipos de exopolisacáridos que confieren diferentes grados de resistencia a cada biopelícula contra antifúngicos, biocidas, detergentes o agentes biológicos externos y fluctuaciones fisicoquímicas (temperatura, osmolaridad, pH, OD), formando diferentes gradientes en los que puede variar la distribución microbiana, desde aquellas estrictamente anaerobias hasta un sistema aerobio.

Algunas AVL que se desarrollan cerca de la superficie o fuera de las biopelículas son sensibles a las variaciones ambientales, por lo que se han utilizado pulsos eléctricos en plantas de descarga inhibiendo su proliferación en un 95 %; la cloración de aguas domésticas y de centros recreativos, con concentraciones de 0.5 a 2.0 mg/L (Vernhes, 2002), también ha sido un método muy utilizado, mantener temperaturas interiores a 26 °C son, también medios para obtener mejor inhibición, aunque éste método de desinfección puede estimular enquistamiento, y otros métodos como el uso de luz UV (Maya, 2003) con un alto grado de desinfección.

AVL patógenas

Por lo general las AVL parásitas se distinguen en relación con el huésped por la presencia de factores específicos para la infección, como la temperatura corporal la cual presenta aproximadamente el mismo gradiente, dosis infectiva, virulencia de la ameba, respuesta inmune, así como, la presencia de alguna anomalía inmunológica. Esto permite su clasificación y denominación como anfizoicas, por su capacidad de presentar dos formas de vida: exozóica y endozóica – parásita. Sus ciclos vitales dependen, principalmente, de su crecimiento poblacional y sus condiciones fisicoquímicas que incluyen, principalmente, una fase alimenticia de trofozoíto y una fase de resistencia de quiste donde el huésped es el trofozoíto que se convierte en la fase infectiva.

Naegleria fowleri

En base a su morfometría se a identificado que *N. fowleri* presenta tres estadios morfológicos en su ciclo de vida, trofozoíto, quiste y ameboflagelado como forma alternativa transitoria. El trofozoíto es una forma metabólicamente más activa que mide entre 15 a 25 μm . con forma monopódica (limax), presenta movimiento sinusoide por pseudópodos de tipo lobópodo, diferencia una parte anterior alimenticia (amebostoma) que es utilizada para fagocitar, en el medio donde se encuentre (Visvesvara, 2007) y una parte posterior llamada uroide que secreta sustancias metabólicas, como glucopolisacáridos y proteínas que ayudan a su adherencia en sustratos y células; además, estos polisacáridos contribuyen a la formación de biopelículas en ambientes naturales, no obstante, presenta un endoplasma granular y gran cantidad de vacuolas contráctiles y digestivas, un nucléolo esférico prominente central, un núcleo esférico, ribosomas y abundantes mitocondrias que la caracterizan como una ameba estrictamente aerobia, llevando a cabo procesos de fisión binaria para reproducirse (Hoffmann, 2001; Visvesvara, 2007; Calderón, 2008).

Cuando las condiciones ambientales se modifican, puede cambiar a una forma ameboflagelar o fase transitoria flagelar que llega a medir de 12 a 18 μm con uno o dos flagelos pero, ocasionalmente, puede tener hasta diez flagelos, a diferencia de la forma trófica que posee organelos definidos y pseudópodos para desplazarse; en esta forma ameboflagelar son reabsorbidos algunos orgánulos para desarrollar flagelos y no perder energía al desplazarse en búsqueda de alimento; sin embargo, no se alimenta ni reproduce hasta encontrar condiciones favorables, contando con una mayor ventaja que las demás AVL, por poder desplazarse a lo largo de columnas de agua y gradientes, además de ser capaz de revertir su forma a trofozoíto o enquistarse en un ambiente desfavorable (Marciano - Cabral, 1988 Marshall, 1997; Shin 2004; Visvesvara, 2007).

Algunos análisis para la identificación de *Naegleria* spp., han sido pruebas de flagelación estandarizadas que consisten en desarrollar trofozoítos en agar no

nutritivo (ANN/*E. coli*) a temperaturas de 30 a 37 °C, dependiendo la especie, para posteriormente tomar una muestra a un volumen con aproximadamente 10^7 células, las cuales son incubadas a 20 a 30 °C con un control positivo, luego son observadas bajo microscopio en intervalos de 1 h, observándose una forma ameboflagelada que perdura hasta dos días. Estos métodos no son confiables para la identificación de algunas especies ya que, se ha demostrado que no todas las amebas del género *Naegleria* flagelan (De Jonckheere, 2001; Guzmán, 2008).

Los quistes de *N. fowleri* son esféricos, con un diámetro entre 7 a 15 μm y doble pared lisa, una llamada entoquiste, es poco visible y la otra llamada ectoquiste es muy visible y refringente, está formada de quitina y presenta uno o dos ostiolas; sirviendo este quiste cuando las condiciones medioambientales son hostiles (Herbst, 2002; Greub, 2004; Schuster, 2004).

Un primer caso atribuido a *Naegleria*, ocurrido en Australia, fue descrito en 1965 por Malcolm Fowler y col., posteriormente en 1966 en EE.UU., ocurrieron cuatro casos que fueron atribuidos por técnica de inmunohistoquímicas a *Naegleria fowleri*; determinándose que los casos de (MEAP) eran causados por amebas del género *Naegleria* en 1968, al identificarse un estado ameboflagelado del protozoo (Oddó, 2006), pero Carter (1970) describió a *Naegleria fowleri*, de un aislado de dos pacientes australianos que presentaron meningoencefalitis amebiana primaria. Se han identificado ~47 especies de *Naegleria* (Guzmán, 2008) entre las cuales *N. fowleri* se diferencia de otras AVL por causar una infección fatal en el SNC humano llamada meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), refiriéndose, hoy en día, a un proceso patogénico de econosis para referirse a las infecciones causadas por organismos de vida libre (Oddó, 2006) que, al ingresar a un huésped, “cambian” a parásitos que se adaptan a las condiciones para nutrirse y reproducirse, secretando enzimas citotóxicas; se consideran que algunos de los polisacáridos de adherencia son los precursores de una infección inicial (Visvesvara, 2007; Cervantes, 2008, Sohn, 2010).

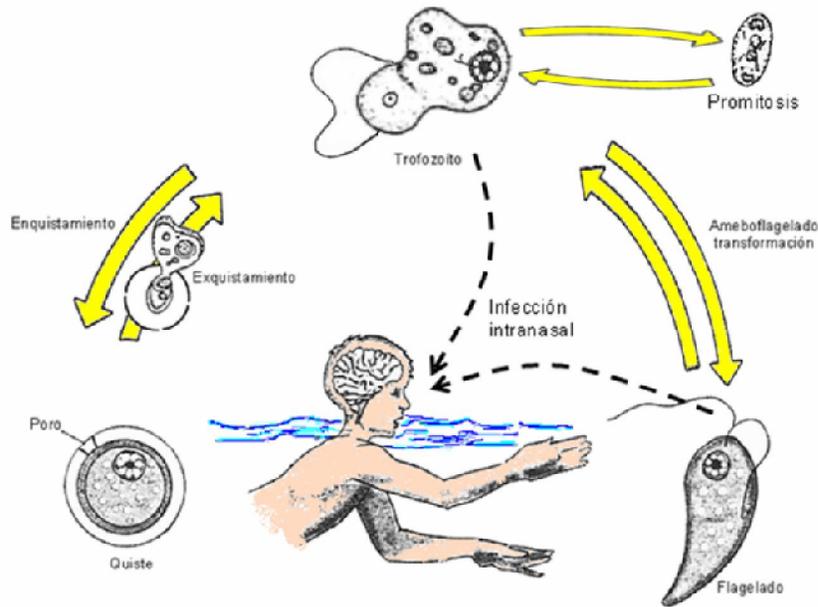


Figura 1. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*, etapa de vida libre y parasitaria (modificado a partir de John, D., 1993).

El ciclo de patogenicidad comienza con la invasión del huésped en agua contaminada de trofozoítos y/o ameboflagelados que tienen la capacidad de invadir epitelio mucoso, desplazándose a través de la cavidad nasal hasta el nervio y el bulbo olfativo, donde se presenta una tenue inflamación como respuesta inmune; estas pasan a la lámina cribosa y finalmente se sitúan en la placa basal del cerebro, donde el primer punto de infección es el lóbulo frontal y olfativo (Schuster, 2004), comenzando la infección (MEAP) aguda. Por otro lado, existen amebas como *Acanthamoeba* spp., que pueden ingresar al huésped por lesiones; no hay estudios que reporten vías infectivas alternativas para *N. fowleri*, aunque puede ocurrir inoculación por trasplante de órganos si no se tiene un riguroso diagnóstico del donador (Fig. 1) (Kramer, 1997).

Una vez que las amebas ingresan, se reproducen y liberan enzimas citolíticas como: proteasa, ácido hidrolasa y fosfolipasa A₂ (FLA₂) que actúan sobre las vainas de mielina (Barbour, 2001; Oddó, 2006) destruyendo las células nerviosas, también pueden llevar a cabo la trogocitocis a través de sus amebostomas engullendo o lacerando células para alimentarse, siendo este, un segundo mecanismo de necrosamiento.

Algunos de los síntomas iniciales en el huésped comienzan con dolor de cabeza y fiebre (superior a los 40 °C) que incrementa gradualmente, desencadenando náuseas y vómito, rinitis, comportamiento anormal (Schuster, 2004; Rocha, 2009), confusión, pérdida del olfato y cuello rígido cuando han sido afectadas totalmente las meninges, las cuales se encuentran irrigadas altamente por oxígeno; evolucionando hasta la necrosis hemorrágica e inflamación

histopatológica, dañando otras áreas del SNC a causa de la rapidez de desplazamiento y reproducción de esta ameba y que puede ser confundida como infección bacteriana (Rocha, 2009). Se ha observado en pruebas *in vivo*, *ex vivo* en ratones que 72 h posteriores a la inoculación de trofozoítos, su número se incrementa rápidamente 24 h después (Cervantes, 2008), con un período de incubación de 2 y 15 días; hasta inducir un estado de coma y convulsiones donde finalmente, el hospedador muere (Visvesvara, 2007). Por otra parte, se han realizados pruebas con otras especies como: *N. australiensis* y *N. itálica*, inoculándose en ratones, causando infección (Rocha, 2009).

Los mecanismos de patogenia de *N. fowleri* no se han conocido con certeza, aunque, la infección se presenta en niños y adultos jóvenes sanos que se han expuesto a ambientes hidrotermales con temperaturas mayores a 26 °C que frecuentemente son los focos de infección, causando MEAP (Schuster, 2004; Morales, 2006), cuya inoculación ocurre al sumergirse e inhalar agua contaminada con trofozoítos o ameboflagelados y, algunos otros casos, por el uso de agua doméstica contaminada (Marciano - Cabral, 2003) y trasplantes de riñón e hígado infectados (Kramer, 1997).

El número de sobrevivientes con diagnóstico determinante ha sido mínimo y los pocos sobrevivientes fueron tratados con anfotericina B intravenosa en combinación con rifampicina oral y miconazol intratecal, dejando secuelas neurológicas y deterioro renal (Schuster, 2004; Rocha, 2009); y en algunos casos se logró la recuperación mediante el uso de anfotericina B combinada con metronidazol y tinidazol (Lee, 2000).

Por otra parte, ante la rápida evolución de las infecciones por *N. fowleri*, se han buscado pruebas de diagnóstico temprano para el tratamiento del paciente. Una de las pruebas utilizadas para la diferenciación entre meningitis amebiana y meningitis bacteriana, es la toma de líquido cefalorraquídeo (LCR) para ser observado bajo microscopio (Grate, 2006, Calderón, 2008), en algunos casos con tinciones de eosina, Giemsa o hematoxilina y Wright, para facilitar la identificación visual de trofozoítos ameboflagelados o quistes amebianos y así, elegir el tratamiento adecuado para el paciente; aunque en algunos casos la identificación puede dificultarse por la presencia de alguna infección bacteriana, sedimentos con amebas, macrófagos e incluso células epiteliales cuyas características pudieran confundirse con las de esta ameba.

***Acanthamoeba* spp.**

Acanthamoeba spp., es una ameba que se ha aislado tanto en ambientes naturales como artificiales: sistemas acuáticos domésticos, hospitales, unidades dentales, entre otros (Rocha, 2009).

En este grupo de amebas se encuentran diversas especies patógenas, cuyos trofozoítos llegan a medir 15 a 50 µm., y presentan pseudópodos de tipo

acantópodo, reproduciéndose por fisión binaria, alimentándose principalmente de bacteria a través de sus amebostomas e interactuando con diversos virus y bacterias durante este estadio. Presentan vacuolas contráctiles, un núcleo central; este género se divide en tres grupos, según las características morfológicas del quiste: formado de celulosa con un tamaño de 10 – 25 µm, con dos capas polimórficas (endoquiste y exoquiste) (Schuster, 2004; Visvesvara, 2007; Li – Li, 2011), además de poseer un estado de dormancia en forma de quiste, que se forma durante las condiciones desfavorables de inanición y desecación, manteniéndose en un estado latente (Shin, 2004), retornando a trofozoíto en condiciones favorables.

La mayoría de las especies de este género, han sido relacionadas con diversos casos clínicos; comienzan su ciclo patógeno cuando el hospedero entra en contacto con ambientes contaminados por *Acanthamoeba* spp. (infectando tanto a seres humanos como a animales), esta ingresa e infecta en fase de trofozoíto, migrando por vía respiratoria, hematogena o lesiones, causando incluso en algunos casos, infecciones oculares como queratitis amebiana (QA) (Visvesvara, 2007; Peralta, 2009); por ello se le considera oportunistas. No obstante, se ha identificado en órganos trasplantados pudiendo incubarse hasta en diez días (Grate, 2006), secretando fosfolipasas, las cuales lisan las células para nutrirse.

A lo largo de su identificación, diversas especies del género *Acanthamoeba* (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. healyi* y *A. divionensis*) se han reconocido como las causantes de la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) (Oddó, 2006), atacando el SNC de su hospedero y causando la formación de granulomas en el encéfalo al comenzar a infectar.

Algunos de los principales síntomas de esta infección son: dolor de cabeza, cuello rígido, náusea, vómito, fiebre, cansancio, ataxia cerebral, trastorno visual y coma. El daño principal se presenta en los lóbulos parietal y occipital, lo que conlleva a una necrosis hemorrágica (Visvesvara, 2007); por otro lado, esta infección, a diferencia de *N. fowleri*, no es fulminante ya que su proceso de infeccioso es prolongado y si es detectada a tiempo el paciente puede ser tratado, aunque la mayoría de los casos han sido diagnosticados *post mortem*. Los casos documentados son, principalmente, de pacientes inmunodeprimidos y en menor proporción, sanos (Peralta, 2009) que desarrollan una enfermedad crónica que puede tardar días o incluso meses en presentar síntomas.

Los tratamientos empleados para infecciones por *Acanthamoeba* han sido comúnmente basadas en el uso de cotrimoxazol, ketoconazol y rifampicina combinados, (Singhal, 2001) además de un caso en el que se reportó el uso de pentamidina, clorhexidina y ketoconazol tópicos (Slater, 1994) para combatir al protozoo.

Balamuthia mandrillaris

Otra ameba reconocida como patógena para humanos y animales es *B. mandrillaris*, identificada inicialmente en mandriles con una descripción semejante a *Acanthamoeba* sp., descrita con dos estadios: un trofozoíto pleomórfico que mide de 15 a 60 μm en forma limax, en ocasiones binucleado y alargado, retículo endoplasmático visible; que se desplaza por pseudópodos de tipo lamelipódio. Cabe mencionar que los estudio sobre esta ameba han sido “*in vitro*” y muy poco se ha realizado con aislados de ambientes (Schuster, 2004; Oddo, 2006).

El quiste que forman las amebas es una estructura de resistencia y sobrevivencia ante condiciones de estrés ambiental; en el caso de *N. fowleri* sus quistes son menos resistentes que los de *Acanthamoeba* spp., no obstante el quiste de *Balamuthia mandrillaris*, presenta mayor resistencia al estrés ambiental, midiendo entre 10 y 30 μm , con tres capas: endoquiste, mesoquiste y un exoquiste (Schuster, 2004, Visvesvara, 2007) plisado circular, lo que permite mantenerse en forma latente por semanas, con dos o más poros de exquistamiento taponados cuya principal función es registrar las condiciones de humedad en el medio que le rodea.

La infección causada por esta ameba a sido catalogada como EAG, sin embargo, se le diferencia como encefalitis amebiana por *Balamuthia* (EAB), la cual es una infección crónica, que ocurre por nadar en aguas estancadas infectadas por *B. mandrillaris*, aunque también ha sido aislada de suelo. Siendo una ameba oportunista en individuos inmunocompetentes, se ha demostrado que la patogenia es debido a diversas enzimas similares a las de *Acanthamoeba* y que a su vez lleva a cabo procesos de trogocitocis como mecanismos necróticos, los pacientes afectados presentan síntomas semejantes a los producidos por otras amebas, como dolor de cabeza, náusea, vómito, dolor muscular, pérdida de peso, hemiparésis, dificultades del habla, y lesiones granulomatosas en piel, los cuales pueden manifestarse en semanas a varios meses (Schuster, 2003; Schuster, 2004; Visvesvara, 2007; Rocha, 2009). El tratamiento usado para infección por *B. mandrillaris*, ha sido la combinación de fenotiacinas (tioridacina y trifluoperacina), fluconazol y flucitocina; además de macrólidos (azitromicina y claritromicina), pentamidina, sulfadiazina, en dos casos conocidos (Deetz, 2003).

***Sappinia* spp.**

La ameba de vida libre *Sappinia* spp., cuenta con dos estadios en su ciclo de vida el trofozoíto que va de 40 a 85 μm , presenta pseudópodos de tipo lobópodo, con una vacuola contráctil y alimenticia, un endoplasma muy visible, dos núcleos sobrepuestos; así como un quiste binucleado de doble pared gruesa, ovoide de 13 a 37 μm con un exoquiste rugoso (Schuster, 2004; Visvesvara, 2007).

Este género incluye una especie, *Sappinia pedata*, una ameba patógena para el ser humano, causante de EAG o encefalitis amebiana *Sappinia* (EAS), casos clínicos que anteriormente eran atribuidos a *Sappinia diploidea*, actualmente se conoce por técnicas moleculares que son causados por *Sappinia pedata*. La cual infecta principalmente a inmunodeprimidos, sin embargo, no se conoce con exactitud la ruta de infección, aunque esta podría ser nasofaríngea o hematógena, produciendo síntomas semejantes a los ocasionados por otras AVL, como dolor de cabeza frontal, náuseas, vómito, fotofobia, visión borrosa, pérdida de conciencia por corto plazo, induciendo un estado de coma en el que paciente hasta que muere finalmente. No obstante, se ha empleado azitromicina, pentamicina vía intravenosa, itraconazol y flucitosina, como tratamiento (Schuster, 2004; Visvesvara, 2007; Rocha, 2009).

Epidemiología

Se han estimado más de 300 casos de MEAP en todo el mundo (Petit, 2006; Gupta, 2009), con más del 90 % de diagnósticos *post mortem*. Por otra parte, los casos de EAG reportados fueron 218, 125 por *Acanthamoeba* y 93 por *B. mandrillaris* aunque se estima que el número puede ser mayor por mal o nulo diagnóstico.

Ambas infecciones han sido fatales en diversos países, entre los que se encuentra México, donde se reportó su primer caso de MEAP en 1978. Un joven de 16 años de Mexicali, Baja California, con un historial de tres días de intenso dolor de cabeza tras haber nadado en aguas de riego, falleciendo tres días después de haber sido hospitalizado. *Post mortem*, en un análisis por microscopio, mostró severa necrosis con hemorragia cerebral y presencia de amebas, resultando positiva la presencia de *N. fowleri* por tinción de inmunoperoxidasas (Valenzuela, 1984).

Los casos registrados de MEAP en la República Mexicana se han dado en cinco estados (23 en Baja California, uno en Michoacán, uno en Nuevo León, cuatro en Sonora, uno en Tamaulipas (Calderón, 2008); desde 1978 hasta 2010 (Cuadro, 1), con mayor incidencia en niños y adultos jóvenes expuestos a agua contaminada por *N. fowleri* y con temperatura superior a 25 °C, al inhalar agua.

Cuadro 1. Casos de MEAP en México (1984 - 2010) actualizado de Calderón, 2005 a 2010.

Lugar	Método de diagnóstico				Total
	Autopsia	Amebas en LCR	Epidemiológico	Cultivo	
Baja California	2	5	9	7	23
Michoacán	1				1
Nuevo León		1			1
Sonora		1		3	4
Tamaulipas		1			1
Número total de casos					30

Hasta 2008 se han contabilizado cerca de 30 casos de MEAP en México (Calderón, 2008), asociados a la especie *N. fowleri*. Sólo hay dos sobrevivientes, uno del estado de Nuevo León, tratado con anfotericina B combinada con miconazol, rifampicina y tetraciclina (Rodríguez, 1984) y un niño de Sonora de 10 años que ingresó al hospital una semana después de haber nadado en un canal para riego, que fue tratado exitosamente al administrársele anfotericina B combinada con fluconazol y rifampicina (Vargas, 2005).

Por lo que respecta a los casos de EAG a nivel mundial, se tienen conocidos cerca de 218, 125 por *Acanthamoeba* spp. con dos sobrevivientes y casi 3000 de QA (Schuster, 2004), 93 casos por *B. mandrillaris* (Ortiz, 2000; Bonilla, 2001); identificando el primer caso en un ser humano con síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA) (Schuster, 2003), refiriéndose en la República Mexicana, 12 casos por *B. mandrillaris* (Cuadro, 2) (Lares, 2001).

Cuadro 2. Casos de EAB por *B. mandrillaris* registrados en México para 2001

Lugar	Epidemiología
Distrito Federal	4
Edo. de México	4
Guanajuato	2
Jalisco	1
Puebla	1
Número total de casos	12

Por otro lado la AVL patógena *S. pedata*, fue identificada en 2001 en un paciente de 38 años de edad, quien sobrevivió después de un análisis por biopsia, y el cual fue tratado con diversos fármacos (Oddó, 2006). Sin embargo la información es escasa, por lo que se ha descrito de forma breve.

JUSTIFICACIÓN

En el Estado de Hidalgo no se ha reportado ningún caso por AVL patógenas, sin embargo, es posible que en los centros recreativos hidrotermales los bañistas al estar en contacto con estos ambientes y microcomunidades, estén expuestos a infecciones fatales, dado que estos ambientes acuáticos termales naturales o artificiales presentan condiciones favorables para el desarrollo de AVL anfibiozoicas patógenas.

El balneario “El Géiser” es uno de los centros recreativos con mayor atractivo turístico de Tecozautla, Hidalgo y durante todo el año es frecuentado por miles de personas que creen que sus aguas poseen propiedades curativas por ser ricas en minerales disueltos, por lo que algunos usuarios son personas inmunodeprimidas que de acuerdo a su estado clínico, son más propensas a contraer infecciones, ya sean bacterianas, micóticas y por AVL.

Gracias a la información recabada sobre infecciones por AVL termotolerantes, se sabe que, la mayoría de los pacientes, contraen la infección al haber entrado en contacto con aguas termales contaminadas y que, al utilizarlas con fines recreativos o “medicinales”, inhalaron o expusieron heridas cutáneas facilitando la inoculación de la ameba responsable de EA.

El presente estudio se llevó a cabo en el balneario “El Géiser”. Con el propósito de determinar la presencia de amebas patógenas termotolerantes en biopelículas encostradas, sobre paredes de roca adyacentes al géiser cuyas aguas termales proveen al sistema de piscinas de dicho balneario; lo que hace necesario buscar y determinar la presencia de estos organismos en el agua que entra en contacto con los usuarios.

En el plano morfológico, los microorganismos amebianos se han diferenciado por claves taxonómicas aunque, en algunas amebas es difícil llegar a la determinación de la especie como es el caso de *N. fowleri*. Por esto se ha optado por técnicas de reconocimiento molecular, con las que se puede manipular material genético y reconocer regiones específicas que determinan la ubicación taxonómica del aislado.

Una de estas técnicas es la de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) anidado, que es altamente sensible y específica para el reconocimiento de especies e, incluso, subespecies. La utilización de esta técnica permitió un análisis confiable que determinó como positiva, la presencia de *N. fowleri* en las muestras de biopelículas.

OBJETIVOS

General:

Determinar la presencia de amebas patógenas termotolerantes a partir del muestreo de biopelículas presentes en el balneario de aguas termales “El Géiser” Hidalgo, México.

Particulares:

Identificar amebas patógenas termotolerantes a partir de los géneros amebianos presentes en las biopelícula del balneario “El Géiser”.

Determinar la presencia de *Naegleria fowleri* en las biopelículas presentes en el balneario, a través de la técnica de PCR anidado, para confirmar la taxonomía a nivel de especie de los aislados amebianos.

DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO

La localidad de Uxdejhé se ubica en el municipio de Tecozautla presentando las siguientes características geográficas: Latitud: 20°34'39.11" N, Longitud: 99°41'35.69" O, Altura de 1640 msnm, colindancia al Norte: Querétaro y municipio de Zimapan, colindancia Este: Tasquillo, Alfajayucan, colindancia Suroeste: municipio de Huichapan y Querétaro, entre Sierra Madre Oriental y la Altiplanicie Mexicana en el eje neovolcánico (Fig. 2).

En el poblado de Uxdejhé, en Tecozautla predomina el clima semiseco templado con lluvias en verano, matorral crasicaule y xerófilo; su temperatura promedio anual es de 14.8 °C, que incrementa a 17.3 °C en mayo, con temperatura mínima de 9.4 °C (INEGI, 2010).

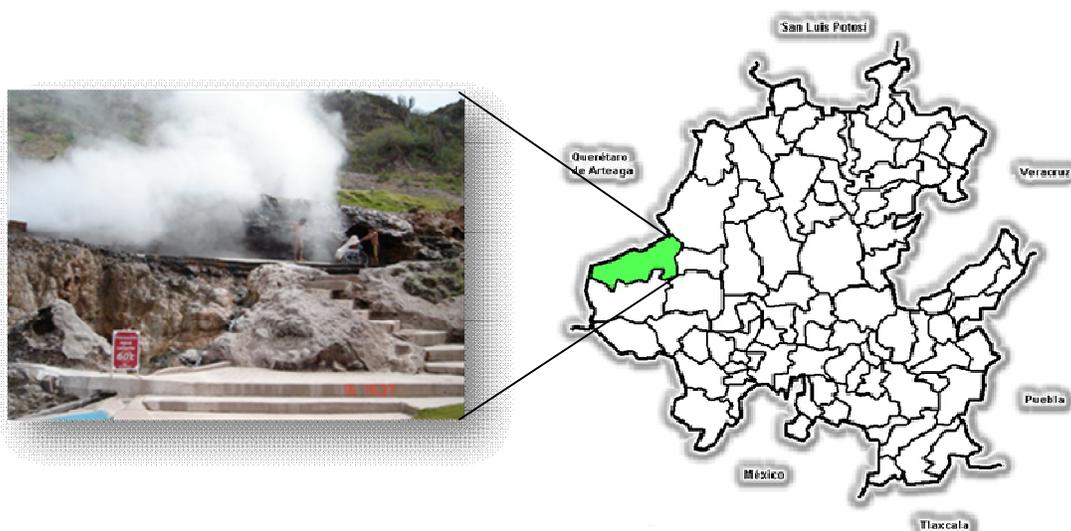


Figura 2. Ubicación del municipio Tecozautla en el estado de Hidalgo, México. En la imagen se aprecia el uso de los aerosoles y precipitación de agua para uso terapéutico.

La localidad de Uxdejhé se asienta en el Valle del Mezquital, que cuenta con abundantes aguas termales que forman parte del cause de los ríos Actopan y Tula; generando las corrientes hidrográficas que desembocan en la cuenca del río Moctezuma – Pánuco con vertiente al Golfo. Generalmente estos arroyos y ríos son utilizados para proveer aguas de uso doméstico o laboral, presas y centros recreativos, entre otros.

La mayoría de estas aguas geotérmicas son de actividad recreativa y atraen a miles de turistas todo el año, este es el caso del balneario “El Geiser”, en Uxdejhé, Tecozautla, que es alimentado por el escurrimiento de agua precipitada en las rocas de un géiser, alcanzando una temperatura de aproximadamente 95 °C. Esta agua es usada para el llenado de las albercas a través de un sistema de acueductos: otra zona es mojada por la escorrentía en una pared de roca en la que se forman numerosas biopelículas, lo que expone a los bañistas a un

aerosol termal. La presencia y el escurrimiento del agua, mantienen hidratadas dichas biopelículas que, a su vez, son lavadas constantemente ocasionando el arrastre de material biológico contaminante hasta las piscinas usadas por los bañistas.



Figura 3. a) Zona de muestreo en la parte baja del géiser, con cinco estaciones; b) Zona de muestreo alta con diez estaciones; adyacente a la actividad geotermal, en el balneario “El Geiser” estado de Hidalgo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante aproximadamente un año (en febrero de 2009, agosto de 2009 y marzo de 2010) se realizaron tres muestreos de distintas áreas del balneario “El Géiser”; con 15 colectas por cada uno.

Se colectaron muestras de biopelícula de paredes adyacentes a la zona de influencia del géiser, en tubos estériles de 50 ml; cortando segmentos, de aproximadamente 1 cm², de biopelículas sésiles con escorrentía; encontradas y de forma flotante; se midieron *in situ* los parámetros fisicoquímicos y ambientales para comprobar las condiciones ecológicas que permiten o limitan la presencia de AVL termotolerantes patógenas, tomando en cuenta temperatura, conductividad, pH, etc., de la escorrentía de agua como de las biopelículas.

Parámetros ambientales y fisicoquímicos

Temperatura ambiente y del agua

Para la medición de temperatura se utilizó un termómetro digital (Digi-Sense, Cole Parmer), tomando un volumen de agua que hidrataba la biopelícula y midiendo *in situ* su máximo grado; posteriormente, se colocó la sonda dentro de la matriz extracelular y se cotejaron los valores registrados, los cuales determinan la presencia y distribución de los organismos y, a su vez, permiten el establecimiento de diferentes gradientes calóricos.

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

La conductividad del agua se determina a partir de su capacidad para conducir electricidad. Esta depende de las partículas de iones que provienen, principalmente, de la acidez generada por procesos de transformación de materia (orgánica e inorgánica) y de la concentración de sales disueltas que, de ser elevadas incrementan equidistantemente el pH y la conductividad. Pudiéndose así, establecer las fluctuaciones de pH y conductividad.

Los valores de conductividad del agua se registraron *in situ* con un conductímetro digital. (Hanna HI 98129), se introdujo la sonda en cada muestra hasta obtener el primer valor estable, registrado como $\mu\text{S}/\text{cm}^3$.

pH

El pH es la medida que determina la cantidad de iones de hidrógeno presentes en el agua. A medida que el pH disminuye, los iones ácidos aumentan una unidad. Las mediciones se realizaron con un potenciómetro digital (Digi - Sense modelo 5985-00) con el objeto de establecer una posible relación con

aislamientos amebianos obtenidos en laboratorio, cuyos parámetro de pH influyen en la distribución y presencia.

Las muestras se transportaron, a temperatura ambiente, hasta el laboratorio de patógenos emergentes de la UIICSE (Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación) en la FES Iztacala.

Aislamiento de AVL

Las biopelículas fueron resuspendidas en 15 ml de agua de la misma muestra, deshaciéndolas con un vortex y centrifugando cada una a 1500 x g durante 10 minutos (Centrifuga BOECO U-32), para recuperar el sedimento.

Para la siembra de cada muestra, se inoculó y extendió el sedimento sobre placas de Petri con agar no nutritivo (ANN/*E. aerogenes*) (De Jonckheere, 1977, 1984; Muñoz, 2003) y con bacteria *Enterobacter aerogenes* inactiva, que sirvió como fuente de carbono para el crecimiento de las amebas.

Las placas de Petri con inóculo de biopelícula se incubaron a 37 °C para ofrecer la temperatura óptima para el desarrollo de amebas termófilas (Visvesvara, 2007). Se observaron durante 48 hrs después durante cinco días, con un microscopio de contraste de fases invertido a 10 X (Nikon Eclipse TS 100). Se aislaron las formas tróficas para resiembra y posterior incubación durante ocho días a 45 °C, hasta la obtención de amebas termófilas (Sykora, 1983); durante este procesos se eliminaron amebas no tolerantes y mediante la revisión bajo microscopio invertido cada 24 horas, se controló la presencia de trofozoítos aquellas muestras sin crecimiento amebiano a 45°C se consideraron negativas.

Axenización

Para manejar las células amebianas y evitar interferencias en los subsecuentes análisis de identificación, extracción, amplificación de ADN, etc., se requirió la obtención de cultivos amebianos axénicos, creciendo en un medio líquido, para ello, se aislaron de cultivos de amebas en placas ANN/*E. aerogenes*, a un medio líquido rico en nutrientes (bactocasitona al 2%), incubadas a temperatura ambiente.

Obtenidas las colonias de AVL en agar NNE, se transfirieron pequeños segmentos (aproximadamente 0.5 cm²) a tubos con medio líquido de bactocasitona 2 % provistos con antibióticos (kanamicina, penicilina G y sal sódica) para evitar contaminación bacteriana (Visvesvara, 2007). Se esperó el crecimiento amebiano y los cultivos se mantuvieron haciendo resiembras para mantener las formas tróficas, en medios líquidos, libres de bacteria que pudieran servirles como fuente de alimento.

Pruebas de temperatura

Durante el aislamiento de amebas termófilas, las placas fueron incubadas a 45 °C, tomando en cuenta estudios previos en las que se han aislados AVL termotolerantes patógenas, las cuales pueden desarrollarse hábilmente en temperaturas de entre 25 y 45 °C o superiores; además de servir como técnica de identificación, porque el reproducirse en este ambiente indica cierta característica que facilita el reconocimiento morfológico, incluso a nivel especie, de algunos géneros altamente patógenos al humano (Rodríguez, 1994; Schuster, 2004).

Identificación morfológica de AVL

Una vez obtenidos los cultivos en placas, se agregó solución salina 0.9 % y se realizó un barrido de células, tomando una alícuota de sedimento con una pipeta Pasteur y poniendo en un porta objetos. Se realizó el mismo procedimiento con el contenido de células amebianas en medios axénicos.

Para la identificación de amebas se buscó la forma trófica y quística con un microscopio de contraste de fases invertido a 40 X. Las morfologías de los estadios amebianos fueron identificadas con las claves taxonómicas de Page (1988); realizando la medición ancho – largo de trofozoítos y quistes, mediante una microreglilla y se calculo el promedio de medida para cada género o especie, para obtener una identificación taxonómica.

Aislamiento de ADN

Para el aislamiento y purificación de material genético de *N. fowleri*. Se requirió crecimiento del 80 % de células en placas, a las cuales se agregó solución salina al 0.9 % y se realizó un raspado de células. Para suspenderlas en la solución y extraerlas con una pipeta de transferencia a un tubo colector (tubo Eppendorf) hasta un volumen de 1.5 ml, los cuales se centrifugaron a 1600 x g por 10 seg para obtener un concentrado de células utilizando con el kit Wizard Genomic ADN Purification Kit. Posteriormente, se agregó solución para lisar la membrana de las células y así liberar el ADN nuclear, también se agregó solución RNAasa para eliminar el ARN una solución precipitadora de proteínas. Una vez procesado el ADN, se transfirió el material genético a un tubo colector (tubo Eppendorf), al cual se le agregó isopropanol para compactar el ADN; posteriormente fue lavado con etanol al 70 % que luego fue aspirado del pelet para agregarle solución rehidratadora y finalmente, almacenar la muestra hasta su análisis.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para identificar un gen específico de *N. fowleri* y así poder confirmar su presencia en las muestras de biopelícula, se utilizó material genético, empleando

el método de PCR anidado siguiendo instrucciones de acuerdo a Réveiller y cols., quienes recomiendan un PCR anidado utilizando dos pares de *primer* (iniciadores) que amplifican un fragmento de ADN con 166 pb, así mismo, este fragmento de 166 pb se emplea en un segundo PCR con el objeto de obtener un fragmento de 110 pb (Réveiller *et al.*, 2002; Marciano - Cabral, 2003), para validar la taxonomía del aislado.

Para esta prueba se realizaron dos diluciones de solución stock–primer 1:10, procediendo a analizarlos con el kit PCR Master Mix,. En un tubo Eppendorf se agregaron 15 µl de ADN templado, 5 µl de cada primer a un volumen de 10 µl y otro de 25 µl de “Master Mix”, el cual contiene cloruro de magnesio (MgCl₂) como amortiguador, desoxinucleóticos (dNTP's), enzima *Taq* polimerasa y cebadores como iniciadores en los fragmentos de ADN, en un volumen final de 50 µl.

Las temperaturas fueron programadas con un ciclo de pre-PCR 5 min a 95 °C, y 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 65 °C y 2 min a 72 °C con una amplificación final de 72°C por 5 min; para amplificar un fragmentos de 166 pb, que se utilizaron como molde para un segundo PCR, con un par de *primer forward* [5'-TCTAGAGATCCAACCAATGG-3'] y *reverse* [5'-ATTCTATTCACTCCACAATCC-3']

Para aumentar la sensibilidad en los fragmentos obtenidos, se realizó un segundo PCR, tomando una muestra del *primer* amplificado, de ADN templado de 5 µl, así como 5 µl de cada *primer* a un volumen de 10 µl de H₂O libre de nucleasas y 10 µl y 25 µl de “Master Mix”, con un volumen final de 50 µl.

Las temperaturas programadas fueron de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 1 min a 72 °C durante 35 ciclos, amplificando fragmentos de 110 pb a partir de un amplificado de 166 pb, con el par de *primer forward* [5'-GTACATTGTTTTATTAATTTCC-3'] *reverse* [5'-GTCTTTGTGAAAACATCACC-3'].

Electroforesis

Para la revisión del amplificado de 110 pb del PCR anidado, se realizó un corrimiento del material genético en gel de agarosa por polaridad molecular. Para su corrimiento se preparó un gel de agarosa al 1.5 %, tomando un volumen de 55 ml de amortiguador Tris borato EDTA (TBE) de una concentración de 0.5 X y agregando 10 µl de bromuro de etidio, se calentó la mezcla para disolver el agar, posteriormente se esparció en una placa colocando un peine para formar pozos, se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta solidificar el gel en la placa que fue sumergida en amortiguador TBE 0.5 X en una cámara submarina.

A cada pozo se agregó 7 µl de muestra, que contenía 5 µl de ADN templado y 2 µl de “gel loading”,. La cámara se conectó a una corriente de 75 voltios durante 2

h y, posteriormente, el gel fue colocado en un transiluminador de luz ultravioleta, donde se verificó la presencia de los amplicones de 110 pb de acuerdo a la escalera molecular, efectuando el registro fotográfico en el transiluminador de los fragmentos de ADN obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para esta investigación se llevaron a cabo tres muestreos en el lapso de un año (2009-2010) con la recolecta de 45 muestras de biopelículas, en el centro recreativo de aguas geotermales “El Géiser”, en el municipio de Tecozautla, Edo. de Hidalgo. Del total de muestras recolectadas 40 fueron positivas para amebas de vida libre termotolerantes a una temperatura inducida de incubación de 45 °C, en placas con agar no nutritivo (ANN/ *E. aerogenes*).

A partir de los organismos aislados se identificaron diez géneros amebianos: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Willaertia*, *Saccamoeba*, *Vannella*, *Nuclearia*, *Leptomyxa* y *Rhizamoeba*. Ubicando a los primeros tres como los más frecuentes, con una proporción del 84% (Fig. 4). *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella* han sido reconocidos en casos clínicos y en estudios epidemiológicos como especies patógenas con capacidad de causar infecciones de curso crónico y fatal.

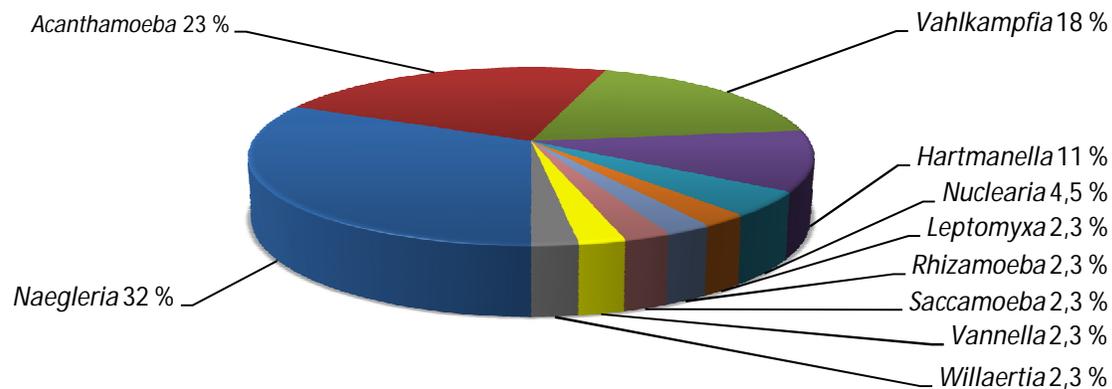


Figura 4. Frecuencia de géneros de AVL identificadas por estación de muestreo en un sistema de biopelículas, con una temperatura inducida de incubación de 45 °C.

De los organismos amebianos aislados del sistema de aguas termales “El Géiser”, el género *Naegleria* fue el más abundante con 32 % del total de aislados, identificándose cuatro especies: *N. fowleri*, *N. gruberi*, *N. jadini* y *N. lovaniensis*; siendo este último el más frecuente durante los dos primeros muestreos con 41 y 48 %, sin embargo, durante el tercer muestreo *Naegleria* representó solo el 28 %, destacando *Acanthamoeba* spp. con 35 %. Por otro lado, la diversidad de géneros fue de un 70 % durante el primero y tercer muestreo, lo que coincidió con un decremento en el registro de las temperaturas ambientales durante estos periodos, estableciéndose, probablemente, un medio óptimo de crecimiento en las biopelículas al cual respondieron los organismos amebianos y ello pudo haber influido, además, en la diversidad; siendo algunos organismos más o menos sensibles a este parámetro.

Por lo que respecta al género *Acanthamoeba*, éste fue el segundo más frecuentemente aislado con 23 % del porcentaje de incidencia y con el mayor número de especies identificadas de las cuales se reconocieron seis: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. polyphaga*, *A. triangularis*, y *A. rhyodes*. Las diversas especies del género fueron aisladas consistentemente a lo largo de los tres muestreos (Cuadro 3).

El género *Vahlkampfia* fue el tercer género con mayor frecuencia encontrado en esta investigación y, al igual que con los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, fue aislado en los tres muestreos realizados durante el año en el balneario termal y representó el 18 % del total de los organismos amebianos identificados en el lugar. Sólo una especie *Vahlkampfia enterica*, fue reconocida en el sistema.

Asimismo, las amebas del género *Hartmannella*, quienes representaron el 11 % de los aislados fueron identificadas también en los tres muestreos, sin embargo, solo un aislado, *H. vermiformis* pudo ser identificado a nivel de especie.

Por otra parte, se identificaron seis géneros menos persistentes que representaron el 16 % del todos los aislados amebianos obtenidos en el sistema termal. Entre ellos se reconoció la presencia de *Nuclearia* spp. con 4.5 % quien tuvo la mayor presencia, seguida de los géneros *Leptomyxa* sp., *Rhizamoeba* sp., *Saccamoeba* sp., *Vannella* sp. y *Willaertia* sp., que a su vez, fue identificada a nivel de especie; éstos géneros amebianos mencionados se reportan en la mayoría de los estudios como organismos oportunistas en animales domésticos, además de tener relación simbiótica con bacterias patógenas como *Legionella pneumophila* (Schuster 1996, 2004).

Del total de géneros identificados, el 40 % se encontraron en las biopelículas flotantes, por lo que esta tendencias de crecimiento y abundancia se cree son debido a las condiciones a las que se encuentran expuestas y que influyen sobre la función celular de cada microorganismo, adaptándose estos a las condiciones ambientales, además de la presencia de bacterias que les sirven como alimento influyendo, a su vez, como factor que favorece o limita la colonización amebiana.

La variedad de amebas oportunistas patógenas, así como las no patógenas para humanos y animales, estarán presentes en estos ambientes naturales, siempre y cuando tengan las condiciones necesarias, en tanto no se presenten limitantes de crecimiento.

Cuadro 3. Aislados identificados a nivel de género y especie

Estación muestreo	Muestreo I	Muestreo II	Muestreo III
1	<i>Nuclearia</i>	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	<i>Acanthamoeba</i> <i>Naegleria fowleri</i> <i>Vahlkampfia</i>
2	<i>Vahlkampfia</i>	<i>Vahlkampfia</i>	<i>Naegleria fowleri</i>
3	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Willaertia magna</i>	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba</i> <i>Acanthamoeba</i>
4	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba</i> <i>Naegleria</i>	<i>Acanthamoeba</i>
5		<i>Acanthamoeba</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Naegleria fowleri</i> <i>Naegleria gruberi</i> <i>Saccamoeba</i> <i>Vannella</i>
6	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba triangularis</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Nuclearia</i> <i>Vahlkampfia</i>
7		<i>Naegleria</i>	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Naegleria gruberi</i> <i>Naegleria</i>
8	<i>Acanthamoeba</i> <i>Vahlkampfia</i> <i>Naegleria lovaniensis</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Naegleria fowleri</i> <i>Naegleria gruberi</i> <i>Naegleria jadini</i> <i>Naegleria</i> <i>Vahlkampfia</i>
9		<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba griffini</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba rhysodes</i>
10		<i>Hartmannella</i> <i>Naegleria</i>	<i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia</i>
11	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Acanthamoeba</i> <i>Hartmannella</i> <i>Leptomyxa</i> <i>Naegleria</i>	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Vahlkampfia</i>
12	<i>Hartmannella vermiformis</i> <i>Rhizamoeba</i>	<i>Hartmannella</i> <i>Naegleria fowleri</i>	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Vahlkampfia enterica</i>
13	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Vahlkampfia</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i>
14	<i>Hartmannella</i> <i>Naegleria fowleri</i> <i>Vahlkampfia</i>	<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Hartmannella</i>
15		<i>Acanthamoeba</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>

Desde el punto de vista epidemiológico y considerando la presencia de amebas descritas en la literatura como patógenas, se presenta un mayor riesgo de infección para las usuarios del balneario (estaciones de muestreo indicadas en el Cuadro 4), incrementándose por alguna perturbación en las biopelículas que,

al tener contacto con los bañistas, podría aumentar el riesgo para personas inmunocomprometidas, lesionadas o incluso individuos sanos, quienes podrían desarrollar infecciones mortales de corto plazo debido a que, en la mayoría de los diagnósticos la enfermedad ya está avanzada; en las estaciones mencionadas se identificó una alta incidencia de *Acanthamoeba* y *Naegleria* (Fig. 4); las cuales, en casos clínicos, han sido las principales causantes de enfermedades infecciosas a nivel sistema nervioso como MEAP, EAG e infección en oídos, pulmón, ojos (queratitis amebiana, QA) (Rocha, 2009); cubriendo la mayoría de casos de amebiasis por AVL, ocurridos en todo el mundo.

Cuadro 4. Géneros amebianos aislados de las estaciones de muestreo, de un sistema de biopelículas en una zona geotermal (incluyen los tres muestreos por estación).

Estación de muestreo	Géneros amebianos
1	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Nuclearia</i> , <i>Vahlkampfia</i>
2	<i>Naegleria</i> , <i>Vahlkampfia</i>
3	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Willaertia</i>
4	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i>
5	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Saccamoeba</i> , <i>Vannella</i>
6	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Nuclearia</i> , <i>Vahlkampfia</i>
7	<i>Naegleria</i>
8	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Vahlkampfia</i>
9	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i>
10	<i>Hartmannella</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Vahlkampfia</i>
11	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Hartmannella</i> , <i>Leptomyxa</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Vahlkampfia</i>
12	<i>Hartmannella</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Rhizamoeba</i> , <i>Vahlkampfia</i>
13	<i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Vahlkampfia</i>
14	<i>Hartmannella</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Vahlkampfia</i>
15	<i>Acanthamoeba</i>

Morfometría

Para la identificación de los géneros de AVL termotolerantes, se hizo el reconocimiento de los estadios trofozoíto, quiste o ameboflagelado en medio axénico por morfometría con las claves dicotómicas.

Naegleria

Los aislados del género *Naegleria* sp., fueron identificados en 25 de 40 muestras positivas. Para la identificación del trofozoíto de *Naegleria* sp. (Fig. 5), los cultivos fueron incubados a 45 °C, buscando bajo microscopio formas limax con pseudópodos, de tipo lobópodo, con un tamaño entre 15 – 25 µm (Page, 1988); obteniendo una media de Me= 18.04 µm, denotando que la proliferación de

trofozoítos era mejor con una temperatura de 37°C en agar no nutritivo (ANN/ *E. aerogenes*) pues su crecimiento fue en medio axénico con temperatura óptima.

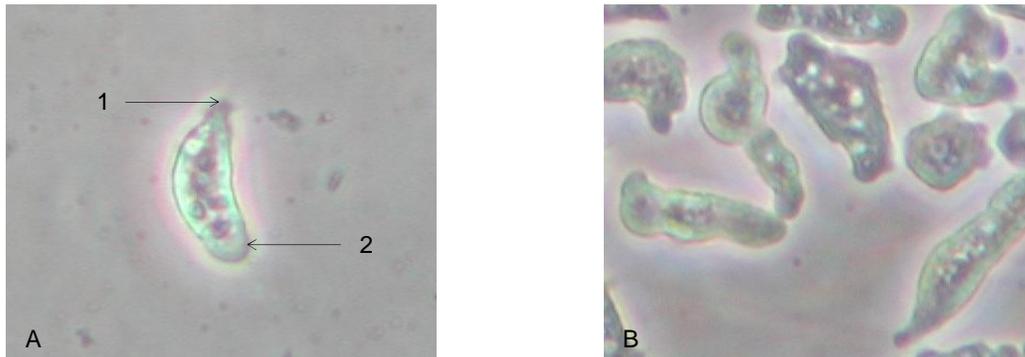


Figura 5. A. Trofozoíto de *Naegleria* sp., en forma limax, 1) filamento uroidal, 2) lobópodo; B. Representación de *Naegleria fowleri* en medio axénico. Microscopía de luz, magnificado a 40 X.

A partir de los aislados obtenidos, se hizo el reconocimiento de quistes (Fig. 6) con un tamaño de entre 7 y 15 μm , tomando en cuenta la presencia de otras especies de *Naegleria* de hasta 20 μm de diámetro; ostentando una media de $\text{Me} = 10.82 \mu\text{m}$, con la cual se infirió la presencia de *N. fowleri*, ya que la media de su quiste es un valor promedio al quiste de *N. fowleri*.

Durante la identificación de las amebas se reconoció la presencia de otras especies del mismo género, tales como: *N. gruberi* y *N. lovaniensis*, las cuales presentan diferencias significativas para diferenciarlas a nivel de especie; identificándolas por citometría (Cuadro 3), sin embargo, se llevaron a cabo pruebas de PCR anidado, aislando y amplificando un fragmento de 110 pb para confirmar que, en los aislados y en el reconocimiento morfológico, se tenía presente a *Naegleria fowleri*, tomando en cuenta que el género *Naegleria* se subdivide en aproximadamente 47 especies y que, morfológicamente, es incierto afirmar su identificación total.

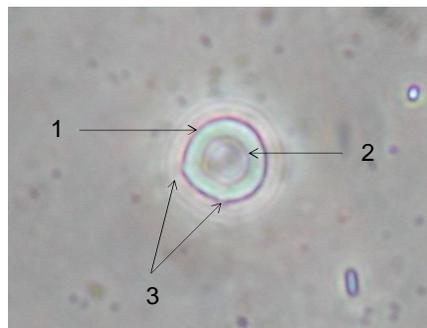


Figura 6. Quiste de *Naegleria* sp., 1) Ectoquiste, 2) Endoquiste, 3) Poros, a partir de placas de agar no nutritivo (ANN/ *E. aerogenes*), Microscopía de luz, magnificado a 40 X

Identificación molecular de *Naegleria fowleri*

Con el fin de confirmar el diagnóstico morfológico en 25 muestras, en los que se identificó a *Naegleria fowleri*, *Naegleria gruberi*, *Naegleria jadini*, *Naegleria lovaniensis* y *Naegleria* spp. se realizó el análisis por PCR anidado, como método específico y sensible para determinar la presencia de un gen en una región específica del genoma de la especie *N. fowleri*, de los demás microorganismos.

Para el análisis molecular se utilizó el ADN de los aislados amebianos, realizando una PCR con los iniciadores para amplificar un fragmento de 166 pb y luego se volvió a amplificar una fracción interna del primer producto para obtener un amplicón de 110 pb, para identificar la presencia de *Naegleria fowleri*. Para comprobar la especificidad de los *primers* se utilizó una cepa del ATCC (American Type Culture Collection) KUL 30808 de *N. fowleri*, positiva para dar un fragmento de 110 pb.

Durante el diagnóstico por electroforesis se identificaron cinco muestras positivas para *Naegleria fowleri*, en el caso de las 15 muestras que fueron colocadas en gel no se observan amplicones debido a la poca cantidad de material genético en muy baja cantidad al ser obtenido durante la extracción, al igual que de las cinco muestras restantes que no fueron corridas.

El análisis por PCR demuestra la presencia de *Naegleria fowleri* en los aislados, es decir, que de las cinco muestras en que hubo amplicones se considera 20 % de certeza para determinar la presencia de este organismo, el cual ha sido el más letal y patógeno del grupo de AVL's.

Un estudio realizado por Marciano – Cabral y col. (2003) en el condado de Arizona, se llevó a cabo en muestras de aguas de uso doméstico, donde se tomaron 19 muestras, de las cuales 17 resultaron positivas para *N. fowleri*, de las cuales no hubo previa extracción de material genético. Esta técnica al ser desarrollada por Réveiller y col. en 2001, afirmó que es confiable, específico, rápido y sensible, el cual fue comprobado a través de diversos ensayos.

En la figura 7 se muestran los amplicones de 110 pb de algunos de los aislados amebianos obtenidos del balneario “El Géiser” diagnosticados por PCR como pertenecientes a la especie *N. fowleri*. De los 25 aislados sólo se obtuvo el material genético de 20 muestras, las cuales fueron corridas en el gel para electroforesis, en las que se observan 5 marcas positivas

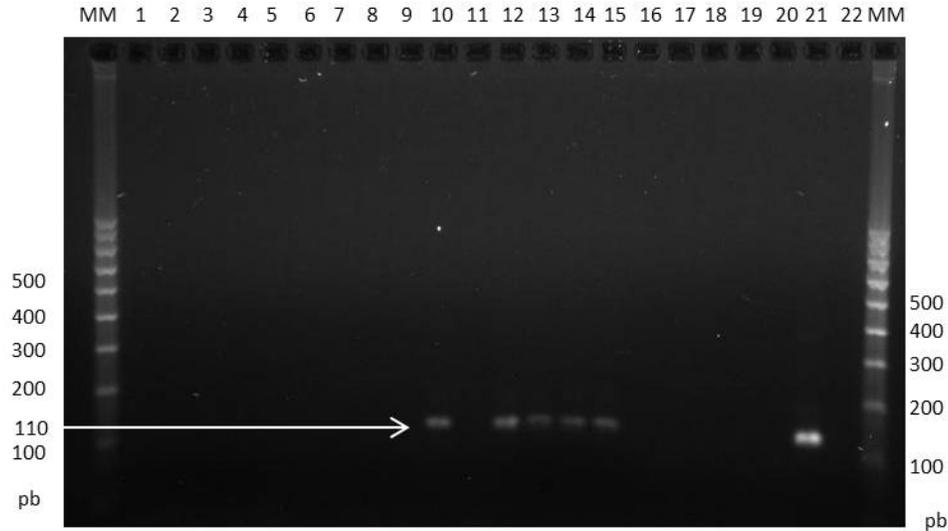


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, carriles 10, 12, 13, 14 y 15 se muestran los amplicones de 110 pb de aislados de *Naegleria fowleri* identificados por morfometría y su taxonomía confirmada por PCR carril 21 testigo positivo de *Naegleria fowleri* (KUL 30808) del ATCC. Los lugares 1-9, 11 y 16-20 fueron negativos a la formación del amplificado buscado.

***Acanthamoeba* sp.**

Acanthamoeba spp., fue identificada de acuerdo con la descripción detallada en las claves de Page (1988), para ello, se reconoció la fase trófica que puede llegar a medir desde 15 hasta 50 μm y, el quiste desde 10 hasta 20 μm (Schuster, 2004; Visvesvara, 2007; Li – Li, 2011), (Fig. 8); obteniendo la identificación taxonómica de tres especies, pertenecientes a los Grupos I, II y III de acuerdo a la morfología quística.

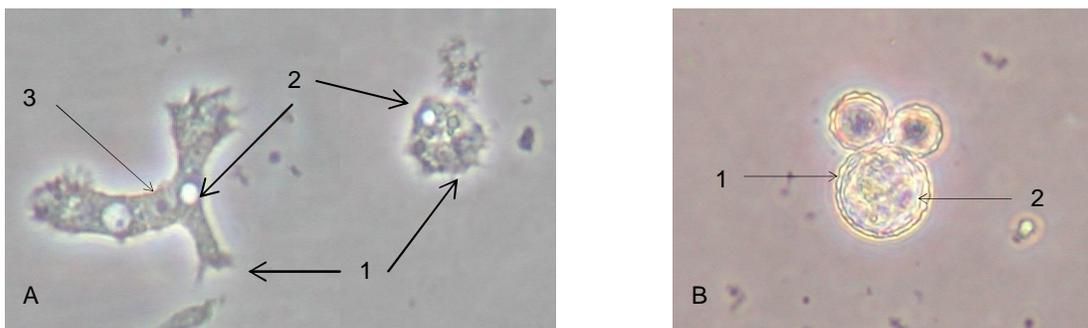


Figura 8. Formas tróficas de *Acanthamoeba* spp.; A. Trofozoíto en división aplanada, Microscopía de luz, magnificada a 20 X; 1) Acantópodos, 2) Vacuola contráctil, 3) Núcleo; B. Quiste estrellado, 1) Ectoquiste, 2) Endoquiste y representación de los diferentes tamaños de quiste de una misma especie. En medio axénico, Microscopía de luz magnificado a 40 X.

Como parte del análisis morfológico, también se identificó a otro género de interés médico: *Hartmannella* sp. que ha sido poco frecuente en casos médicos, aunque tiene un peso importante su investigación, por su capacidad infectiva.

Temperatura

Distribución de amebas en relación a la temperatura ambiental

Como parte de las características consideradas para determinar la ubicación taxonómica de los aislados de gimnamoebas, se realizaron pruebas de tolerancia a la temperatura, condición particular de las especies patógenas para soportar temperaturas de entre 42 y 45 °C (Tyndall, 1989) en diferentes microhábitats naturales o en condiciones de laboratorio.

Se reconocieron diez géneros amebianos con capacidad para desarrollarse y crecer bien con una temperatura de incubación a 45 °C, tales como *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Willaertia*, *Saccamoeba*, *Vannella*, *Nuclearia*, *Leptomyxa* y *Rhizamoeba*.

Naegleria spp., fue identificada en 25 de 40 muestras a partir de temperaturas iniciales de entre 19 y 43 °C (Fig. 9), alcanzando una cobertura del 62.5 % en temperatura máxima; por otro lado, estas amebas se han encontrado creciendo en temperaturas de hasta 65 °C (Marciano – Cabral, 1988) por pocos segundos. Diversos estudios han demostrado que las temperaturas elevadas favorecen el desarrollo de amebas patógenas y de manera especial a *N. fowleri*, (Tyndall, 1989; Behets, 2006); además de otras amebas con capacidad de producir infecciones en seres humanos y animales.

Durante este análisis se identificó, en una temperatura inicial de 39 °C a la especie *N. lovaniensis*, la cual no se ha descrito como patógena para el ser humano pero, es capaz de permanecer en trofozoíto. Esta ameba creció a una temperatura de incubación de 45 °C, hallándose en ambientes acuáticos cálidos, sin embargo, a pesar de ser una ameba termófila tampoco se ha reportado su patogenicidad en ratones.

Así mismo, se encontró a la especie *N. gruberi* creciendo a una temperatura máxima de incubación de 45 °C, este aislado amebiano fue observado en muestras de agua a una temperatura de 20 °C; aunque diversos estudios reportan que la temperatura máxima de crecimiento para esta especie ha sido de hasta 39 °C en una de sus variantes (*N. gruberi sensu stricto*), dada a conocer por De Jonckheere (2002). Otra especie identificada fue *N. jadini*, aislada de una temperatura inicial de 38 °C, la cual fue tolerante a 45 °C aunque se ha reportado su crecimiento a una temperatura máxima de hasta 35 °C; por lo que el crecimiento a 45 °C de estas dos especies puede que hayan adquirido mayor resistencia a cambios de temperatura por las condiciones ambientales, observándose así la relación proporcional entre la temperatura y su frecuencia,

cabiendo la posibilidad de que *N. gruberi* y *N. jadini* se hayan adaptado a las condiciones termales de las biopelículas en que cohabitaban, adquiriendo mayor resistencia a la variación de gradientes, aunque se reconocen hasta el momento siete de 47 especies de este género capaces de crecer a 45 °C (Guzmán, 2008).

Otro género que fue aislado de las biopelículas con mayor frecuencia, fue *Acanthamoeba*, la cual se identificó en 16 de 40 aislados, a partir de temperaturas iniciales 25 y 42 °C, aunque este género puede abarcar una mayor amplitud en su tolerancia a temperaturas altas y tiene la capacidad de sobrevivir en condiciones más extremas que *N. fowleri*. Se destaca la identificación de cinco especies de *Acanthamoeba* termotolerantes reconocidas como patógenas que fueron: *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. griffini* y *A. rhyodes*. Por otro lado, *Vahlkampfia* estuvo presente en 11 de 40 aislados, en temperaturas desde 19 hasta 43°C (Fig. 9) al igual que *Naegleria*, sin embargo, sólo cubrió el 27.5 % de los aislados con temperatura inducida; reportándose en estudios antes realizados su capacidad de tolerar temperaturas aún mayores a 45 °C a las que fueron inducidas (Rohr, 1998); permaneciendo en forma limax por más de 72 hrs. durante su incubación.

Durante los ensayos de tolerancia a la temperatura, *Hartmannella* sp. estuvo presente en 6 de 40 aislados (15 %) en ensayos de tolerancia a temperatura, aislándose de temperaturas iniciales desde 24 hasta 33 °C; esta ameba también es catalogada como un patógeno, reportándose en un caso de coinfección con *Vahlkampfia*, en córnea (Oddó, 2006).

Así mismo, se encontraron formas limax entre los gradientes de 19 hasta 33 °C con menor frecuencia como: *Nuclearia* sp. (5 %), que estuvo presente en el muestreo I, II en las estaciones 1 y 6 y *Saccamoeba* spp. (2.5 %) y *Vannella* sp. (2.5 %) en el muestreo III de la estación 5 las cuales estuvieron por debajo de los 24 °C, donde se registraron estos gradientes; aunque estuvieron presente en las temperaturas inducidas hasta 45 °C, *Leptomyxa* sp. (2.5 %) y *Willaertia* sp. (2.5 %) en aislados, además de *Rhizamoeba* sp. (2.5 %) que sólo se encontró a 33 °C y con tolerancia a los 45 °C (Fig. 9).

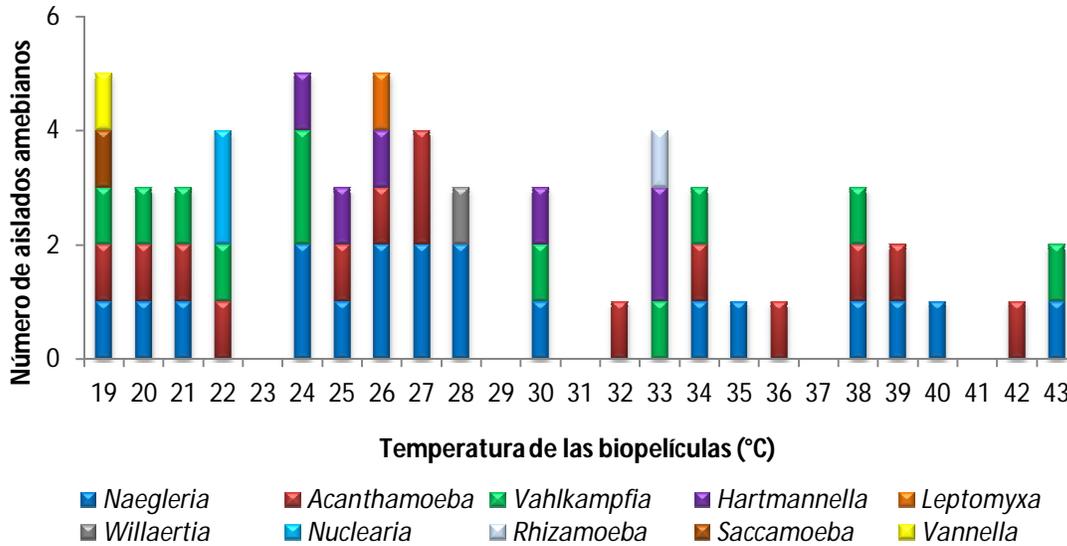


Figura 9. Distribución de AVL, en relación a los gradientes de temperatura en un sistema de biopelículas presentes en un sistema de aguas termales.

Temperatura de biopelículas

Por otro lado, durante la colecta en cada estación, se analizaron y registraron las temperaturas ambientales de cada muestra de biopelícula, y se observó entre los aislados que la mayoría de amebas se encontraba en una temperatura mínima de 19.6 °C, así como una temperatura máxima de 43 °C, habiendo una diferencia de más de 23 °C, sin considerar el periodo estacional, puesto que estos gradientes están regidos por el efecto geotermal en el agua, alcanzando temperaturas superiores a los 60 °C.

La mayor incidencia de especies amebianas fue de 75 % en los aislados de biopelícula de las estaciones 11 y 12, las cuales presentaron temperaturas de entre 21 y 33 °C, temperatura considerada como adecuada tanto para amebas patógenas como no patógenas; sin embargo, el mayor número de amebas se presentó en la estación 13 en biopelículas flotantes con rangos desde 39 hasta 43 °C y donde sólo se aislaron amebas de tipo patógenas; no obstante, los géneros permanecieron en incubación por más de 72 hrs.

Durante el estudio se observó que las temperaturas tendieron a aumentar en el muestreo II, obteniendo un valor máximo de 42 °C en la estación 13, con 0.4 °C de diferencia con relación a la temperatura externa del sitio de muestreo, sin embargo, sólo fue registrada en el muestreo I, con menor gradiente de temperaturas durante el muestreo II y III; por otro lado, en las estaciones 7, 8 y 13 se mantuvieron gradientes de temperatura relativamente altos durante los tres muestreos, esto debido a la alta incidencia con la actividad geotérmica. A diferencia de la estación 2 en la cual hubo una disminución de temperatura en el muestreo II, hubo un aumento en los gradientes de la estación 5, en los cuales

durante las colectas se encontraban alejadas del sitio de mayor actividad geotérmica, causando un altibajo de gradientes (Fig. 10).

Sin embargo, los picos más altos de temperatura fueron medidos durante el segundo muestreo, estando por debajo los valores del último muestreo (III), únicamente manteniéndose la muestra 12 durante los dos últimos muestreos; no obstante la actividad geotérmica se vio reducida durante este periodo, sin tomar en cuenta la estación anual por lo que las temperaturas atmosféricas, durante los tres muestreos, fueron de 27 °C, pudiendo haber una influencia de las corrientes atmosféricas sobre la incidencia del vapor de agua en las estaciones de muestreo.

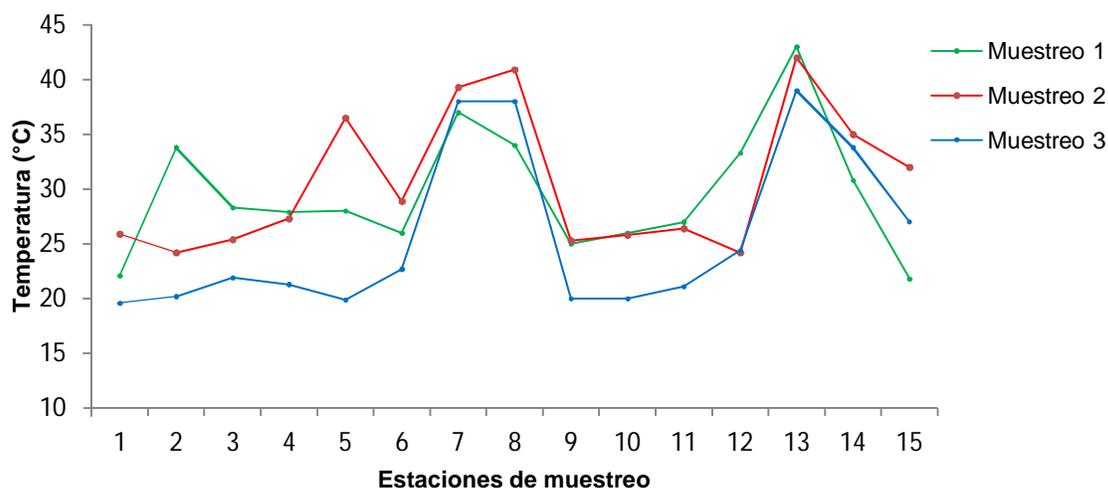


Figura 10. Variación de temperaturas por estación de muestreo en muestras de agua, durante tres muestreos, en una zona geotermal.

pH

De las 45 muestras colectadas se analizó el pH, obteniendo un ámbito de entre 8.75 y 9.57 en el agua que forma escorrentía para llenar el sistema de piscinas. Estudios preliminares reportan que la existencia de AVL puede estar presente en un ámbito de pH que fluctúa entre 4.6 y 9.5 unidades (Kyle y Noblet, 1985), e incluso algunas pruebas describen la sobrevivencia de amebas en valores de pH de entre 2 y 10 (Sykora, 1983) aunque no hay proliferación abundante; sin embargo, la mayor presencia de amebas se da en ambientes con pH de entre 7.3 y 7.8 (Rodríguez, 1994), con esta información se puede afirmar que el parámetro de pH de manera general no fue un condicionante para la abundancia y distribución de amebas en el sistema estudiado, dado que, los valores obtenidos estuvieron en un ámbito muy estrecho de casi pH 9 (Fig. 11). Sin embargo, en algunas estaciones donde el pH fue superior a 9.48, el número de amebas fue menor, o no hubo aislado de amebas.

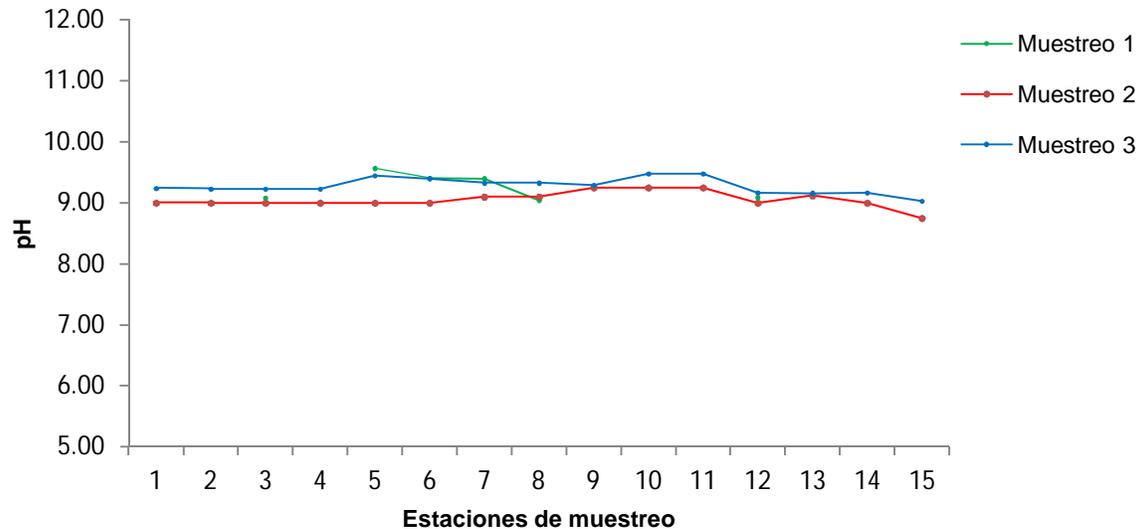


Figura 11. Unidades pH en el sistema de biopelículas, durante tres muestreos, en una zona geotermal.

Los valores obtenidos durante el periodo de muestreo I, registraron un pH de entre 9.08 y 9.57, registrando la estación 5 con el mayor pH y resultando negativo el aislado de AVL para esta estación, así como para las estaciones 7, 9, 10, 15, aunque no se tiene el registro de los pH's, se infiere que estos valores fueron superiores a los 9.48 unidades; sin embargo, se aislaron 10 de 15 muestras donde se registró un pH de 9.0, excepto por el aislado 6 que presentó pH de 9.41, con presencia de amebas.

Para el muestreo II y III los valores registrados fluctuaron en un gradiente de pH entre 8.7 y 9.4, encontrando el ámbito adecuado para las amebas, pues todas las muestras fueron positivas, aún con pH de 9.4. Por otro lado, los valores registrados se presentaron en un margen de alcalinidad, por lo que es necesario mencionar que la actividad microbiana es importante en estos ambientes tróficos, pues la acción heterotrófica aumenta los niveles de acidez o, por otro lado, el incremento de un ambiente la alcaliniza, sin embargo, también intervienen otros factores como el tipo de suelo, el cual, en este estudio, se ha reconocido de tipo feozem, que se caracteriza por tener un pH básico (Urbina, 2006), siendo arrastrados los iones en el sistema acuático, influyendo además en la conductividad de la zona.

Conductividad

Para la conductividad se valoraron las concentraciones que tienen efecto en la sobrevivencia de la microfauna, afectando la actividad extracelular de cada microorganismo, no obstante, los ambientes acuáticos se han catalogado como salinos cuando alcanzan una concentración >3 gr ($3,000 \mu\text{S}/\text{cm}^3$) y dulceacuícola los que están por debajo de esta concentración (Calderón, 2008).

En el caso del sistema estudiado, las concentraciones registradas estuvieron entre 1,160 y 1,900 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ (Fig. 12), con una diferencia de 740 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$; sin embargo, los valores se mantuvieron relativamente estables durante los muestreos. Esto podría deberse a las pendientes de las zonas de muestreo, que al no presentar estancamiento permite arrastre de iones, resultando en una concentración moderada. No obstante, se ha reportado que en las concentraciones óptimas de crecimiento para la colonización de especies patógenas como *N. fowleri*, ($>2,000 \mu\text{S}/\text{cm}^3$) también puede predominar *Acanthamoeba* sp. (Behets, 2006).

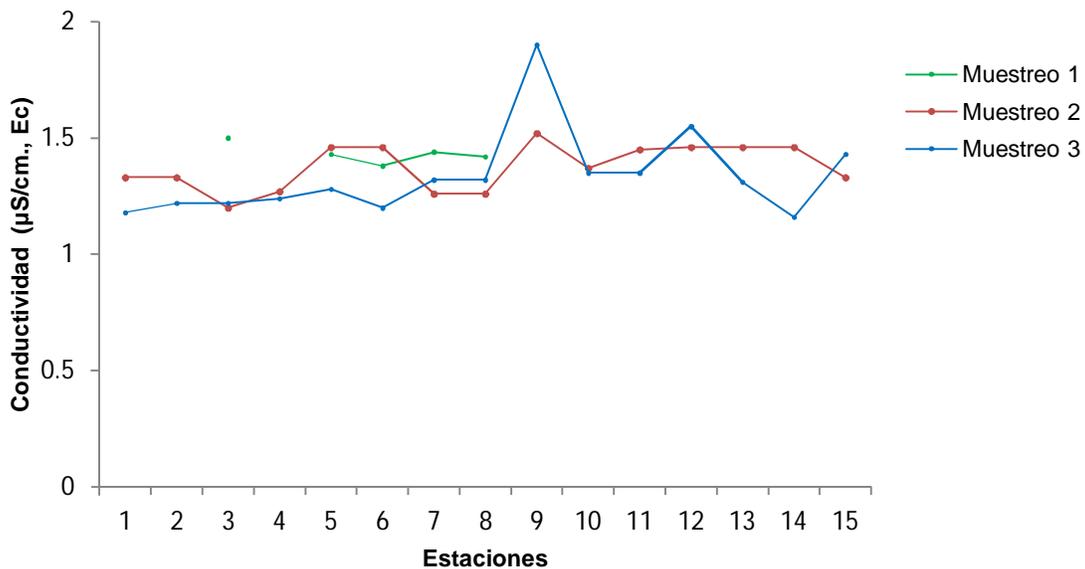


Figura 12. Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}^3$, Ec) de zona geotermal, en un sistema de biopelículas, durante tres muestreos.

Por otro lado, las concentraciones de salinidad tienden a elevarse cuando los gradientes de temperatura se incrementan, al igual que el pH, cuando la temperatura disminuye las concentraciones iónicas y el pH disminuye, influyendo sobre la microflora, de tal manera que los lugares de muestreo presentaban temperaturas bajas con valores elevados de conductividad, percibiendo una disminución de amebas o la existencia de un género por otro. Sin embargo, estudios realizados en este mismo balneario, en el sistema de piscinas, se registraron concentraciones de hasta 2,963 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$, encontrando principalmente en 2,000 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ la presencia de amebas (Urbina, 2006); por otro lado, la mayor concentración de amebas en este estudio se situó principalmente en concentraciones de 1430 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ (Fig. 12), por lo tanto, no fue un factor condicional de crecimiento para las AVL, ya que estas pueden adaptarse a las condiciones, pero que puede tener un efecto sobre algunas comunidades estrictas.

CONCLUSIONES

Se comprobó que el tipo de sustrato y las características de las biopelículas no condicionan la presencia de AVL, ya que éstas fueron encontradas en las biopelículas fijas y flotantes presentes en el balneario “El Géiser” en Tecozautla, estado de Hidalgo.

En tres muestreos realizados en el lapso de un año se llevo a cabo la recolecta de 45 muestras de biopelículas, de las cuales se obtuvo 40 muestras positivas para amebas de vida libre termotolerantes a una temperatura inducida de 45 °C.

A partir de los organismos aislados se identificaron diez géneros amebianos: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, *Willaertia*, *Saccamoeba*, *Vannella*, *Nuclearia*, *Leptomyxa* y *Rhizamoeba*. Siendo los primeros tres los más frecuentemente aislados, con una proporción del 84 % *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella* han sido reconocidos en casos clínicos y en estudios epidemiológicos como especies patógenas con capacidad de causar infecciones de curso crónico y fatal.

Se destaca la identificación de tres géneros termotolerantes y sus especies como; *Acanthamoeba* (*A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. griffini*, *A. rhysodes*), *Hartmannella vermiformis* capaces de producir EAG y algunas relacionadas a queratitis amebiana (QA), además de *Naegleria fowleri*, relacionada con MEAP; como potencialmente patógenas.

17 aislados fueron identificados por morfometría como *Naegleria fowleri*, una ameba que se ha descrito extensamente en la literatura como altamente patógena por producir MEAP en los seres humanos.

Los parámetros fisicoquímicos de pH, conductividad eléctrica y temperatura atmosférica, no fueron determinantes en la abundancia y distribución de amebas de vida libre, sin embargo, el factor de mayor impacto para el desarrollo de amebas patógenas fue la temperatura registrada de las biopelículas de 19 – 43 °C.

La utilización de la técnica de PCR anidado permitió confirmar la presencia de *Naegleria fowleri* a través de un fragmento de ADN de 110 pb, con lo que se confirmó de manera confiable y precisa la ubicación taxonómica a nivel de especie de los aislados termotolerantes identificados por morfometría y la confiabilidad de esta técnica.

El comportamiento de estas amebas, así como su hallazgo en este centro recreativo, significa un riesgo para los visitantes tomando en cuenta que el agua de este sistema es usada como terapia médica para diversas enfermedades.

Las AVL son considerados parásitos facultativos y oportunistas por lo que existe una elevada probabilidad de producir infecciones que pueden llegar a ser fatales, con escasez de tratamientos especializados para cada una de ellas. Por lo que se recomienda no tener contacto con estos sistemas si se tienen heridas que sirven como vías de entrada al organismo o alguna condición de inmunosupresión, así como no nadar con lentes de contacto debido a la presencia de *Acanthamoeba* con sus especies capaces de provocar cuadros clínicos de queratitis amebiana.

LITERATURA CITADA

- Barbour, S. E. y Marciano – Cabral, F. 2001. *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A₂. *Biochimica et Biophysica Acta* **1530**: 123 – 133.
- 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**: 1249 – 1256.
- Betancourth, M., Botero, E. J. y Rivera, S. P. 2004. Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica* **35** (3): 34 – 39.
- Bonilla, P., A. Esparza, D. Hernández, S. Rojas, M. Rodríguez, E. Ramírez, R. Campos, A. Jarillo, L. Alvarez, P. García, F. González, S. Felix y García, Y. 2001. Mixed brain infection by *Acanthamoeba* and *Aspergillus* sp. case report. **En: Xth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae.** John Libbey Eurotext, París, Francia. pp. 19-25.
- Calderón, V. A. 2008. *Aislamiento de la Ameba patógena Naegleria fowleri del Agua de los Canales de Riego de Mexicali, Baja California.* Tesis de Maestría en Ciencias (Biol. Celular), Facultad de Estudios Superiores – Iztacala, UNAM. México. 84 pp.
- Carter, R. F. 1970. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo – encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *J. Pathol.* **100** (4):217-44.
- Castrillón, L. E., Palma, A. y Padilla, M. 2010. Importancia de las biopelículas en la práctica médica: Artículo de revisión. *Dermatol. Rev. Mex.* **54** (1): 14 – 24.
- Cervantes – Sandoval, I. Serranop, J., García, E., Tsutsunmi, V. y Shibayama, M. 2008. Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol. Internat.* **57**: 307 – 313.
- Cubero – Menéndez, O. y Cubero – Rego, D. 2004. Meningoencefalitis amebiana primaria: comunicación de un caso. *Rev. Neurol.* **38** (4): 336 – 338.
- Cuevas, P. M., Smoje, P. G., Jofré, M. L., Ledermann, 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.
- Deetz, T. R., Sawyer, M. H., Billman, G., Schuster, F. L. y Visvesvera, G. S. 2003. Successful treatment of *Balamuthia* amoebic encephalitis: presentation of 2 cases. *Clin. Infect. Dis.* **37**: 1304 – 12.

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. y Van de Voorde, H. 1977. The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **26**: 10 – 15.

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

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

Eddyani, M., De Jonckheere, J. F., Durnez, L., Suykerbuyk, P., Leirs H. y Portaels, F. 2008. Occurrence of free – living amoebae in communities of low and high endemicity for buruli ulcer in southern benin. *App. Environmen. Microbiol.* **74** (21): 6547– 6553.

Ford, T., Hermon, J., Nichols, G., Cangelosi, G. y Bartram, J., 2004. Approaches to risk management in priority setting. *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management*, 12. World Health Organization, London, UK. pp. 169 – 178.

Galarza, C., Gutiérrez, E., Uribe, M., Ramos, W., Ortega, A., Ávila, J., Hanco, J., Espinoza, Y., Espinoza, M., Navimcopa, M. y Gámez, D. 2006. Amebas de vida libre en lesiones cutáneas: reporte de 4 casos. *Dermatol. Peru* **16** (1): 36 – 40.

Górnik, K. y Kuzna – Grygiel, W. 2004. Presence of virulent strains of amphizoic amoebae in swimming pools of the city of szczecin. *Ann. Agric. Environ. Med.* **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. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **47** (2): 524 – 528.

Grate, I. 2006. Primary amebic meningoencephalitis: a silent killer: Case report – Observations de cas. *Can. J. Emerg. Med.* **8** (5): 365 – 369.

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

Guerrero, R. y Berlanga, M. 2006. Los cambios de paradigma en microbiología. Universidad de Barcelona. *Actualidad SEM.* **42**: 24 – 31.

Guzmán – Fierro, E., De Jonckheere, J. y Lares – Villa, F. 2008. Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos en Hornos, Sonora. *Rev.Mex. de Biodiv.* **78**: 1 – 5.

Gupta, N., Bhaskar, H., Duggal, S., Ghalaut, P. S., Kundra, S. y Arora, D., R. 2009. Primary amoebic meningoencephalitis: first reported case from Rohtak, North India. *The Braz. J. of Infect. Dis.* **13** (3): 236 – 237.

Haro, I. 2007. *Manuales Departamentales: Parasitología*. Unidad Temática IV. Facultad de Medicina, UNAM. México. 83 pp.

Herbst, R., Ott, C., Jacobs, T., Marti, T., Marciano – Cabral, F. y Leippe M. 2002. Pore-forming polypeptides of the pathogenic protozoa *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem.* **277** (25): 22353 – 22360.

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

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

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2010. *Mapa de climas del Estado de Hidalgo*.
<http://mapserver.inegi.org.mx/geografia/espanol/estados/hgo/clim.cfm?c=444&e=23> [consulta: lunes, 07 de Junio de 2010]

Jones, K., Singhatiraj, E., MacDougall, R., Beaver, T. y Nugent, K. 2009. A 22 year old man with headache and stiff neck after a water skiing fall. *J. Chest Physic.* **135**: 225 – 227.

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. 2001. Free-living Amoebae Infections in Mexico. **En: IX th Internacional Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free - Living Amoebae**. John Libbey Eurotext. París, Francia. pp. 13 – 18.

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, Mexico: study of the isolates. *J. Clin. Microbiol.* **31** (3): 685 – 688.

Lee, S., Huang, Ch., Lee, S. y Hsu, Ch. 2000. Successful treatment of primary amebic meningoencephalitis: A case report. *Neurol. J. Southeast Asia*. **5**: 41 – 44.

Li – Li, C., Joon – Wah, M., Yoon – Tong, L., Thuan –Tzen, K., Init, I. y Shar, M, M. 2011. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* spp. from air-conditioners in Kuala Lumpur, Malaysia. *Act. Trop.* **117**: 23 – 30.

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

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

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

Maya, C., Beltrán, N., Jiménez, B. y Bonilla, P. 2003. Evaluation of the UV disinfection process in bacteria and amphizoic amoebae inactivation. *Water Science and Technology: Water Supply* **3** (4): 285 – 291.

Morales, J. A., Chaves, A. J., Visvesvara, G. S. y Dubey, J. P., 2006. *Naegleria fowleri* - associated encephalitis in a cow from Costa Rica. *Vet. Parasitol.* **139**: 221 – 223.

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 – 111.

Oddó, D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo – clínicos: Infectología al día. *Rev. Chil. Infect.* **23** (3): 200 – 214.

Ortíz, A. A., Vázquez, T. O., Morales, Q. D. M., Llamosas, G.B., Flores, R.J.O., y Valencia, R. S. 2000. Encefalitis por amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* spp. *Acta Ped. de México* **21** (3): 61 – 66.

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

Pemán, J., Cantón, E. y Valentín, A. 2008. Actividad de la anidulafungina sobre pelóculas de *Candida*. *Rev. Iberoam. Micol.* **25**: 124 – 128.

Peralta, R., Ayala, O. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos: Artículo original. *Salud Uninorte. Barranquilla*. **25** (2): 280 – 292.

Petit, F., Vilchez, V., Torres, G., Molina, O., Dorfman, S., Mora, E. y Cardoza, J. 2006. Meningoencefalitis amebiana primaria: comunicación de dos nuevos casos Venezolanos. *Arq. Neuropsiquiatr.* **64** (4):1043 – 1046.

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

Robinson, B. S., Monis, P.T., Henderson, M., Gelonese, S. y Ferrante, A. 2003. Detection and significance of the potentially pathogenic amoeboflagellate *Naegleria italica* in Australia. *Parasitol. Internat.* **53**: 23 – 27.

Rocha – Acevedo, B., Tanowitz, H. y Marciano – Cabral, F. 2009. Diagnosis of infections caused by pathogenic free – living amoebae: *Review Article. Inter. Persp. Inf. Dis.* 1 – 14.

Rodríguez, P. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri* informa de un caso. *Infec.* **4** (10): 263 – 266.

Rodríguez – Zaragoza, S. 1994. Ecology of free – living amoeba. *Crit. Rev. in Microbiol.* **20** (3): 225 – 241.

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

Schuster, F. L., Dunnebacke, T. H., Booton, G. C., Yagi, S., Kohlmeier, C. K., Glaser, C., Vugia, D., Bakardjiev, A., Azimi, P., Maddux - Gonzalez, M., Martinez, A. J. y Visvesvara, G. S. 2003. Environmental Isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* **41**(7): 3175 –3180.

Schuster, F. L., Guglielmo, B. J. y Govinda, S. 2006. *In-vitro* activity of miltefosine and voriconazole on clinical isolates of free – living amebas: *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba spp.* y *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot. Microbiol.* **53** (2): 121 – 126.

Schuster, F. L. y Visvesvara, G. S. 2004. Free – living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals: Invited review. *Internat. J. Parasitol.* **34**: 1001 – 1027.

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, H. y Im, K. 2004. Pathogenic free-living amoebae in Korea. *Korean J. Parasitol.* **42** (3): 93 – 119.

Singhal, T., Bajpai, A., Kalra, V., Kabra, S. K., Samantaray, J. C., Satpathy, G. y Gupta, A. K. 2001. Successful treatment of *Acanthamoeba* meningitis with combination oral antimicrobials. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **20**: 623 – 627.

Slater, C. A., Sickel, J. Z., Visvesvara, G. S., Pabico, R. C. y Gaspari, A. A., 1994. Brief report: successful treatment of disseminated *Acanthamoeba* infection in an immunocompromised patient. *N. Engl. J. Med.* ; **331**: 85 – 7.

Sohn, H., Kim, J., Shin, M., Song, K. y Shin, H. 2010. The Nf-actin gene is an important factor for food-cup formation and cytotoxicity of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Parasitol. Res.* **106**: 917 – 924.

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

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

Urbina, M. C. 2006. *Efecto de la Temperatura Sobre la Distribución de Amebas de Vida Libre en un Sistema de Aguas Termales Alimentado por un Géiser en el Estado de Hidalgo*. Tesis de Licenciatura en Biol., Facultad de Estudios Superiores – Iztacala, UNAM. México. 64 pp.

Valenzuela, A., López, C. y De Jonckheere. 1984. Primary amebic meningoencephalitis in a young male from northwestern México. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**: 558 – 559.

Vargas – Zepeda, J., Gómez, V., Vázquez, J., Licea, L., De Jonckheere, J. y Lares, F. 2005. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin: case report. *Arch. of Med. Res.* **36**: 83 – 86.

Vernhes, M. C., Benichou, A., Pernil, P., Cabanes, P. A. y Teissié, J. 2002. Elimination of free – living amoebae in fresh water with pulsed electric fields. *Water Res.* **3828**: 1 – 10.

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*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **50**: 1 – 26.

Winięcka – Krusnella, J. y Linder, E. 2001. Bacterial infections of free-living amoebae: Mini – review. *Res. Microbiol.* **152**: 613 – 619.

ANEXO 1

Medios de cultivo

Medio NNE

Para aislar AVL se emplearon placas con agar no nutritivo con una cepa de bacteria *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor a baño de agua a 70 °C durante 30 min: medio conocido como Agar no nutritivo con *E. aerogenes* (ANN/*E. aerogenes*). El medio ANN/*E. aerogenes* proporciona las sales y la fuente de carbono a partir de la bacteria, 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).

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.....	15.000 g
Agua destilada.....	1000 ml

El medio NNE se prepara mezclando todos los componentes en seco y se agrega después agua destilada y se calienta hasta ebullición, posteriormente la mezcla se esteriliza a 121 °C durante 15 min; así mismo se deja enfriar el medio, no del todo, para verter 20 ml en placas de Petri (previamente esterilizadas), una vez que el agar solidifica, se inoculan 0.5 ml de solución de bacterias *E. aerogenes* inactivada, la cual se distribuye homogéneamente por toda la superficie con una varilla de vidrio acodada. Las placas de ANN se dejan reposar una hora aproximadamente y posteriormente se guardan y conservan en un cuarto refrigerado a °C.

Medio Bactocasitona

Este medio líquido de bactocasitona al 2 % se utiliza para el cultivo y aislamiento de amebas libres de bacterias que previamente hayan crecido en el medio NNE (Cervantes, 2008)

Bactocasitona.....2.0 g
Agua.....1000 ml

Se mezcla la bactocasitona en el agua destilada, después es envasada en tubos de ensaye con tapón de rosca, agregando a cada tubo 2.7 ml del medio, posteriormente son esterilizados a 121 °C durante 15 min.

Una vez que se haya esterilizado el medio se deja enfriar a temperatura ambiente, se agrega a cada tubo en condiciones de esterilidad 0.3 ml de suero fetal de ternera, adicionado con antibióticos: penicilina y kanamicina a una concentración de 200 mg/ ml, posteriormente los tubos son utilizados o almacenados en un cuarto refrigerado.

ANEXO 2

Cuadro de parámetros fisicoquímicos de los tres muestreos

Cuadro A, 1. Temperatura de biopelículas, agua, pH y conductividad (incluyen los tres muestreos por estación).

Muestra	Parámetros fisicoquímicos											
	T. (°C) de biopelícula			T. (°C) de agua			pH			Conductividad (µS)		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III	I	II	III
1	22.1	25.9	19.6	ND	27.3	22.1	ND	9.0	9.24	ND	1.33	1.18
2	33.8	24.2	20.2	ND	27.3	18.8	ND	9.0	9.23	ND	1.33	1.22
3	28.3	25.4	21.9	33.5	25.4	18.8	9.08	9.0	9.23	1.5	1.20	1.22
4	27.9	27.3	21.3	ND	43.2	40.1	ND	9.0	9.23	ND	1.27	1.24
5	28.0	36.5	19.9	28.0	36.5	22.5	9.57	9.0	9.45	1.43	1.46	1.28
6	26.0	28.9	22.7	26.0	36.5	23.9	9.41	9.0	9.40	1.38	1.46	1.20
7	37.0	39.3	38.0	37.0	39.5	45.0	9.4	9.1	9.33	1.44	1.26	1.32
8	34.0	40.9	38.0	34.0	34.0	45.0	9.04	9.1	9.33	1.42	1.26	1.32
9	25.0	25.3	20.0	ND	33.9	20.5	ND	9.25	9.29	ND	1.52	1.9
10	26.0	25.8	20.0	ND	33.9	20.0	ND	9.25	9.48	ND	1.37	1.35
11	27.6	26.4	21.11	ND	33.9	20.0	ND	9.25	9.48	ND	1.45	1.35
12	33.3	24.2	24.4	33.13	26.0	40.2	9.09	9.0	9.17	1.46	1.46	1.55
13	43.0	42.0	39.0	ND	42.4	38.0	ND	9.12	9.16	ND	1.46	1.31
14	30.8	35.5	33.8	ND	35.3	38.0	ND	ND	9.17	ND	1.46	1.16
15	21.8	32.0	27.0	ND	30.7	24.0	ND	8.75	9.03	ND	1.33	1.43

ND: no hay datos