



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Acanthamoeba*
spp. PATÓGENAS DEL AGUA POTABLE DE LA ZONA
METROPOLITANA DEL VALLE DE MÉXICO (ZMVM)”**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

María Jimena Mendoza Romero

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



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2014.



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:

Pese a todas las adversidades, el tener la posibilidad de poder ver realizada una de mis tantas metas que me propuse cumplir desde que era niña es tan satisfactorio y emocionante a la vez que me motiva a seguir y a no darme por vencida.

Este logro es compartido, pues no habría sido posible sin el apoyo de las personas que han estado conmigo, animándome, brindándome su amor y amistad.

Le agradezco a Dios por darme la fortuna de tener unos padres maravillosos, los cuales, además de haberme dado la vida, me han dado tanto amor y apoyo. Quiero agradecer en especial a mi Mamá y Papá, ya que son el motor de mi vida y mi ejemplo a seguir, esto es gracias a ustedes.

A mi hermana Angélica, la cual ha sido una amiga de toda la vida e independientemente de nuestras diferencias, siempre me ha apoyado. A mi sobrinito Axel, que a pesar de ser todavía un niño pequeño, me recuerda que aunque uno crezca, nunca se debe perder la curiosidad de seguir descubriendo el mundo.

A mis amigos, aquellos colegas (Biologos) que a lo largo de la carrera se convirtieron en mis hermanos, compartiendo hermosas experiencias con toda una gama de emociones. Siempre los llevare en mi corazón, gracias por su apoyo, en especial a mis muy queridos amigos Celina, Armando y Diana, los cuales siempre están para apoyarme, los quiero mucho amistades.

A mis profesores en general, pero en especial al M. en C. Arturo Calderón Vega y a la Dra. Elvia Gallegos Neyra por su apoyo y comprensión que me dieron a lo largo del desarrollo de este proyecto de Tesis, además de su valiosa amistad, confianza y sobre todo la gran calidad humana que los caracteriza.

A mis sinodales, a la M. en C. María Dolores Hernández Martínez, a la Biól. Blanca Nieves Martínez Rodríguez y al Biól. José Ángel Lara Vázquez, por su disposición y tiempo para revisar mi trabajo, así como para darme sus observaciones y sugerencias para mejorar la calidad de este.

“Hay una fuerza motriz más poderosa que el vapor, la electricidad y la energía atómica. Esa fuerza es la voluntad”

Albert Einstein

Dedicatoria:

“Con todo mi amor para las personas que hicieron lo posible para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento”

Dedico este trabajo a mis padres:

Mamá, muchas gracias por motivarme a creer en mí, a no dudar de mis capacidades, pero sobre todo por el amor y el apoyo que me brindas cada día. Gracias por enseñarme que las ganas de vivir son más fuertes que la enfermedad, esa es la vitalidad que te caracteriza. ¡Te amo MAMÁ!

Papá, es una satisfacción tan grande por fin culminar uno de mis sueños, esto en gran parte es por ti, ya que me has enseñado a ser responsable y sobre todo a ser constante. Esta es una forma de agradecer un poco por todos los sacrificios que has hecho por mí y por mi educación. ¡Te amo PAPÁ!

No encuentro las palabras para agradecer tanto que han hecho por mí, cada logro es gracias a ustedes porque siempre han respetado y apoyado mis decisiones y sobre todo nunca han dudado de mí, por eso los amo.

¡G R A C I A S!

CONTENIDO

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCIÓN	2
1.	Amebas de Vida Libre (AVL).....	2
1.1.	Características de las AVL.....	4
1.2.	Ecología de las AVL.....	5
1.3.	Principales grupos de AVL.....	5
2.	Ubicación taxonómica de <i>Acanthamoeba</i>	6
2.1.	Morfología y ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i>	8
2.1.1.	Trofozoíto.....	8
2.1.2.	Quiste.....	9
2.2.	Clasificación morfológica.....	10
2.3.	Clasificación molecular.....	12
3.	Importancia médica.....	15
3.1.	Queratitis amebiana (QA).....	16
3.2.	Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG).....	17
3.3.	Acantamebiosis cutánea (AC).....	18
4.	Factores de patogenicidad.....	19
4.1.	Endosimbiontes.....	20
5.	Aspectos ecológicos.....	20
6.	Sistema de distribución de agua potable.....	21
6.1.	Panorama general del agua en México.....	21
6.2.	Aguas superficiales.....	22
6.2.1.	Región Hidrológica Administrativa XIII	22
6.2.1.1.	Agua potable de la ZMVM.....	22
6.2.1.2.	Calidad del agua en la ZMVM.....	23
III.	ANTECEDENTES	25
IV.	JUSTIFICACIÓN	28
V.	OBJETIVOS	29
VI.	ÁREA DE ESTUDIO	30
VII.	MATERIAL Y MÉTODOS	32
1.	Trabajo de campo.....	32
1.1.	Recolecta y transporte de las muestras de agua.....	32
1.2.	Registro de parámetros físico-químicos de las muestras “ <i>in situ</i> ”.....	32

2.	Trabajo de laboratorio.....	32
2.1.	Aislamiento y cultivo de las AVL.....	32
2.2.	Identificación morfológica de las amebas aisladas.....	33
3.	Métodos estadísticos.....	33
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
1.	Aislados amebianos.....	34
2.	Identificación taxonómica del género <i>Acanthamoeba</i>	38
3.	Taxonomía, descripción y registro fotográfico de <i>Acanthamoeba</i>	40
a)	<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	41
b)	<i>Acanthamoeba castellanii</i>	42
c)	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	43
d)	<i>Acanthamoeba griffini</i>	44
e)	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	45
f)	<i>Acanthamoeba quina</i>	46
g)	<i>Acanthamoeba rhyodes</i>	47
h)	<i>Acanthamoeba</i> sp.....	48
i)	<i>Acanthamoeba triangularis</i>	49
4.	Distribución de <i>Acanthamoeba</i> en los sitios muestreados.....	50
5.	Parámetros fisicoquímicos.....	52
5.1.	Temperatura.....	52
5.2.	Cloro libre residual.....	53
5.3.	pH.....	54
5.4.	Conductividad.....	55
6.	Análisis estadístico de parámetros fisicoquímicos.....	56
IX.	CONCLUSIONES.....	57
X.	RECOMENDACIONES.....	58
XI.	BIBLIOGRAFÍA.....	59
XII.	ANEXOS.....	67
	ANEXO I. MEDIO NNE.....	68
	ANEXO II. Medio PBSGM (Medio Chang).....	69
	ANEXO III. Modificación a la NOM-127-SSA1-1994.....	70
	ANEXO IV. Registro de especies identificadas.....	71

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general de los componentes morfológicos generales.....3 de una gimnameba	
Figura 2. Esquema general de los componentes morfológicos.....4 generales de un quiste de una gimnameba	
Figura 3. Clasificación propuesta por Otto Bütschli (1880-1889).....7	
Figura 4. Esquema del trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i>9	
Figura 5. Esquema del quiste de <i>Acanthamoeba</i>10	
Figura 6. Principales factores relacionados con la queratitis amebiana (QA)..16	
Figura 7. Factores relacionados con la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG).....17	
Figura 8. Factores relacionados con la acantamebiosis cutánea (AC).....18	
Figura 9. Factores que contribuyen a la virulencia de <i>Acanthamoeba</i>19	
Figura 10. Mapa de la Zona Metropolitana del Valle de México.....30 con los puntos de muestreo	
Figura 11. Proporción de géneros de AVL aislados de las muestras.....34 de agua de la ZMVM	
Figura 12. Total de porcentajes de aislados amebianos en cisterna,.....36 grifo y muestras negativas para AVL	
Figura 13. Porcentaje de especies aisladas del género <i>Acanthamoeba</i>38 a partir de las muestras de agua potable	
Figura 14. <i>Acanthamoeba astronyxis</i>41	
Figura 15. <i>Acanthamoeba castellanii</i>42	
Figura 16. <i>Acanthamoeba culbertsoni</i>43	
Figura 17. <i>Acanthamoeba griffini</i>44	
Figura 18. <i>Acanthamoeba polyphaga</i>45	
Figura 19. <i>Acanthamoeba quina</i>46	
Figura 20. <i>Acanthamoeba rhyodes</i>47	
Figura 21. <i>Acanthamoeba</i> sp.....48	
Figura 22. <i>Acanthamoeba triangularis</i>49	
Figura 23. Muestra los lugares positivos para <i>Acanthamoeba</i>51	
Figura 24. Valores de temperatura de las muestras de agua.....53	

Figura 25. Valores de cloro libre residual de las muestras.....	54
de agua	
Figura 26. Valores de pH de las muestras de agua.....	54
de grifo y cisterna	
Figura 27. Valores de conductividad registrados de las.....	55
muestras de agua proveniente del grifo y cisterna	

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 1. Comparación en la clasificación de <i>Acanthamoeba</i>	8
realizados por Adl y col. en los años 2005 y 2012	
Cuadro 2. Clasificación morfológica del género <i>Acanthamoeba</i>	11
Cuadro 3. Especies de <i>Acanthamoeba</i> y los genotipos asociados.....	14
a la queratitis amebiana y encefalitis amebiana granulomatosa	
Cuadro 4. Riqueza específica de AVL aisladas de agua.....	37
proveniente del grifo y cisterna de la ZMVM	
Cuadro 5. Delegaciones y municipios cuya muestras.....	50
fueron positivas para <i>Acanthamoeba</i>	
Cuadro 6. Registro de especies identificadas en el presente estudio.....	71

I. RESUMEN

México actualmente tiene dos problemáticas respecto a sus reservas de agua potable, una de ellas es su ineficiente suministro, así como la mala calidad microbiológica del agua, permitiendo con esto la proliferación de microorganismos patógenos incluyendo algunas especies patógenas de amebas de vida libre (AVL). *Acanthamoeba*, es una AVL frecuentemente aislada del ambiente, así como de suministros de agua potable, aire y suelo. Además, es un parásito oportunista que provoca diversas patologías, tales como: la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), acantamebiosis cutánea (AC) y queratitis amebiana (QA).

En el presente estudio se obtuvieron 85 muestras, de las cuales se aislaron e identificaron 205 aislados amebianos, pertenecientes a 13 géneros: *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Platyamoeba*, *Rhizamoeba*, *Rosculus*, *Sappinia*, *Stachyamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella*, *Vexillifera* y *Willaertia*.

Acanthamoeba fue el género registrado con mayor frecuencia en las muestras, con un porcentaje del 41.46 %. Las especies aisladas fueron: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *Acanthamoeba* sp. y *A. triangularis*.

Mediante análisis estadísticos se confirmó que los parámetros físico-químicos medidos al agua no tienen relación con la presencia de *Acanthamoeba* en las muestras.

En conclusión, la presencia de *Acanthamoeba* es una señal de alerta sobre la mala calidad del agua potable de la Zona Metropolitana del Valle de México, ya que este organismo representa un riesgo potencial de adquirir enfermedades asociadas a este género, así como la capacidad que tienen otros organismos patógenos de usar estas amebas como medio de protección, dispersión y potencialización de su patogenicidad. Cabe mencionar que es grave que las normas de calidad de agua potable no contemplen a este organismo como no permitido, ya que esto trae como consecuencia un contacto directo que podría convertirse en un problema de salud pública importante.

II. INTRODUCCIÓN

1. Amebas de Vida Libre (AVL)

El término ameba deriva del griego *amoibe*, que significa “cambio”, refiriéndose al constante cambio de forma que presentan estos organismos (García *et al.*, 2011). Las amebas más “sencillas” morfológicamente hablando, son las llamadas Gimnamebas o “amebas desnudas”, las cuales se consideran generalmente como un solo "grupo funcional", a pesar del hecho de que son muy diversas y sistemáticamente heterogéneas (Smirnov y Brown, 2004).

1.1 Características generales de las AVL

Estos organismos son unicelulares, su cuerpo está rodeado por una membrana plasmática, la cual puede estar recubierta por una capa pegajosa de mucopolisacáridos llamada glicocáliz (Brusca y Brusca, 2002). Los orgánulos celulares pueden distinguirse en el citoplasma como en aquellas células de animales pluricelulares. En las áreas periféricas y centrales del citoplasma se observa el hialinoplasma y el granuloplasma. El granuloplasma tiene una apariencia más granular y es usualmente más rígido, este se encuentra en estado coloidal y aquí se localizan el núcleo, cristales y los orgánulos citoplasmáticos. El hialinoplasma parece más transparente (hialino) y a diferencia del granuloplasma, es más fluido (Hickman *et al.*, 2001; Smirnov y Brown, 2004).

La locomoción de las amebas se lleva a cabo mediante proyecciones del citoplasma llamadas “pseudópodos” o pies falsos, los cuales participan en el movimiento e incluyen tanto al granuloplasma y el hialoplasma. Además, la mayoría de las amebas pueden formar sub-pseudópodos, los cuales son pequeñas proyecciones hialinas de diferentes formas los cuales no forman parte de la locomoción, tal es el caso de los organismos pertenecientes al género

Acanthamoeba, los cuales forman sub-pseudópodos filamentosos llamados acantópodos (Hickman *et al.*, 2001; Smirnov y Brown, 2004). El extremo posterior de algunas amebas se llama uroide, el cual tiene una forma característica entre cada especie de ameba.

Los pseudópodos también intervienen en el proceso de alimentación de las amebas, es decir, mediante el proceso de la fagocitosis. En este proceso los pseudópodos fluyen rápidamente hacia el alimento, lo rodean y así se forma una vacuola alimenticia. Posteriormente el citoplasma circundante de la ameba secretará enzimas para degradar el alimento y posteriormente serán absorbidas por el citoplasma, los restos no digeridos serán dejados atrás mientras la ameba avanza (Figura 1). La membrana celular de la ameba es parcialmente permeable, el exceso de agua es colectado en una vacuola esférica que aumenta de volumen gradualmente y posteriormente se contrae haciendo que el agua acumulada sea expulsada hacia el exterior (Mackean, 2004).

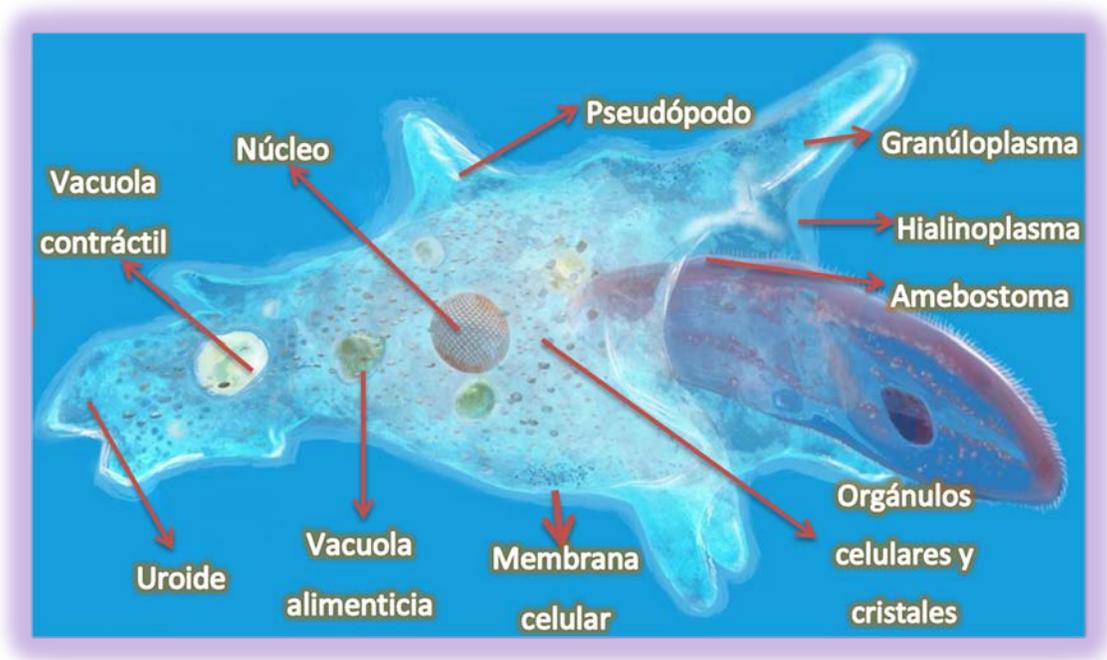


Figura 1. Esquema general donde se muestran los componentes morfológicos generales de una gimnameba.

Debido a la exposición continua de las amebas a los constantes cambios en el ambiente, estas poseen un estadio de resistencia o latencia llamada quiste. El quiste es una estructura generalmente redonda u ovalada, la cual está compuesta de dos capas: el endoquiste y exoquiste. Los quistes están metabólicamente inactivos y pueden permanecer viables por más de 20 años bajo condiciones de deshidratación y 24 años en agua a 4°C (Coulon *et al.*, 2010) (Figura 2).

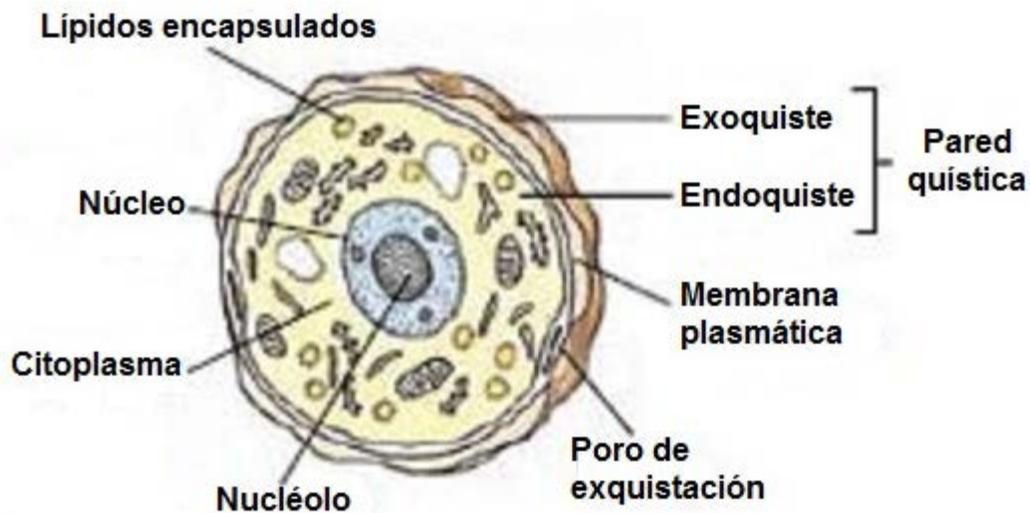


Figura 2. Esquema general donde se muestran los componentes morfológicos de un quiste de una gimnameba. Tomado de Biocyclopedia, 2012.

1.2 Ecología de las AVL

En la naturaleza, las gimnamebas se encuentran como amebas de vida libre (AVL). El término AVL no se refiere a una categoría taxonómica, sino que está relacionado a un grupo heterogéneo de organismos que viven en los mismos biotopos, pero estos han sido seleccionados en base a su parecido morfológico y etiológico, en lugar de su relación filogenética (Winięcka-Krusnell y Linder, 2001). Tienen una distribución cosmopolita en la naturaleza y son habitantes normales de ecosistemas microbianos del agua y suelo; también se pueden encontrar en forma quística en el aire, vehículo que emplean como medio de dispersión (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Peralta y Ayala, 2009; Thomas *et al.*, 2009).

Las AVL viven en las interfaces: agua-suelo, agua-animal, agua-planta, agua-aire, etc., donde pueden alimentarse de bacterias, hongos, levaduras, algas y algunos protozoos, incluidas amebas (Rodríguez-Zaragoza, 1994). Debido a que las AVL están expuestas a constantes cambios en su ambiente, poseen por lo menos dos etapas de desarrollo: el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto, es la forma activa, en esta etapa la ameba se alimenta activamente de bacteria y detritus del ambiente y/o se reproduce por fisión binaria. El quiste, es la forma inactiva pero resistente, que desarrolla la ameba para protegerse de los cambios del medio en el que está expuesta, tales como un pH desfavorable, presión osmótica, desecación, falta de alimento, presencia de sustancias químicas (desinfectantes y antimicrobianos) y agentes físicos (calor, congelamiento y radiación ultravioleta). La ameba exquista cuando las condiciones del medio comienzan a ser favorables (Greub y Raoult, 2004; Schuster y Visvesvara, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007).

1.3 Principales grupos de AVL

Las AVL pueden dividirse en dos grupos principales: Tecamebas o amebas tecadas y Gimnamebas o amebas desnudas. En el grupo de las gimnamebas existe un conjunto pequeño de amebas anfizóicas, es decir, organismos capaces de vivir en el medio ambiente y actuar como parásitos oportunistas en animales y en el hombre (Rodríguez-Zaragoza, 1994; Winiecka-Krusnell y Linder, 2001; Galarza *et al.*, 2006). Estas últimas, producen enfermedades de curso diverso; desde cuadros agudos y fatales con componentes de predominio necrótico a enfermedades crónicas con reacción inflamatoria granulomatosa (Peralta y Ayala, 2009; Thomas *et al.*, 2009; Uribarren, 2011; Hall, 2012; Castrillón y Orozco, 2013).

De las numerosas especies de AVL descritas, solo cuatro géneros con sus respectivas especies son consideradas patógenas para el hombre: *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea*, *Naegleria fowleri* y el género *Acanthamoeba* con 11 especies: *Acanthamoeba astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lenticulata*, *A. lugdunensis*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*,

A. rhyodes y *A. triangularis* (Xuan *et al.*, 2008; Ledee *et al.*, 2009; Crum-Cianflone, 2011; Uribarren, 2011).

De los géneros de AVL mencionados, *Acanthamoeba* ha sido el más estudiado en los últimos años debido a su abundancia y a la importancia médica que ha adquirido con el paso del tiempo, debido a que es el agente causal en humanos de la queratitis amebiana (QA), encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) y acantamebiosis cutánea (AC) (Booton *et al.*, 2004; Bonilla-Lemus *et al.*, 2007; Siddiqui y Khan, 2012).

2. Ubicación Taxonómica de *Acanthamoeba*

La clasificación de los protozoos y de otros microorganismos por encima del nivel de organización de las bacterias siempre ha sido dependiente de la microscopía, porque el tamaño del organismo involucrado, generalmente va desde sólo un micrómetro a uno o dos milímetros de longitud. Las estructuras de estas especies son útiles en los estudios comparativos de su morfología y por tanto de su taxonomía y sistemática. Las propiedades fisiológicas de los protozoos también han desempeñado un papel importante en la clasificación de estos microorganismos eucariotas. Gracias a la creciente importancia en la utilización de métodos moleculares, ha sido posible lograr grandes hallazgos que han permitido conocer más sobre estos organismos, como su sistemática, taxonomía y las interrelaciones evolutivas de los principales grupos de protozoos (Aladro, 2006).

Durante muchas décadas, comenzando con las publicaciones de Otto Bütschli (1880-1889), donde se estableció por primera vez la base de la clasificación sistemática de los protozoos, agrupándose en cuatro categorías (Figura 3):



Figura 3. Clasificación propuesta por Otto Bütschli (Adl *et al.*, 2005).

Un siglo después, la Sociedad de Protozoología propuso una nueva clasificación, basada en los avances en biología molecular. Posteriormente Simpson y Roger en los años del 2002-2004, propusieron otra clasificación, la cual fue más aceptada en su tiempo. De esta forma, las amebas quedaron agrupadas en dos de las seis categorías (Amebozoa y Rhizaria) (Adl *et al.*, 2005).

En 2005, Adl y col. propusieron una nueva clasificación basados en un sistema jerárquico carente de rangos como “clase”, “sub-clase”, “súper orden” u “orden”. En el 2012, se realizó una revisión de la clasificación propuesta por Adl y col. en el 2005, en la cual se realizaron diversos cambios, tales como la eliminación de algunos grupos polifiléticos. De esta forma, los cambios en la clasificación de *Acanthamoeba* pueden verse resumidos en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Comparación en la clasificación de *Acanthamoeba* realizados por Adl y col. en los años 2005 y 2012.

Adl et al., 2005	Adl et al., 2012
<p>Supergrupo: Amoebozoa Lühe, 1913, emend. Cavalier Smith, 1998</p> <p>Primer rango: Acanthamoebidae Sawyer y Griffin, 1975 (<i>Acanthamoeba</i>).</p>	<p>Clado: Amorphea</p> <p>Supergrupo: Amoebozoa Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998</p> <p>Primer rango: Discosea Cavalier-Smith et al., 2004</p> <p>Segundo rango: Longamoebia Cavalier-Smith y Smirnov en Smirnov et al., 2011.</p> <p>Tercer rango: Centramoebida Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004 (<i>Acanthamoeba</i>)</p>

2.1 Morfología y ciclo de vida de *Acanthamoeba*

Los organismos del género *Acanthamoeba*, al igual que la mayoría de las AVL, presenta dos estadios durante su ciclo de vida: la forma vegetativa llamada trofozoíto y la forma de resistencia llamada quiste (Khan, 2009).

2.1.1 Trofozoíto

El trofozoíto de *Acanthamoeba* exhibe en su superficie sub-pseudópodos en forma de espina, llamados acantópodos. Los acantópodos son más o menos importantes en la adhesión a las superficies (biológicas o inertes), mecanismo el cual está

asociado a su patogenicidad. Estos acantópodos son estructuras cito-esqueléticas que sobresalen desde la parte principal del cuerpo de la ameba la cual posee citoplasma hialino. Cuando estos acantópodos se forman, excluyen varias vacuolas y partículas que normalmente están presentes en el interior de la célula. *Acanthamoeba* tiene movimientos lentos y multidireccionales, su diámetro oscila entre 15 y 50 μm . Es uninucleada, este núcleo es aproximadamente la sexta parte del tamaño del cuerpo del trofozoíto, es céntrico y con un nucléolo denso. El citoplasma es finamente granular y contiene numerosas mitocondrias, ribosomas, vacuolas alimenticias y una vacuola contráctil (Figura 4) (Crum-Cianflone, 2011).

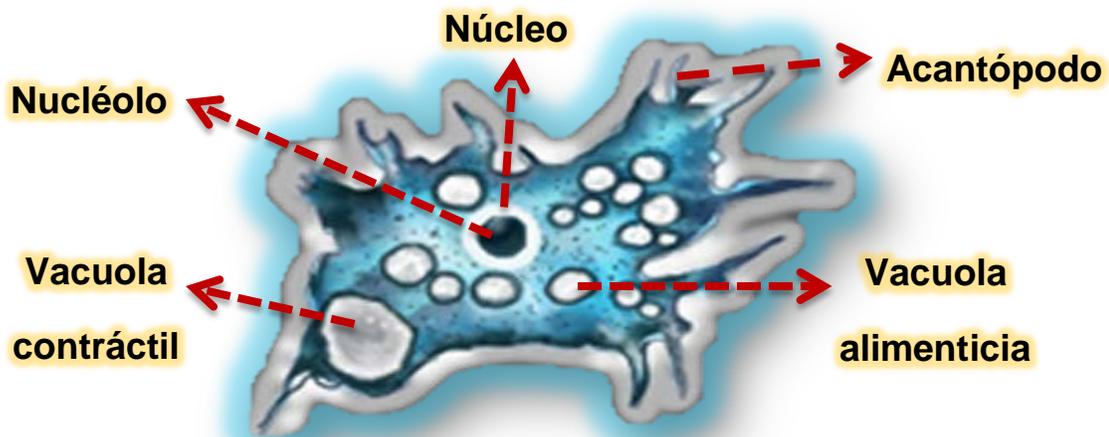


Figura 4. Esquema del trofozoíto de *Acanthamoeba* donde se muestran algunos de sus componentes estructurales.

2.1.2 Quiste

Cuando las condiciones ambientales no son favorables para la ameba, entra al proceso de enquistamiento, es decir, de la formación del quiste. A diferencia del trofozoíto, el quiste presenta una considerable variación morfológica entre las diferentes especies de *Acanthamoeba* y esta variación permite su identificación taxonómica. El quiste maduro presenta una doble pared, lo que le confiere resistencia en el ambiente. Este quiste se compone de dos partes: ectoquiste y el endoquiste. El ectoquiste posee una forma irregular que contiene proteínas y lípidos, por su parte, el endoquiste está compuesto principalmente de celulosa y

puede presentarse en forma esférica, hexagonal o poligonal, además presentan poros u ostiolas, los cuales son conexiones cóncavo-convexas que unen el endoquiste con el ectoquiste y es por donde la ameba exquista. El diámetro de los quistes oscila entre los 10 y 25 μm (Figura 5) (Visvesvara *et al.*, 2007; Khan, 2009; Gertiser *et al.*, 2010; Castrillón y Orozco, 2013).

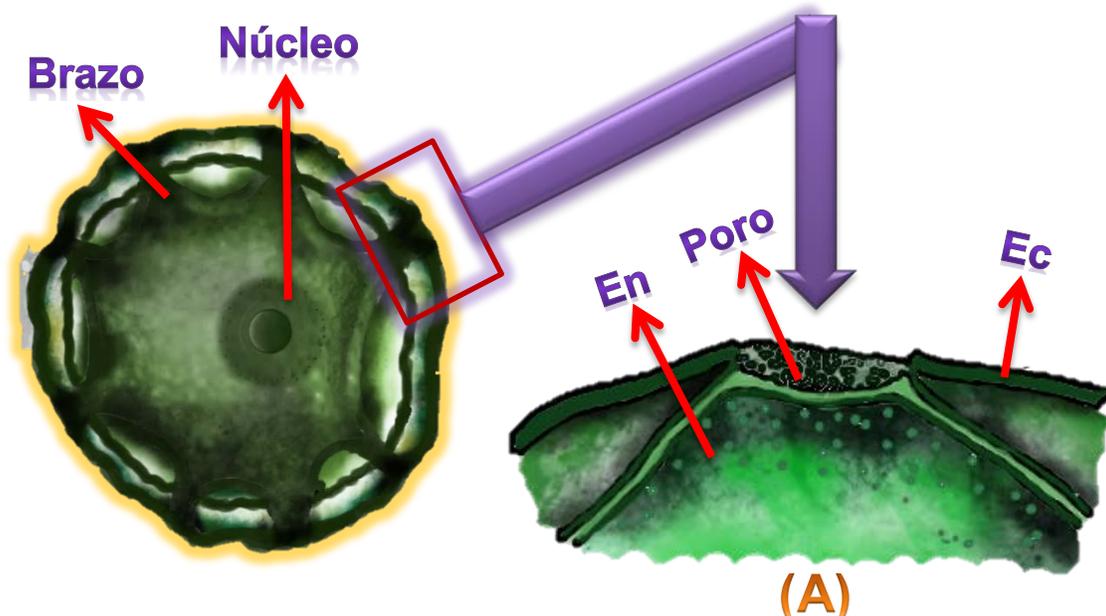
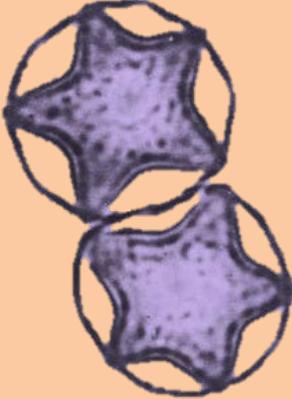
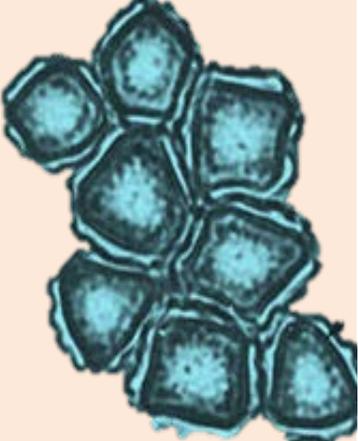


Figura 5. Esquema del quiste de *Acanthamoeba*. (A) Ampliación de un brazo del quiste, donde se puede observar el endoquiste (En) y el ectoquiste (Ec), así como el poro de exquistación

2.2 Clasificación morfológica.

En base a su morfología quística, las especies de *Acanthamoeba* han sido clasificadas en tres grupos principales (I-III). Esta clasificación fue propuesta por Pussard y Pons en 1977 y está basada en el diámetro del quiste, así como en la forma del exoquiste y del endoquiste (Cuadro 2) (Khan, 2006).

Cuadro 2. Ubicación del los quistes de las especies del género *Acanthamoeba*, de acuerdo a las características morfológicas propuestas por Pussard y Pons en 1977 con sus respectivas especies (Visvesvara, 1991; Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Nagyová *et al.*, 2010).

Grupo	Morfología	Estructura del quiste	Especies de <i>Acanthamoeba</i>
I	<p>Los quistes de estas amebas son grandes, con un diámetro de 18µm ó más; el ectoquiste y el endoquiste están muy separados entre sí. El ectoquiste puede ser liso o arrugado, el endoquiste es más o menos estrellado, además el endoquiste se conecta con el ectoquiste en el extremo de los brazos y el opérculo esta normalmente a nivel del ectoquiste.</p>		<ul style="list-style-type: none"> • <i>A. astronyxis</i> • <i>A. comandoni</i> • <i>A. echinulata</i> • <i>A. pearcei</i> • <i>A. tubiashi</i>
II	<p>Las amebas del grupo son las más comunes en la naturaleza. Este grupo también es el más grande e incluye a la mayoría de las especies potencialmente patógenas. Su diámetro de quiste es 18 µm o menos; el ectoquiste y el endoquiste pueden estar cerca entre sí o un poco separados el uno del otro. El endoquiste es de forma estrellada, poligonal, triangular, o algunas veces redondo, globular u ovoide y usualmente sus brazos no están bien desarrollados, mientras que el ectoquiste puede ser grueso o delgado y por lo general es ondulado. Tolerancia de temperatura <40 °C.</p>		<ul style="list-style-type: none"> • <i>A. castellanii</i> • <i>A. griffini</i> • <i>A. hatchetti</i> • <i>A. lugdunensis</i> • <i>A. polyphaga</i> • <i>A. quina</i> • <i>A. rhyodes</i> • <i>A. stevensoni</i> • <i>A. triangularis</i>

III

Los quistes de estas amebas miden menos de 18µm, el endoquiste es ovoide o globular, pero puede tener de 3 a 5 esquinas suaves y es muy difícil identificar las especies de este grupo y el ectoquiste es ondulado o liso. Tolerancia de temperatura >40 °C.



- *A. culbertsoni*
- *A. healyi*
- *A. jacobsi*
- *A. lenticulata*
- *A. palestinensis*
- *A. pustulosa*
- *A. royreba*

A pesar de que las características morfológicas han sido útiles para la identificación de las diferentes especies, hoy en día la clasificación morfológica es un poco ambigua y a menudo problemática. Se ha observado que dependiendo de las condiciones del cultivo, la morfología de los quistes puede variar, originando con esto, una incorrecta determinación taxonómica (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Nagyová *et al.*, 2010).

2.3 Clasificación Molecular

Debido a que la identificación morfológica es subjetiva y poco certera, se han diseñado métodos más confiables para la correcta identificación de los organismos pertenecientes a las especies de *Acanthamoeba* tales como: técnicas inmunológicas, bioquímicas y fisiológicas, que incluyen el Western Blot, Rapd e inmunofluorescencia, sin embargo, no han sido concluyentes para distinguir entre las especies de *Acanthamoeba* (Ortega-Rivas, 2002).

Una de las técnicas más utilizadas actualmente es la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Es una herramienta relativamente simple y de bajo costo, la cual permite amplificar un segmento de ADN, a partir de secuencias cortas (alrededor

de 20 nucleótidos) iniciadoras del segmento deseado, así como la presencia de nucleótidos y de la Taq polimerasa. Esta técnica consiste en tres etapas:

1) Desnaturalización del ADN; 2) alineación de los iniciadores al segmento de ADN problema y 3) síntesis del fragmento elegido. Esta técnica es muy útil, ya que permite identificar AVL en muestras ambientales así como de muestras biológicas, tales como tejidos provenientes de córnea, cerebro, piel y líquido cefalorraquídeo (Calderón, 2004).

De esta forma utilizando los productos de la PCR, se puede realizar la genotipificación de los organismos. Estos datos son muy útiles para el estudio taxonómico y de las relaciones epidemiológicas, permitiendo así las correlaciones entre los aislamientos infecciosos y los fenotipos de las enfermedades, tales como factores de virulencia y susceptibilidad a los antibióticos (Ledee *et al.*, 2009).

Gast y col. en 1996, así como Stothard y col. en 1998, propusieron clasificar a los aislados de *Acanthamoeba* en base al ADN de la sub-unidad pequeña 18S del del RNAr, cuyo tamaño va de 2300 a 2700 pb (Zhang *et al.*, 2004; Corsaro y Venditti, 2010). En este análisis se utilizan los genes de la pequeña sub-unidad (SSU) del RNAr nuclear y mitocondrial, y de esta forma se puede apoyar la estructura morfológica del grupo (Caumo y Rott, 2011).

Así, actualmente se han identificado por lo menos 17 diferentes genotipos (Cuadro 3) (T1-T17) (Kao *et al.*, 2011; Magnet *et al.*, 2012). Cada genotipo exhibe el 5% o más de divergencia en las secuencia entre los diferentes genotipos (Siddiqui y Khan, 2012) (Cuadro 3). De estos 17 diferentes genotipos, se ha mostrado que el 90 % de los aislados de *Acanthamoeba* que producen infecciones pertenecen al genotipo T4, sugiriendo que la abundancia de los aislados de T4 en infecciones humanas está asociada a su virulencia y/o propiedades que potencializan su transmisión (Marciano-Cabral *et al.*, 2000).

Cuadro 3. Especies de *Acanthamoeba* y los genotipos asociados a la Queratitis Amebiana y Encefalitis Amebiana Granulomatosa (Maghsood, 2005; Schroeder *et al.*, 2011; Durham, 2012; Siddiqui y Khan, 2012).

Genotipo	Especies de <i>Acanthamoeba</i>	Patologías asociadas
T1	<i>A. castellanii</i>	Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG)
^T2a ^T2b – ccap150173c-alike	<i>A. palestinensis</i>	Queratitis amebiana (QA) y (EAG)
T3	<i>A. griffini</i>	QA
T4*	<i>A. castellanii</i> <i>A. lugdunensis</i> <i>A. mauritaniensis</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. rhyssodes</i> <i>A. royreba</i> <i>A. triangularis</i>	QA y EAG
T5	<i>A. lenticulata</i>	QA y EAG
T6	<i>A. palestinensis</i>	QA
T7	<i>A. astronyxis</i>	SA★
T8	<i>A. tubiashi</i>	SA★
T9	<i>A. comandoni</i>	SA★
T10	<i>A. culbertsoni</i>	QA y EAG
T11	<i>A. hatchetti</i> <i>A. stevensoni</i>	QA
T12	<i>A. healyi</i>	EAG
T13	<i>A. spp.</i>	SA★
T14	<i>A. spp.</i>	SA★
T15	<i>A. jacobsi</i>	QA
T16	<i>A. spp.</i>	SA★
T17	<i>A. spp.</i>	SA★

* Genotipo asociado con ambas enfermedades.

La base en la división del T2 en T2a y T2b ha sido propuesta por Maghssod y col. en 2005.

SA★- No se ha encontrado todavía asociación con alguna patología.

3. Importancia Médica

El primer reporte que indica que el género *Acanthamoeba* podría causar enfermedad en el hombre data de 1958 y correspondió a una prueba de calidad de la vacuna contra la poliomielitis en cultivos celulares, en la que aparecieron placas que se pensó, inicialmente, podrían haber sido contaminadas por el virus de la polio, porque ratones y monos posterior a la inoculación con fluidos provenientes de los cultivos, murieron a causa de una meningoencefalitis. Sin embargo, se encontró que las placas habían sido contaminadas por amebas cuyos trofozoítos y quistes fueron identificados como pertenecientes al género *Acanthamoeba* (Jercic, 2007).

Culbertson (1971) más tarde confirmó que, cuando se inoculaba *Acanthamoeba* en ratones o en monos, la ameba mataba a los animales. El primer caso de meningoencefalitis amebiana fue descrito por Jager y Stamm en 1972 (Schuster y Visvesvara, 2004). En individuos sanos, *Acanthamoeba* puede causar infecciones en el sistema nervioso central, así como queratitis amebiana (Di Cave *et al.*, 2009). En individuos con inmunodeficiencia, puede causar infecciones en los pulmones, hígado, piel, así como infecciones diseminadas por todo el cuerpo las cuales son fulminantes (Visvesvara *et al.*, 2007; Leiva *et al.*, 2008). Las principales patologías producidas por *Acanthamoeba* son la queratitis amebiana (QA), la encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) y la acantamebiosis cutánea (AC) las cuales se explicarán a continuación:

3. 1. Queratitis amebiana (QA)

El primer descubrimiento de la queratitis producida por *Acanthamoeba* fue hecho por Nagington y col. en 1973 en el Reino Unido, desde entonces, la queratitis amebiana ha sido reconocida como una infección microbiana importante. Un factor de predisposición es el uso de lentes de contacto, lesiones corneales expuestas al polvo o al agua templada (de una bañera o piscina), aunque los mecanismos precisos asociados con este proceso no son todavía claramente entendidos (Figura 6) (Booton *et al.*, 2005; Khan, 2006; Gianinazzi *et al.*, 2009; Bonilla-Lemus *et al.*, 2010).

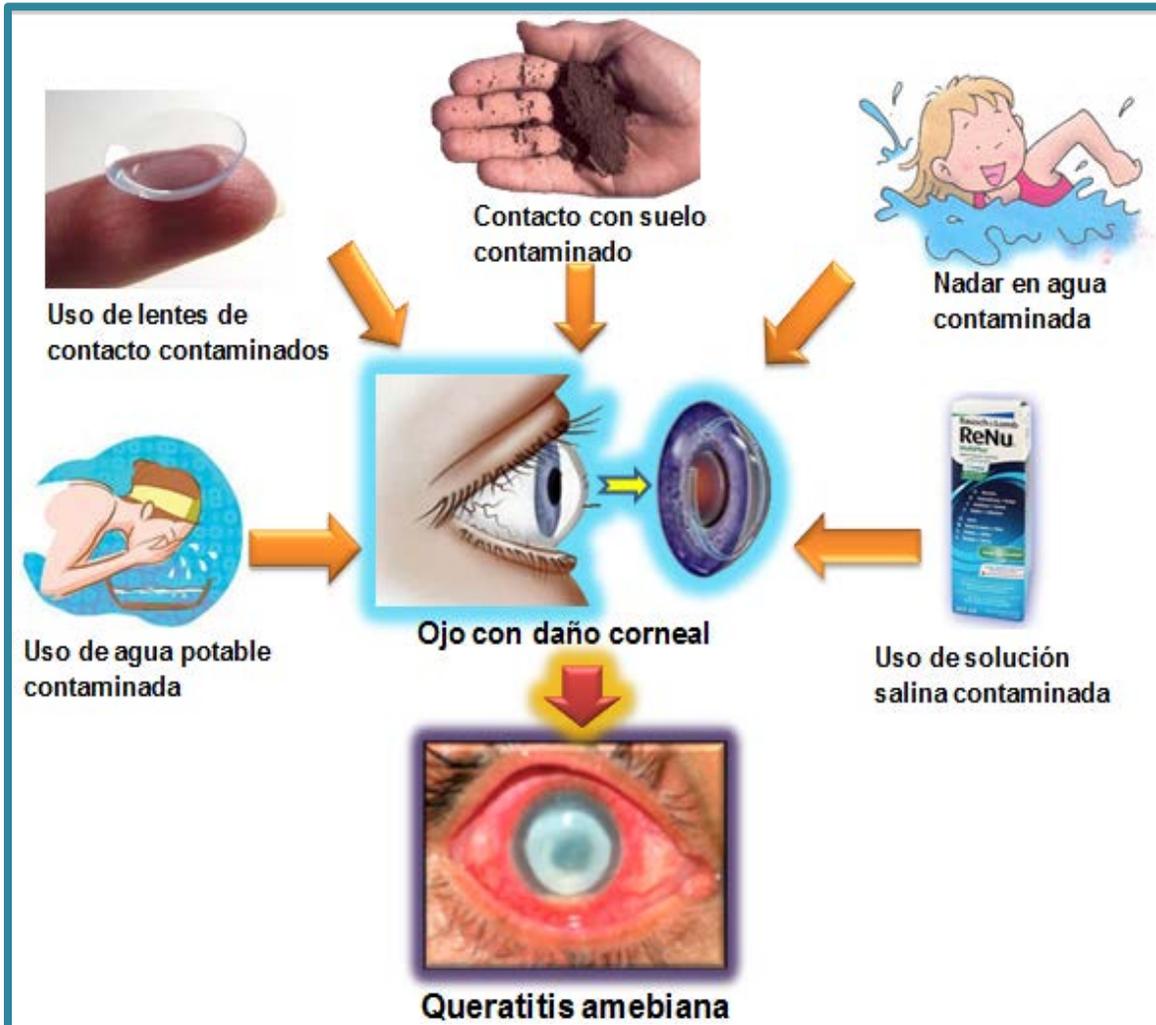


Figura 6. Principales factores relacionados con la queratitis amebiana (QA).

La queratitis amebiana se caracteriza por la inflamación de la córnea, severo dolor ocular y fotofobia, un anillo estromal infiltrado, desglose epitelial recurrente y una lesión corneal refractante (Figura 6) (Visvesvara *et al.*, 2007).

3. 2. Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG)

La EAG puede adquirirse principalmente por medio de lesiones en la piel (vía hematógica), así como por la inhalación directa de polvo o agua contaminada con quistes o trofozoítos de *Acanthamoeba* que pueden llegar a los pulmones o bien, penetrar directamente en el neuroepitelio olfativo y de esta forma llegar al sistema nervioso central (SNC). La EAG está generalmente asociada a individuos con alguna enfermedad que afecte su sistema inmune, tales como: lupus eritematoso sistémico, diabetes, falla renal, cirrosis, tuberculosis, úlceras de piel, así como VIH positivo (Marciano-Cabral y Cabral, 2003) (Figura 7).

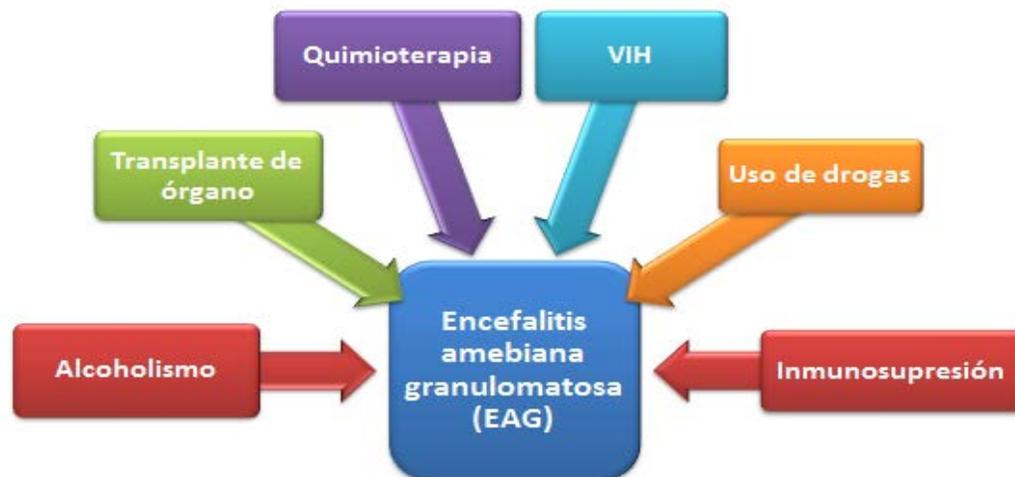


Figura 7. Factores relacionados con la encefalitis amebiana granulomatosa.

Los síntomas de la EAG incluyen dolor de cabeza, confusión, náusea, vómito, fiebre, letargo, cuello rígido, déficits neurológicos focales, parálisis facial, así como incremento en la presión intracraneal (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Uribarren, 2011; Visvesvara *et al.*, 2007).

3. 3. Acantamebiosis cutánea (AC)

La acantamebiosis cutánea es la infección más común en pacientes con VIH, aunque también ha sido documentada en pacientes sin VIH. Además también se presenta en personas con encefalitis amebiana, pacientes bajo terapia inmunosupresiva, con transplante de órgano o en individuos con enfermedades inmunológicas (Figura 8). Este padecimiento se caracteriza por la presencia de nódulos eritematosos duros o úlceras en la piel. Las manifestaciones tempranas de acantamebiosis cutánea incluyen la presencia de pápulo-nódulos que drenan material purulento y luego se convierten en úlceras que no sanan (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

De esta forma, estas lesiones proveen una ruta de entrada al torrente sanguíneo, seguido por una diseminación hematogena a diferentes tejidos, el cual puede traer consigo fatales consecuencias (Khan, 2006).

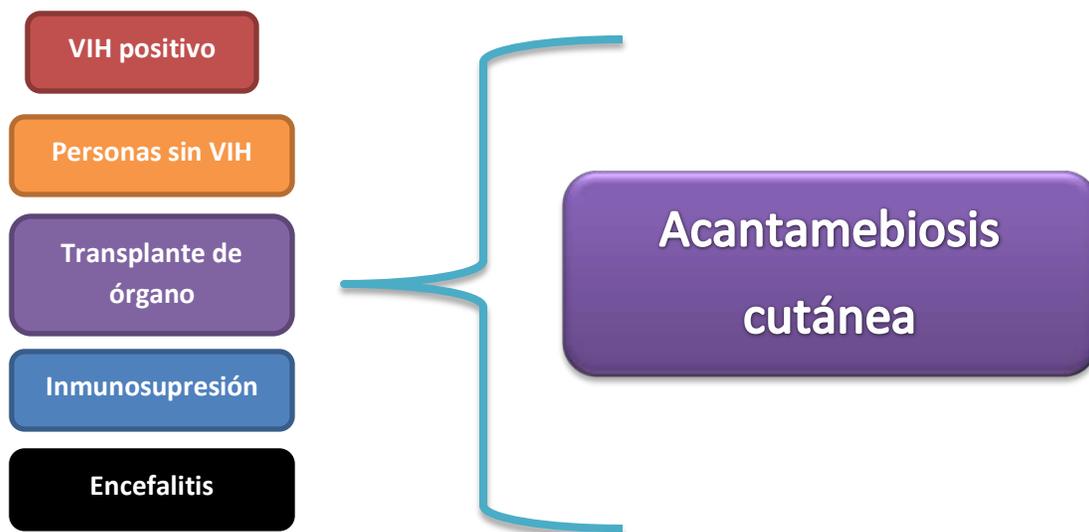


Figura 8. Factores relacionados con la acantamebiosis cutánea.

4. Factores de Patogenicidad

Gran parte de los daños causados por los trofozoítos de *Acanthamoeba* en el curso de infecciones corneales o cerebrales, son el resultado de varios mecanismos patogénicos diferentes (Figura 9).

Estos mecanismos contribuyen directa o indirectamente en la invasión al hospedero.



Figura 9. Factores que contribuyen a la virulencia de *Acanthamoeba* (Khan, 2004).

4.1 Endosimbiontes

La mayoría de los endosimbiontes de *Acanthamoeba* pueden incluir virus, levaduras, protistas y bacterias, algunos de estos endosimbiontes pueden ser potencialmente patógenos para lo humanos. *Acanthamoeba* es conocida por albergar al virus mas grande conocido, Mimivirus, ademas de otros virus (adenovirus, virus de la polio , virus ECHO , enterovirus o virus de la estomatitis vesicular), levaduras (*Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Sporothrix schenckii*, *Histoplasma capsulatum*, *Streptomyces californicus* y *Exophiala dermatitidis*), protistas (*Cryptosporidium* y *Toxoplasma gondii*) y bacterias (*Rickettsia* spp., *Escherichia coli* O157, *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomona aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium avium*). Estos endosimbiontes son resistentes a la fagocitosis, es decir, tienen la capacidad de sobrevivir y reproducirse dentro de la ameba, causar lisis y liberarse nuevamente al ambiente. Ademas, cuando el trofozoíto de *Acanthamoeba* pasa a la forma quística, los endosimbiontes que se encuentren en su interior se quedarán dentro de ella. De esta forma las amebas no solo les brindan a estos organismos un medio de dispersion, sino también un mecanismo de protección para invadir ambientes hostiles, asi como el de potencializar la patogenicidad de algunos endosimbiontes y hasta de la misma ameba (Greub y Raoult, 2004; Castro, 2012; Siddiqui y Khan, 2012; Goñi *et al.*, 2013).

5. Aspectos ecológicos

Como anteriormente se hizo referencia, *Acanthamoeba* tiene una distribución cosmopolita, incluyendo un amplio ámbito de nichos ecológicos, los cuales están cerca de los seres humanos (Bonilla *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que algunas AVL como *Acanthamoeba* pueden sobrevivir a los procesos de purificación del agua, debido a que los filtros usados en los primeros pasos para su desinfección propician un crecimiento de microorganismos, incluyendo a los protozoos. Los filtros de carbono activado usados en las últimas

etapas de purificación, también son colonizados por las AVL, y éstas a su vez pueden liberar bacterias. Aquí también se forman biopelículas flotantes las cuales son extremadamente resistentes a la desinfección con cloro (Thomas *et al.*, 2008). Además, la estructura compleja de la pared del quiste le confiere una gran resistencia a condiciones ambientales adversas, desinfectantes y al cloro (Thomas *et al.*, 2008). *Acanthamoeba* ha sido recuperada de varios sistemas de agua potable, proveniente de la llave, cisternas, piscinas, sistemas de enfriamiento y tuberías de hospitales (Kilvington *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2006; Garcia *et al.*, 2013).

6. Sistemas de distribución de agua potable

6.1 Panorama general del agua en México

El agua es un componente vital del ambiente, como también un valioso recurso natural para el hombre, ya que es el medio donde viven numerosas especies, forma parte de los ciclos de la naturaleza que sustentan tanto la vida como las características de los ecosistemas (incluyendo los originados por actividades humanas), y es también medio o insumo de distintas actividades económicas (Pérez, 2004).

Los recursos de agua dulce de México lo ubican como uno de los países con riqueza media en este recurso, los cuales se caracterizan por tener una disponibilidad anual per cápita de 500 a 10,000 m³, en el caso de México, esta es de 5,000 m³ aproximadamente. Las fuentes de agua dulce son tanto superficiales como subterráneas; en el primer caso se trata de cuerpos de agua como: lagos, lagunas, presas y ríos, en tanto que las fuentes de agua subterránea son mantos acuíferos constituidos por arena, grava o roca que contiene agua. Es importante señalar que existen interconexiones entre los cuerpos de agua superficiales y subterráneos, así como el hecho de que los cuerpos superficiales naturales integran cuencas hidrológicas, las cuales representan sistemas ecológicos en los que los escurrimientos principales están interconectados (vierten en lagos si la

cuenca es cerrada, o en el mar, si es abierta), lo cual es particularmente relevante para cualquier intento de uso racional de este recurso (SEMARNAT, 2000).

6.2 Aguas superficiales

México posee 314 cuencas hidrológicas en las cuales fluyen los numerosos arroyos del país. La Comisión Nacional del Agua (CNA), ha agrupado a tales cuencas en 37 regiones hidrológicas para hacer más eficaz la administración de los recursos hidráulicos, las que, a su vez, las agrupan 13 regiones mayores de tipo administrativo para facilitar la creación de organismos de cuenca como parte de sus esfuerzos de descentralización de funciones (SEMARNAT, 2000)

6. 2. 1 Región Hidrológica Administrativa XIII

La Región Hidrológico-Administrativa XIII tiene una superficie total de 16, 426 km², y está conformada por 100 municipios de tres Entidades Federativas (México, Hidalgo y Tlaxcala) y las 16 delegaciones políticas del Distrito Federal. Esta región es la más poblada de las 13 regiones hidrológico administrativas del país, la de menor extensión territorial y por lo tanto la de mayor densidad de población, a tal grado que este indicador equivale a casi 24 veces la densidad de población media nacional (SEMARNAT, 2009).

6. 2. 1. 1 Agua potable de la Zona Metropolitana de México

La extracción para Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) es de 2, 922 hm³ / año, lo que significa que se está rebasando la disponibilidad natural de la cuenca en un 173 %. Del total de agua extraída para la Ciudad de México, 67 % proviene de fuentes propias de la cuenca; otro 21 % se importa de los sistemas Cutzamala y Lerma, sólo el 13 % proviene de aguas de reuso (Ortega, 2011).

La cobertura de agua potable en la ZMVM fue del 96.8 % en el 2010, la cobertura de agua potable incluye a las personas que tienen agua entubada dentro de la vivienda, fuera de la vivienda y de la llave pública. Sin embargo, los habitantes con cobertura no necesariamente disponen de agua con calidad para consumo (CONAGUA, 2012).

6. 2. 1. 2. Calidad del agua potable de la Zona Metropolitana del Valle de México

La salud humana depende en gran medida de la calidad del agua que se consume, la presencia de ciertos elementos y compuestos químicos en el agua pueden generar una amplia gama de enfermedades que pueden ir desde infecciones intestinales, hasta la muerte, pasando por mutaciones genéticas y enfermedades crónico-degenerativas.

Para que el agua sea potable, debe de pasar por una serie de tratamientos, los cuales garantizan agua de calidad apta para consumo y/o uso. El tren de tratamiento al que se somete el agua en México es por demás sencillo y se realiza en cuatro pasos:

- 1) Floculación: Efectuada por la adición de sulfato de aluminio y potasio (alumbre)
- 2) Clarificación: Se deja sedimentar los flóculos obtenidos
- 3) Filtración en lecho de arena
- 4) Cloración

Cabe resaltar que el procedimiento de potabilización del agua en otros países es más completo si se compara con el que se realiza en México, ya que este se realiza en 12 pasos, los cuales incluyen procedimientos avanzados como el uso de ozonización, carbono activado y luz UV (Lenntech, 2014).

La problemática en cuanto a la calidad del agua va mas allá de la sencillez de su método de potabilización, sino que también incluye la normatividad que rige los parámetros que aseguran su potabilidad, es decir, la Norma Oficial Mexicana (NOM-127-SSA1-1994) la cual sólo contempla como organismo no permitido a *E. coli* u otros coliformes. En cambio la guía de calidad del agua potable de la OMS publicada en el 2006, menciona una amplia lista de organismos que representan un riesgo para la salud, entre los cuales se encuentra *Acanthamoeba* debido a su gran resistencia a altas concentraciones de cloro y a otros tipos de desinfección como el carbono activado. De esta forma se demuestra que la calidad del agua potable en México es de cuestionarse debido a que, tanto los procesos como las normas de regulación de la calida del agua son ineficientes para el control de organismos potencialmente patógenos (OMS, 2006).

III. ANTECEDENTES

Durante las dos últimas décadas, el estudio de AVL en especial las patógenas, ha comenzado a ser tema de interés debido a su importancia médica y ecológica. Ya que hoy en día son bien conocidas como patógenos causantes de infecciones serias y mortales y que además tienen un rol importante en los ecosistemas y actúan como reservorios de procariontes (Schuster y Visvesvara, 2004; Khan, 2006).

Sin embargo, las enfermedades producidas por amebas de vida libre solo se reconocen aparentemente, a partir de 1948, cuando se comunicó de un caso de un soldado japonés de 22 años, el cual fue capturado como prisionero de guerra en Nueva Guinea y falleció siete semanas más tarde con una infección amebiana diseminada. E. H. Derrick realizó la autopsia y atribuyó la causa de muerte a *Iodamoeba bütschlii*, agente que había sido considerado por algunos científicos como *Naegleria* y otros por una acantamebida (Khan, 2006).

El segundo caso de infección humana por AVL, del cual se tiene información, sucedió en 1960, en Tucson, Arizona. J. W. Kernoham y col. publicaron el caso de una niña de seis años de edad que falleció con una lesión cerebral, en forma inicial e inexactamente adjudicado a *I. bütschlii*, pero más tarde se probó que era debido a *Acanthamoeba* sp. (Oddo, 2006).

Una serie de antecedentes citados en una publicación de Nwachuku y Gerba en el 2004, señalan algunos estudios realizados en Egipto, Alemania, Inglaterra, China, etc., en los cuales se muestra la presencia de *Acanthamoeba* en agua potable de domicilios particulares y en hospitales, dando un panorama histórico-global de la presencia de *Acanthamoeba* en este recurso vital.

Dado su relevancia médica, se han realizado muchos estudios acerca de la presencia de *Acanthamoeba* en agua potable. Uno de ellos fue realizado por Boost y col. en el 2008, en donde analizaron agua potable de 100 domicilios de Hong Kong y el 10 % de las muestras fueron positivas para *Acanthamoeba*, la

mayoría de estas muestras positivas pertenecían a construcciones de más de 20 años.

Shoff y col. en el 2008, tomaron un total de 283 muestras de agua de la llave proveniente del sur de Florida, E.U. durante 2 años, de las cuales solo 55 fueron positivas para AVL. *Acanthamoeba* fue el tercer género más frecuentemente aislado en las muestras. Además realizaron pruebas de tolerancia de cloro, en la que 85 % de los aislados sobrevivieron a una dosis de 5mg/L de cloro.

Edawa y col. en el 2009, analizaron un total de 374 muestras de 113 puntos de muestreo, de las cuales 307 muestras provenían de plantas de tratamiento en Osaka, Japón, mientras que las otras 67 muestras provenían del río que alimenta la planta de tratamiento. En resumen, 257 muestras fueron positivas para AVL de las que se obtuvieron 800 aislados amebianos, de estos el 19 % correspondieron a *Acanthamoeba*.

Hoffman y Michel en el 2001, realizaron un estudio en una planta de tratamiento de agua en Alemania, cuyo objetivo principal era conocer la calidad de purificación del agua, en los que se mostró que durante el curso de la purificación, el número de amebas se redujo efectivamente, aunque un número reducido de amebas tales como *Acanthamoeba* persistió hasta la última etapa de tratamiento.

Jeong y Yu en el 2005, colectaron 207 muestras de agua potable y de plantas de tratamiento de agua en el área de Pusan, Corea del Sur. Obteniendo un total de 46.9 % de muestras positivas para AVL y de este total el 5.8 % correspondieron al género *Acanthamoeba*. Mostraron además que el nivel de calidad de purificación de la planta de tratamiento es muy buena, ya que no se encontró ninguna AVL después de pasar por la fase de carbón activado.

Lorenzo-Morales y col. en el 2005, determinaron la presencia de *Acanthamoeba* en agua potable en 59.5 % de las muestras, de este porcentaje se determinó que el 69 % de estos aislados mostraban osmotolerancia, termotolerancia y potencial patógeno.

En México se pueden citar los siguientes:

Rivera y col. en 1979, analizaron el agua de la llave de 25 domicilios localizados en el Distrito Federal, aislando *Acanthamoeba astronyxis* y *A. castellanii* principalmente. Además mencionan que el agua con mayor grado de contaminación biológica proviene del este y oeste del D. F. seguido por el norte, centro y sur.

Más recientemente Bonilla-Lemus y col. en 2010, tomaron 27 muestras de agua proveniente de la llave principal, cisterna, tanque cisterna y lavamanos. Sus resultados mostraron la presencia de *Acanthamoeba* en un 70.37 %, en la que la mayoría de los aislados provenían de las cisternas (48.89 %) seguido por los tanque cisterna (15.56 %), los lavamanos (15.6 %) y por último la entrada principal de agua (13.33 %). Los parámetros físico-químicos no mostraron correlación significativa, a excepción de la temperatura la cual obtuvo correlación negativa (-0.24) con respecto a los aislados.

IV. JUSTIFICACIÓN

Actualmente en México existen varias problemáticas respecto al agua potable, una de ellas es la mala calidad microbiológica, debido a que existen muchos factores que permiten la proliferación de microorganismos patógenos incluyendo a algunas especies patógenas de amebas de libre (AVL). *Acanthamoeba* se encuentra frecuentemente en el ambiente, así como en suministros de agua potable debido a que es resistente a los métodos de desinfección tales como la cloración. Además, es un parásito oportunista que provoca diversas patologías, tales como: la encefalitis amebiana granulomatosa, acantamebiosis cutánea y la queratitis amebiana.

En México, los casos de Encefalitis Amebiana Granulomatosa y Queratitis Amebiana ocasionados por las especies del género *Acanthamoeba* son casi desconocidos, esto puede deberse principalmente al desconocimiento que se tiene sobre estos padecimientos así como a un mal diagnóstico realizado al paciente, ya que en el caso de la encefalitis, el agente causal puede ser confundido con virus, bacterias, hongos o cisticercos.

Independientemente de la patogenicidad de algunas especies del género *Acanthamoeba*, estas amebas tienen la capacidad de albergar organismos patógenos intracelulares, los cuales pueden servir como vectores de enfermedades en los seres humanos. Se ha demostrado que el crecimiento intracelular dentro de las amebas aumenta la resistencia bacteriana a los antibióticos y biocidas, potencializando la virulencia de la bacteria y de la ameba. Tal es el caso de *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium avium* y *Helicobacter pylori*, por mencionar algunas. Por lo tanto, la presencia de organismos pertenecientes al género *Acanthamoeba* en las muestras de agua potable de la ZMVM serán indicadores de la calidad del agua y de esta forma se podrá advertir a los usuarios del riesgo de exposición a estas amebas potencialmente patógenas.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

- ❖ Aislar amebas del género *Acanthamoeba* de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM)

Objetivos particulares

- ❖ Aislar y cultivar las amebas del género *Acanthamoeba* provenientes de las muestras de agua potable de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM).
- ❖ Identificar taxonómicamente por criterios morfológicos las amebas aisladas del género *Acanthamoeba*
- ❖ Determinar la relación de los factores fisicoquímicos (temperatura, conductividad, pH y cloro libre residual) en la presencia de amebas del género *Acanthamoeba* en el agua potable de la ZMVM
- ❖ Señalar los sitios de la ZMVM positivos para *Acanthamoeba*
- ❖ Emitir recomendaciones preventivas para los habitantes de los sitios muestreados

VI. ÁREA DE ESTUDIO

Se seleccionaron al azar 45 lugares de muestreo, de los cuales 16 son delegaciones y 29 municipios de la ZMVM (Figura 10).

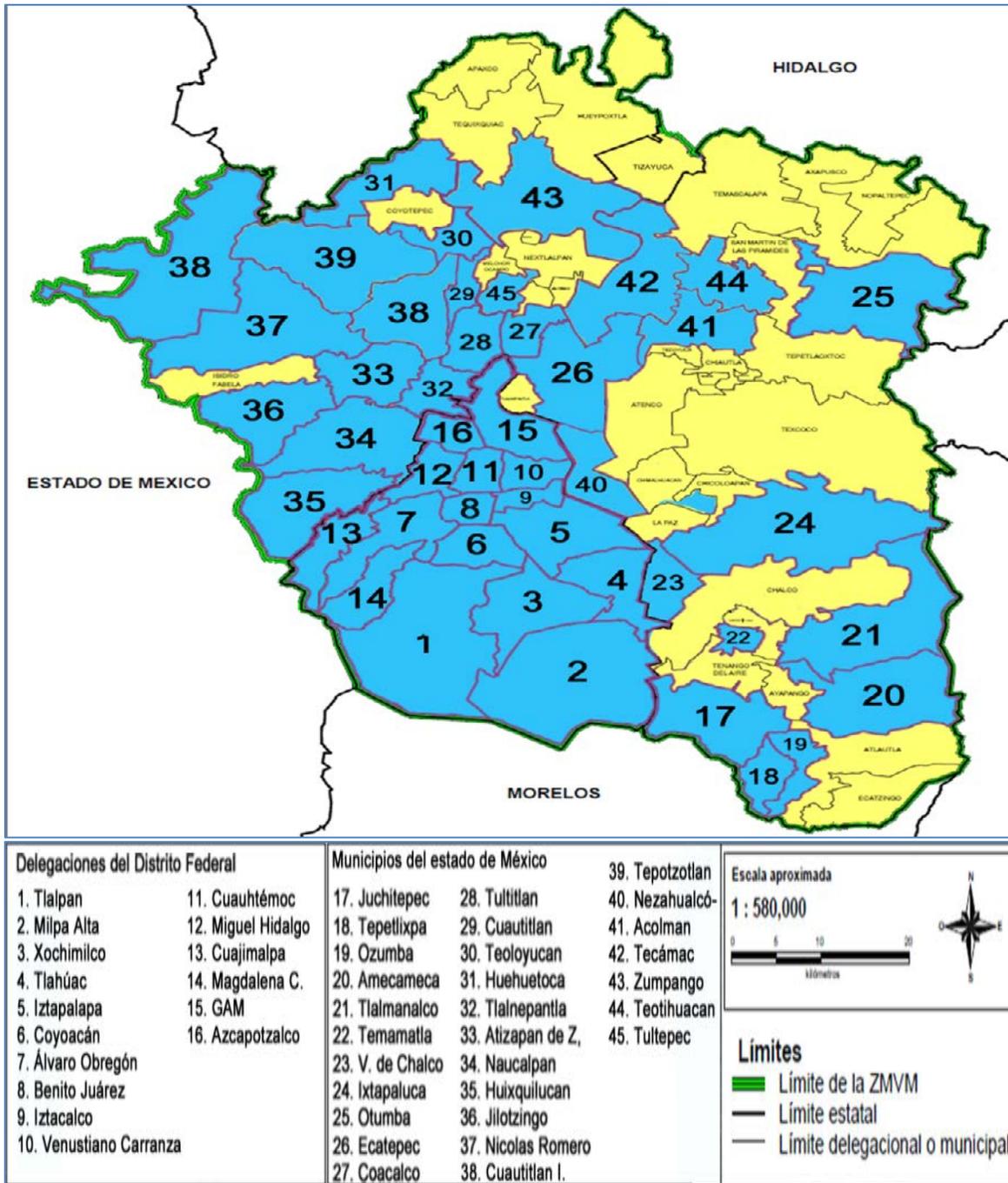


Figura 10. Mapa del la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM) donde se muestra los sitios de muestreo marcados con color azul, cuyos nombres están representados por un número.

La Zona Metropolitana del Valle de México se asienta sobre la planicie aluvial que dejaron los antiguos lagos de Texcoco, México, Chalco y Xochimilco en el interior de la Cuenca del Valle de México, la cual se encuentra en la región central del territorio nacional. Se ubica a los 19° 30' de Latitud Norte y 99° 02' de Longitud Oeste, su altitud promedio es de 2,240 msnm (SMA, 2005; PAOT, 2010).

Territorialmente la ZMVM estaba constituida en el año 2005 por las 16 delegaciones del Distrito Federal y 28 municipios metropolitanos del Estado de México. Actualmente está conformado por 60 municipios (59 del Estado de México y uno de Hidalgo) y las 16 Delegaciones del Distrito Federal (INE, 2011). El área Metropolitana del Valle de México colinda al norte con el Estado de Hidalgo, al oriente con los Estados de Puebla y Tlaxcala, al sur con el Estado de Morelos; entretanto, el occidente limita con la Cuenca del Pánuco (Figura 9). La ZMVM posee una extensión de 4,715.3 km² (3228.9 km² del Estado de México y 1486.4 km² del Distrito Federal). Del total de la superficie, el 65.5 % es de uso urbano (43 % del D. F. y 22.5 % del Estado de México) y el 34.5 % restante es zona rural con uso de suelo agrícola, pecuario, forestal y áreas de conservación (SMA, 2005).

Los principales ríos que recorren la ZMVM descienden de las sierras y constituyen la denominada Cuenca del Río Moctezuma que abarca toda el área metropolitana. En esta cuenca se localizan ríos tales como Tacubaya, Los Remedios, Mixcoac, Churubusco, Consulado, etc., estando los tres últimos entubados, así como los canales Chalco, Apatlaco y Cuemanco, entre otros. Cabe señalar que algunas corrientes y cuerpos de agua mencionados han sido confinados para el consumo local (SMA, 2005).

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1.-TRABAJO DE CAMPO

1.1 Recolecta y transporte de las muestras de agua

La toma de muestras de agua se realizó en tubos de polipropileno con rosca de volumen de 50 ml, previamente esterilizados. Se tomaron un total de 85 muestras domiciliarias al azar y sin repetición, provenientes de las 16 delegaciones y 29 municipios de la ZMVM. Las muestras fueron tomadas directamente del grifo y de la cisterna, en caso de que el domicilio muestreado contara con esta última. Posteriormente fueron transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) de la FES-Iztacala UNAM, para su posterior análisis.

1.2 Registro de parámetros físico-químicos de las muestras “*in situ*”

Se realizó la medición de los siguientes factores: temperatura del agua (°C), pH, conductividad (mS/cm³) y cloro libre residual (mg/L). Los parámetros de temperatura, pH y conductividad fueron medidos con un tester digital HANNA modelo HI 98129. El cloro libre residual se midió mediante el Kit colorimétrico HANNA modelo HI 3831F.

2.- TRABAJO DE LABORATORIO

2.1 Aislamiento y cultivo de amebas de vida libre

Las muestras de agua se procesaron acorde al método descrito por Smirnov y Brown (2004) para aislar AVL, se tomó un volumen de 40 ml de agua y se concentró por centrifugación a 10,000 Xg durante 10 minutos. Se desechó el

sobrenadante y la pastilla se sembró sobre placas con medio de agar no nutritivo (NNE) adicionada con una capa de *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor (65-70 °C durante 30 min). La capa bacteriana sirve de fuente proteica para que las amebas se desarrollen. Las placas sembradas se incubaron a 37 °C, en posición invertida, dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación.

Dependiendo del crecimiento amebiano posterior a la incubación, se realizaron observaciones a las placas con un microscopio invertido. Detectado el crecimiento de amebas en las placas, se marcó la zona de mayor abundancia y con un morfotipo similar, posteriormente se cortó un trozo de agar (aproximadamente de 5 mm²) en condiciones de esterilidad, para resembrar en una placa nueva (incubando a 37 °C).

2.2 Identificación morfológica de las amebas aisladas

Una vez detectado el crecimiento amebiano (trofozoítos y quistes) en las placas de NNE se prosiguió a su identificación morfológica. En condición estéril, se vertió 1mL de solución PBS sobre la placa y se realizó un barrido con un asa de vidrio, concentrando la suspensión acuosa con amebas, de esta forma se tomó una gota de esta suspensión y se colocó en un portaobjetos para su posterior observación en el microscopio invertido de contraste de fases a 10, 20 y 40x (Nikon Eclipse TS100). Para la identificación taxonómica se observaron las características tanto del trofozoíto como del quiste para compararlas con las características morfológicas que vienen en las claves taxonómicas de Page (1988). Se procedió a tomar un registro fotográfico con la cámara (Nikon coolpix 990).

3. Métodos estadísticos

Mediante el coeficiente de correlación de Pearson se determinó si existe relación entre los factores fisicoquímicos y la presencia de *Acanthamoeba* en las muestras (Bonilla-Lemus *et al.*, 2010)

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislados amebianos

El estudio fue realizado en el periodo de abril del 2012 a julio del 2013 obteniéndose un total de 85 muestras de agua potable de domicilios de la ZMVM, las cuales fueron obtenidas del grifo y de la cisterna. Cabe mencionar que no todos los domicilios muestreados contaban con cisterna, por lo que se obtuvieron 45 muestras provenientes del grifo, mientras que el número de muestras de cisterna fue de 40.

Del total de las 85 muestras recolectadas se obtuvieron 205 aislados amebianos, los cuales pertenecen a los siguientes 13 géneros: *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Platyamoeba*, *Rhizamoeba*, *Rosculus*, *Sappinia*, *Stachyamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella*, *Vexillifera* y *Willaertia* (Figura 11).

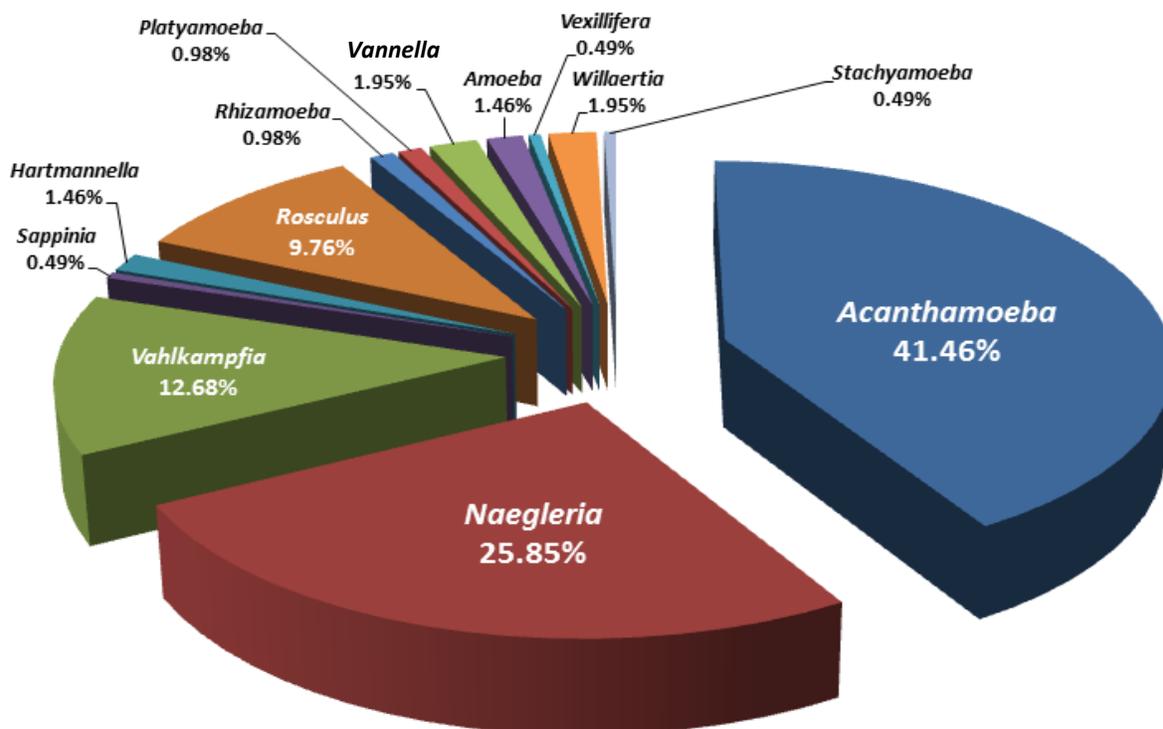


Figura 11. Proporción de géneros de AVL aislados de las muestras de agua la ZMVM.

La presencia de estas amebas se debe principalmente a que el medio acuático es donde primordialmente se ve favorecido su crecimiento y reproducción (Smirnov, 2004). Como se puede observar en la figura 7, el género *Acanthamoeba* fue el más frecuente en las muestras, en parte puede relacionarse a su carácter cosmopolita y a su nivel de resistencia a los biocidas (cloro) atribuida a la composición de su quiste (Khunkitti *et al.*, 1998; Byron *et al.*, 2008).

Bonilla-Lemus y colaboradores en 2010 identificaron la presencia de *Acanthamoeba* en agua potable de la Zona Metropolitana del Valle de México, además de que este género fue uno de los más frecuentes. Géneros como *Naegleria* y *Acanthamoeba* tienen representantes patógenos importantes, cuyas especies están reportadas como agentes causales de enfermedades en humanos y animales, por lo que es importante mencionar su presencia (Schuster y Visvesvara, 2004; Hall, 2012; Jercic, 2007).

Del total de muestras analizadas en este estudio, la mayor cantidad de aislados fue obtenida de las cisternas (Figura 12), esto podría deberse a dos factores importantes: la pérdida gradual de cloro libre residual y a la presencia de biopelículas, las cuales se forman debido a la inadecuada limpieza y mal mantenimiento de las cisternas (Shoff *et al.*, 2008).

El cloro es utilizado principalmente como agente antimicrobiano debido a su carácter fuertemente oxidante, el cual tiene un amplio espectro de eliminación de agentes patógenos, pero debido a que el agua es almacenada por periodos prolongados, el cloro comienza a perderse y por ende su efecto antimicrobiano, favoreciendo con esto el crecimiento y reproducción de estos organismos (Hoffman y Michel, 2001; Jeong y Yu, 2005; Shoff *et al.*, 2008; Özçelik *et al.*, 2012).

Otro factor muy importante al cual también puede atribuirse la presencia de estos organismos en las muestras son las biopelículas, las cuales están formadas principalmente por bacterias y otros organismos, formando de esta manera un micro ecosistema (Thomas *et al.*, 2010). Las biopelículas le otorgan a los

microorganismos que viven en ellas alimento, protección contra depredadores y amortiguan cambios de pH, temperatura, osmolaridad y de presencia de cloro. De esta forma, si no se eliminan las biopelículas de los reservorios de agua, la eficacia del cloro en organismos con potencial patógeno se ve inhibida (Serra, 2003; Thomas *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010).

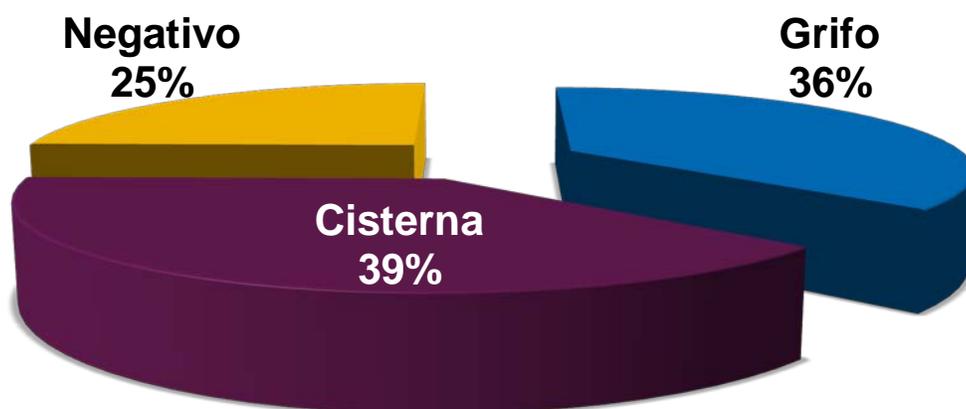
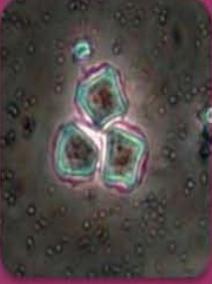
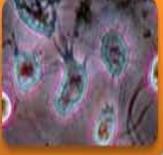


Figura 12. Total de porcentajes de aislados amebianos en cisterna, grifo y muestras negativas para AVL.

Cabe resaltar que el porcentaje de presencia de aislados amebianos en el agua de grifo fue alto (Figura 12), esto considerando estudios como los de Bonilla-Lemus *et al.* (2010), donde la mayoría de los aislados son obtenidos de cisterna u otro reservorio de agua. Esta situación posiblemente pueda atribuirse a la mala condición de las tuberías por las que el agua atraviesa, ya que la mayoría de las redes de distribución de agua son antiguas y además la concentración de cloro libre residual del 99 % de las muestras fue cero, por lo que también este es un factor que favoreció la presencia de amebas en las muestras.

En el cuadro 4 se muestra el listado de géneros y especies de AVL aisladas en el presente estudio:

Cuadro 4. Riqueza específica de AVL aisladas de agua proveniente del grifo y cisterna de la ZMVM

<p>Acanthamoeba</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Acanthamoeba griffini</i> • <i>A. culbertsoni</i> • <i>A. castellanii</i> • <i>A. polyphaga</i> • <i>A. triangularis</i> • <i>A. astronyxis</i> • <i>A. sp</i> • <i>A. rhyodes</i> • <i>A. quina</i> 	<p>Platyamoeba</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Platyamoeba sp.</i> 
<p>Naegleria</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Naegleria sp.</i> • <i>N. gruberi</i> • <i>N. angularis</i> 	<p>Vexillifera</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Vexillifera sp.</i> 
<p>Vahlkampfia</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Vahlkampfia aberdonica</i> • <i>V. avara</i> • <i>V. enterica</i> • <i>V. inornata</i> • <i>V. sp.</i> • <i>V. ustiana</i> 	<p>Willaertia</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Willaertia sp.</i> 
<p>Sappinia</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Sappinia sp.</i> 	<p>Rhizamoeba</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Rhizamoeba sp.</i> 
<p>Hartmannella</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Hartmannella sp.</i> 	<p>Rosculus</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Rosculus ithacus</i> 
<p>Hartmannella</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Hartmannella sp.</i> 	<p>Stachyamoeba</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Stachyamoeba lipophora</i> 
<p>Hartmannella</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Hartmannella sp.</i> 	<p>Vannella</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Vannella platypodia</i> 
<p>Hartmannella</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Hartmannella sp.</i> 	<p>Amoeba</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Amoeba sp.</i> 

2. Identificación y taxonomía del género *Acanthamoeba*

La identificación de los aislados pertenecientes al género *Acanthamoeba* fueron realizados en base a la comparación de las características morfológicas del quiste con las claves taxonómicas de Page (1988).

De los 85 aislados de *Acanthamoeba* se lograron determinar 8 especies, 17 aislados solo pudieron ser determinados hasta género, debido a que sus características no coinciden con las descritas en las claves taxonómicas de Page (1988). Este tipo de amebas fueron muy frecuentes en este estudio, ya que estuvieron presentes en la mayoría de las muestras analizadas (Figura 13).

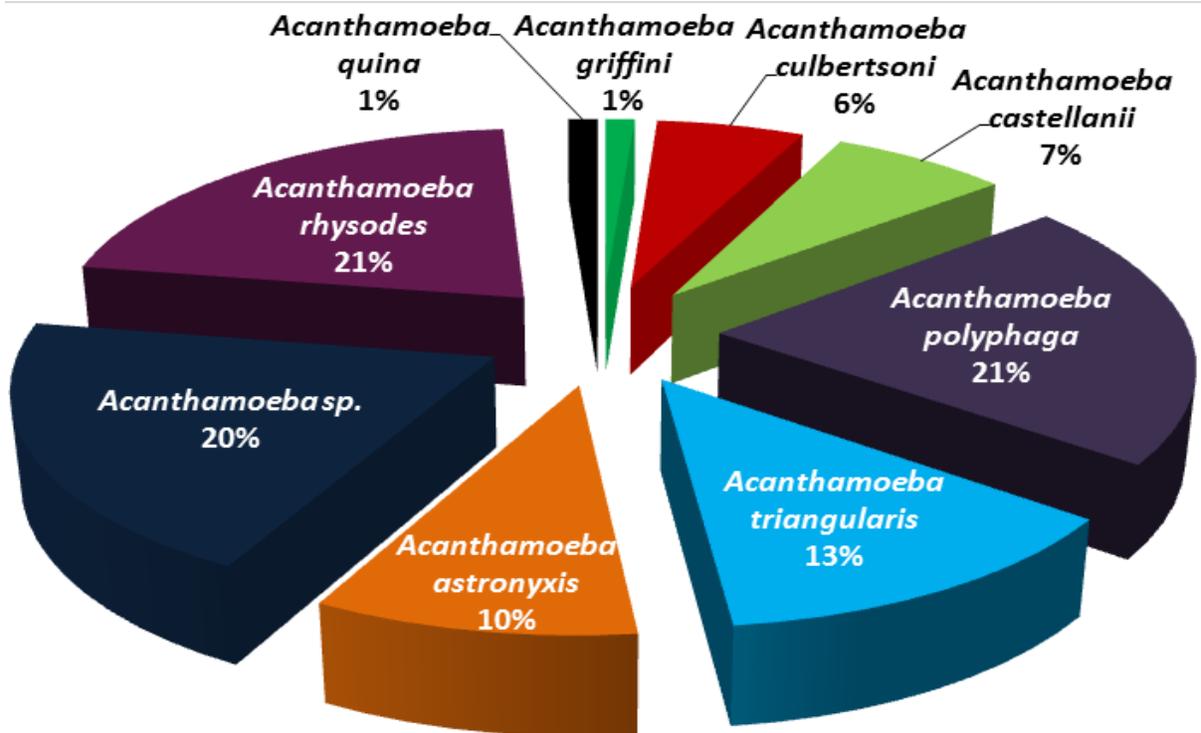


Figura 13. Porcentaje de especies de *Acanthamoeba* aisladas del agua potable

La frecuencia fue semejante para dos especies, ya que *A. polyphaga* y *A. rhyodes* obtuvieron el mismo porcentaje de presencia en las muestras. Es importante mencionar que siguiendo la clasificación morfológica, ambas especies

están dentro del grupo de las patógenas, debido a que pueden provocar ambas patologías asociadas al género, tales como queratitis (QA) y encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), pero para asegurar la patogenicidad de los aislados, es necesario someter estas muestras a análisis (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Caumo *et al.*, 2011; Magnet *et al.*, 2012). Y en caso de que ninguno de los aislados presentara genotipos patógenos, la posible presencia de endosimbiontes u organismos resistentes a la fagocitosis convierte a estas amebas en caballos de Troya, facilitando que estos endosimbiontes puedan crecer, sobrevivir, aumentar su virulencia y ser transportados a cualquier parte (Miltner y Bermudez, 2000; Heinz *et al.*, 2007; Thomas y Ashbolt, 2011; Ovrutsky *et al.*, 2013).

El número de especies de *Acanthamoeba* aisladas fue elevado, pero tomando en cuenta que en estudios realizados en Tenerife, España donde el porcentaje de presencia de *Acanthamoeba* fue de 59.5 %, Jamaica (36.1 %), Inglaterra (30 %), Hong Kong (10 %), Corea del sur (7.7 %) y E.U (2.8 %), según cifras publicadas por Shanmuganathan y Khan en el 2009. Por lo que el porcentaje de muestras positivas para *Acanthamoeba* (41.5 %) no dista mucho del de otros países, aunque es importante resaltar la mala calidad que tiene el agua potable en los sitios muestreados.

De esta forma es de llamar la atención que la Norma Oficial de agua para uso y consumo humano (NOM-127-SSA1-1994) no contemple a *Acanthamoeba* como un organismo peligroso que deba ser tomado en cuenta, puesto que es de suma importancia a nivel salud y solo este contemplado en la Norma de Requisitos Sanitarios y calidad de agua de albercas (NOM-245-SSA1-2010). Mientras que otros países como Australia, Inglaterra y E.U., regulan su presencia en el agua potable y en el caso de E.U., la agencia de protección al ambiente con sus siglas en inglés (EPA), estableció un catálogo de regulación de contaminantes biológicos, dentro del cual esta contemplada *Acanthamoeba* (EPA, 2012).

3. Taxonomía, descripción y registro fotográfico de aislados de *Acanthamoeba*

Como se mencionó anteriormente, la identificación morfológica se realizó mediante la comparación de caracteres morfológicos tanto del quiste como del trofozoíto con las claves de Page (1988). La fase quística madura es crucial para identificar hasta especie, puesto que algunas diferencias entre especies son muy notorias.

A continuación se muestran las especies aisladas, así como sus dos respectivas fases en su ciclo de vida. Además de incluir un recuadro que indica el grado de patogenicidad al que está asociada la especie en la literatura consultada (Figuras 14-22).

a) *Acanthamoeba astronyxis* (Ray y Hayes, 1954) Page, 1967

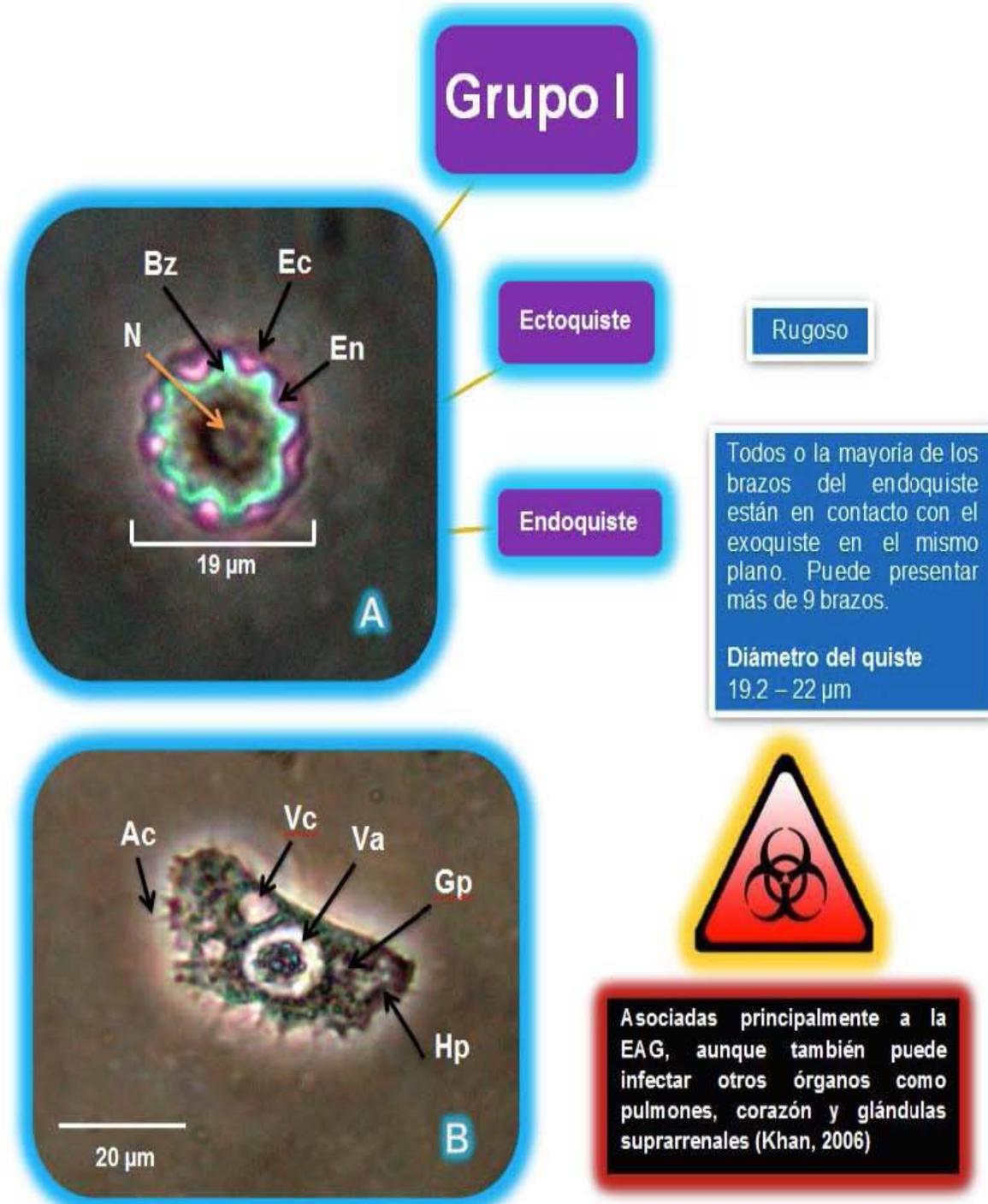


Figura 14. *Acanthamoeba astronyxis*. **(A)** Fotografía de la fase quística donde se puede observar el ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), núcleo (**N**) y brazo (**Bz**). **(B)** Fotografía de fase de trofozoito donde se observan los acantópodos (**Ac**), la vacuola contráctil (**Vc**), vacuola alimenticia (**Va**), granuloplasma (**Gp**) y hialinoplasma (**Hp**). Ambas fotografías fueron tomadas con microscopio invertido en contraste de fases 40X. El color rojo de la etiqueta de lado inferior derecho indica un nivel de patogenicidad alto según la bibliografía citada. Fotografías propiedad de María Jimena Mendoza Romero.

b) *Acanthamoeba castellanii* (Douglas, 1930) Volkonski, 1931

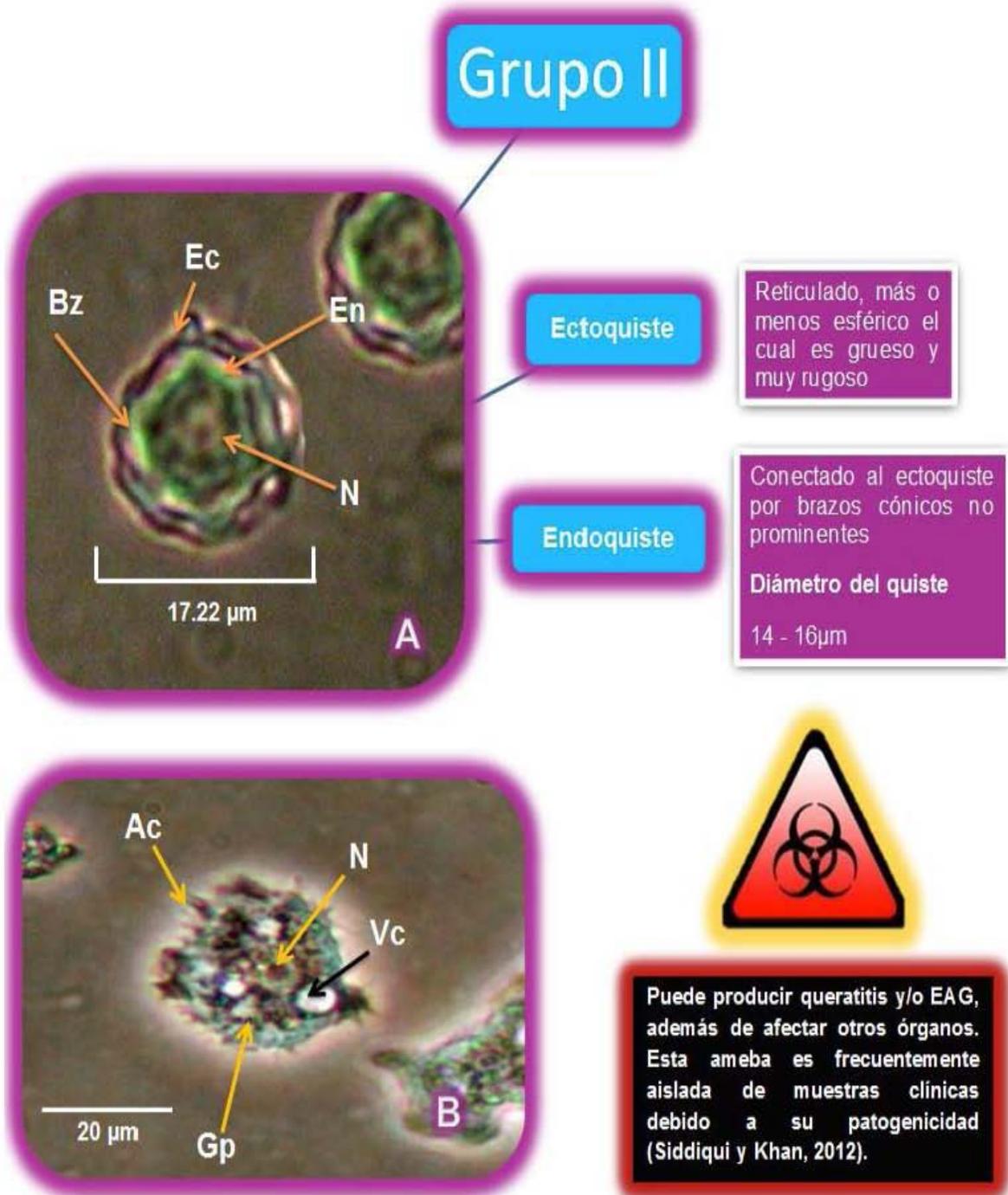


Figura 15. *Acanthamoeba castellanii*. **(A)** Fotografía de la fase quística donde se puede observar el ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), núcleo (**N**) y brazo (**Bz**). **(B)** Fotografía de fase de trofozoito donde se observan los acantópodos (**Ac**), la vacuola contráctil (**Vc**), granuloplasma (**Gp**) y núcleo (**N**). Ambas fotografías fueron tomadas con microscopio invertido en contraste de fases 40X. El color rojo de la etiqueta de lado inferior derecho indica un nivel de patogenicidad alto según la bibliografía citada. Fotografías propiedad de María Jimena Mendoza Romero.

c) *Acanthamoeba culbertsoni* (Singh y Das, 1970) Griffin, 1972

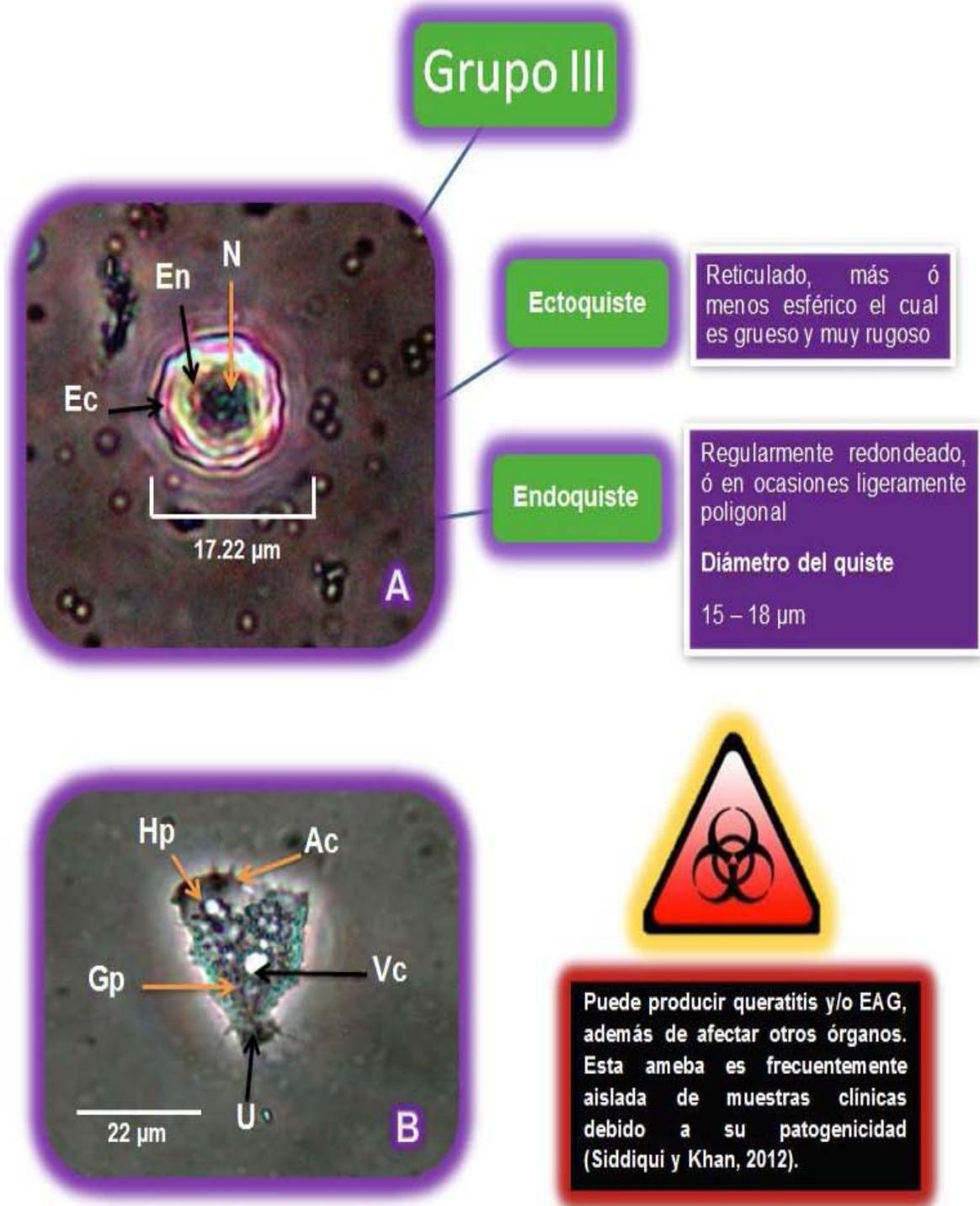


Figura 16. *Acanthamoeba culbertsoni* **(A)** Fotografía de la fase quística donde se puede observar el ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**) y núcleo (**N**). **(B)** Fotografía de fase de trofozoíto donde se observan los acantópodos (**Ac**), la vacuola contráctil (**Vc**), granuloplasma (**Gp**) e hialinoplasma (**Hp**). Ambas fotografías fueron tomadas con microscopio invertido en contraste de fases 40X. El color rojo de la etiqueta de lado inferior derecho indica un nivel de patogenicidad alto según la bibliografía citada. Fotografías propiedad de María Jimena Mendoza Romero.

d) *Acanthamoeba griffini* (Sawyer, 1971)

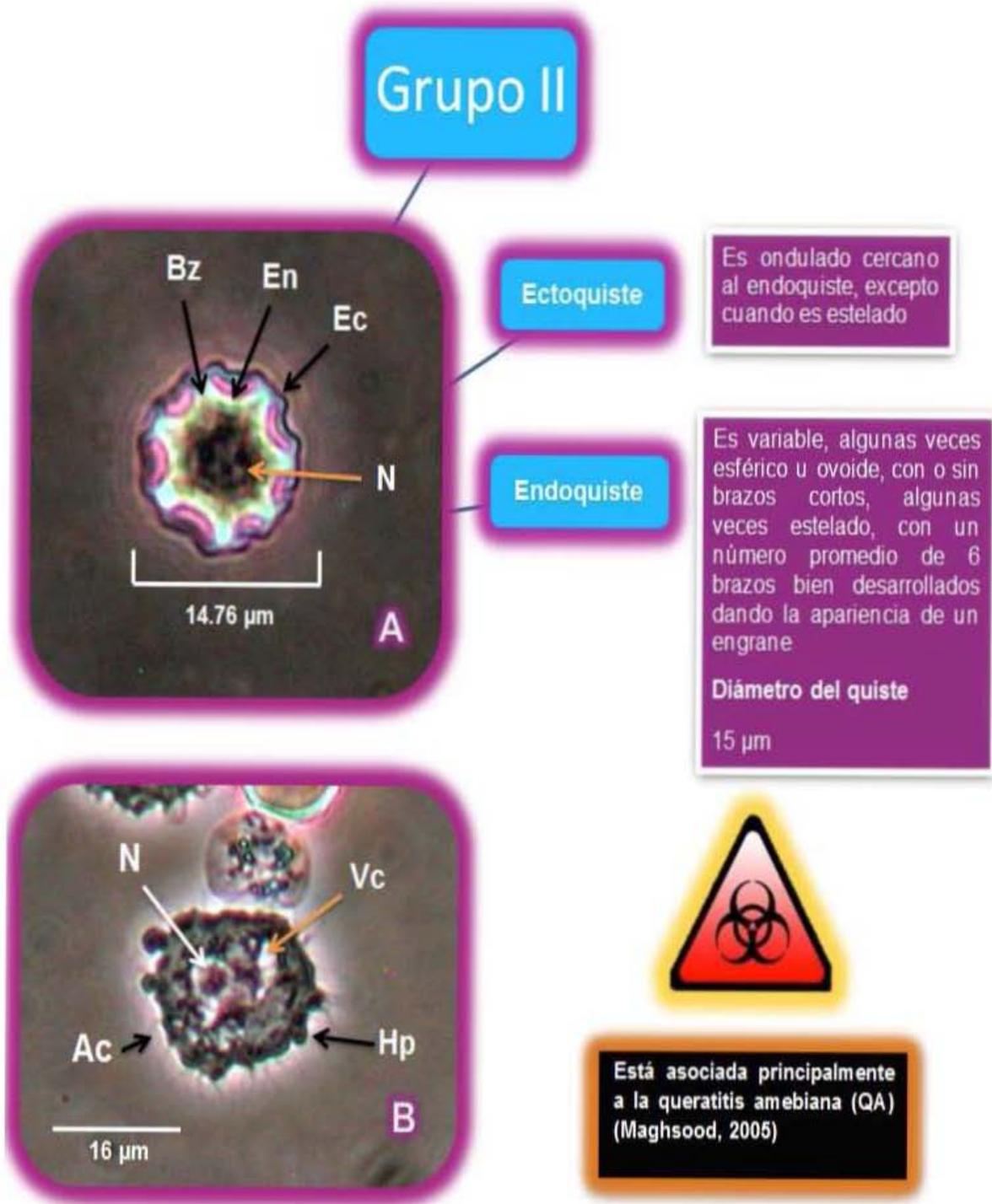


Figura 17. *Acanthamoeba griffini*. **(A)** Fotografía de la fase quística donde se puede observar el ectociste (**Ec**), endociste (**En**), núcleo (**N**) y brazo (**Bz**). **(B)** Fotografía de fase de trofozoito donde se observan los acantópodos (**Ac**), la vacuola contráctil (**Vc**), núcleo (**N**) e hialinoplasma (**Hp**). Ambas fotografías fueron tomadas con microscopio invertido en contraste de fases 40X. El color naranja de la etiqueta de lado inferior derecho indica un nivel de patogenicidad medio según la bibliografía citada. Fotografías propiedad de María Jimena Mendoza Romero.

e) *Acanthamoeba polyphaga* (Pushkarew, 1913) Volkonski, 1931

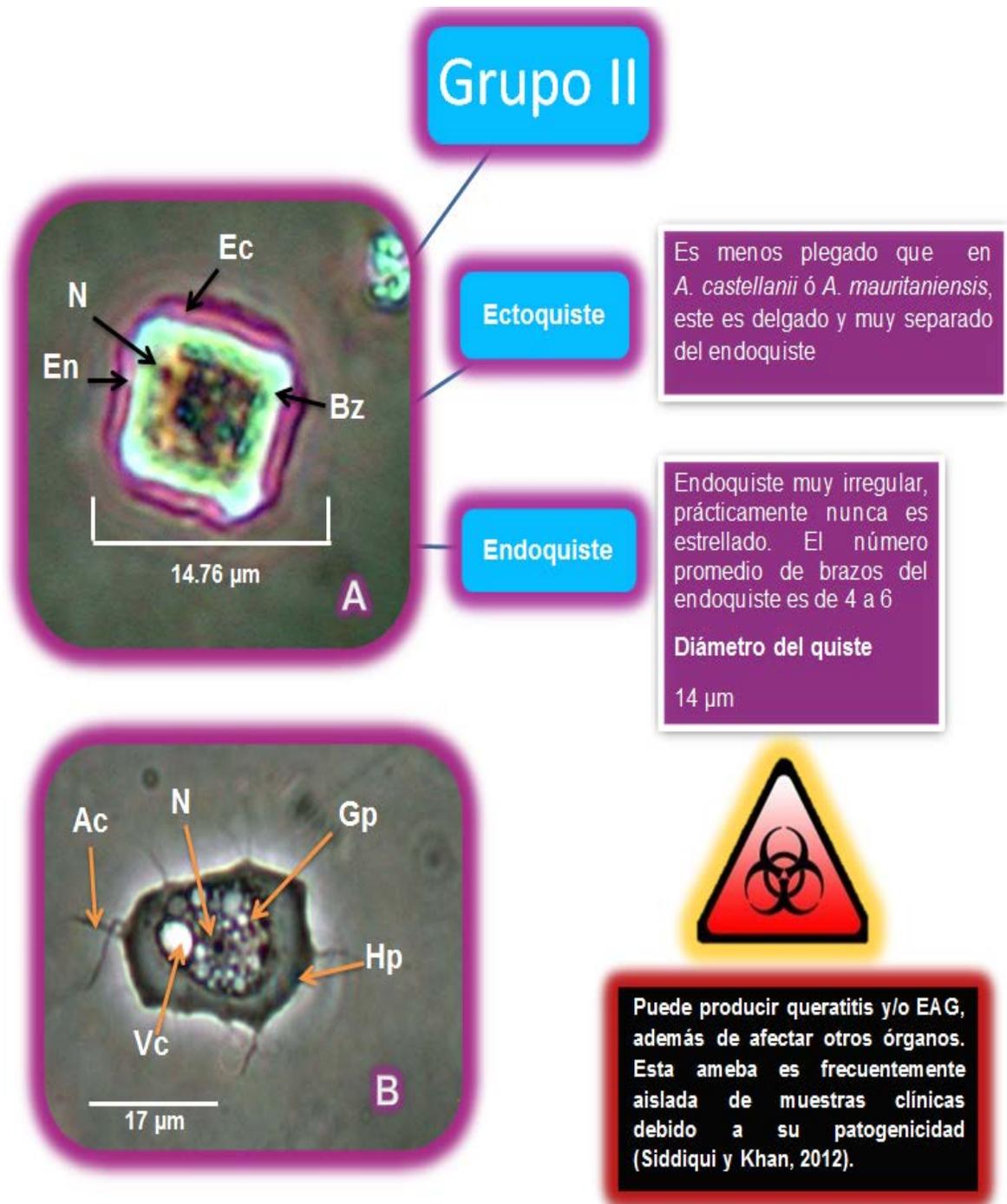


Figura 18. *Acanthamoeba polyphaga*. **(A)** Fotografía de la fase quística donde se puede observar el ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), núcleo (**N**) y brazo (**Bz**). **(B)** Fotografía de fase de trofozoito donde se observan los acantópodos (**Ac**), la vacuola contráctil (**Vc**), núcleo (**N**), granuloplasma (**Gp**) e hialinoplasma (**Hp**). Ambas fotografías fueron tomadas con microscopio invertido en contraste de fases 40X. El color rojo de la etiqueta de lado inferior derecho indica un nivel de patogenicidad alto según la bibliografía citada. Fotografías propiedad de María Jimena Mendoza Romero.

f) *Acanthamoeba quina* (Pussard y Ponds, 1977).



Figura 19. *Acanthamoeba quina*. **(A)** Fotografía de la fase quística donde se puede observar el ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**) y núcleo (**N**). **(B)** Fotografía de fase de trofozoíto donde se observan los acantópodos (**Ac**), la vacuola contráctil (**Vc**), granuloplasma (**Gp**), hialinoplasma (**Hp**) y uroide (**U**). Ambas fotografías fueron tomadas con microscopio invertido en contraste de fases 40X. El color naranja de la etiqueta de lado inferior derecho indica un nivel de patogenicidad medio según la bibliografía citada. Fotografías propiedad de María Jimena Mendoza Romero.

g) *Acanthamoeba rhyodes* (Singh, 1952) Griffin, 1972

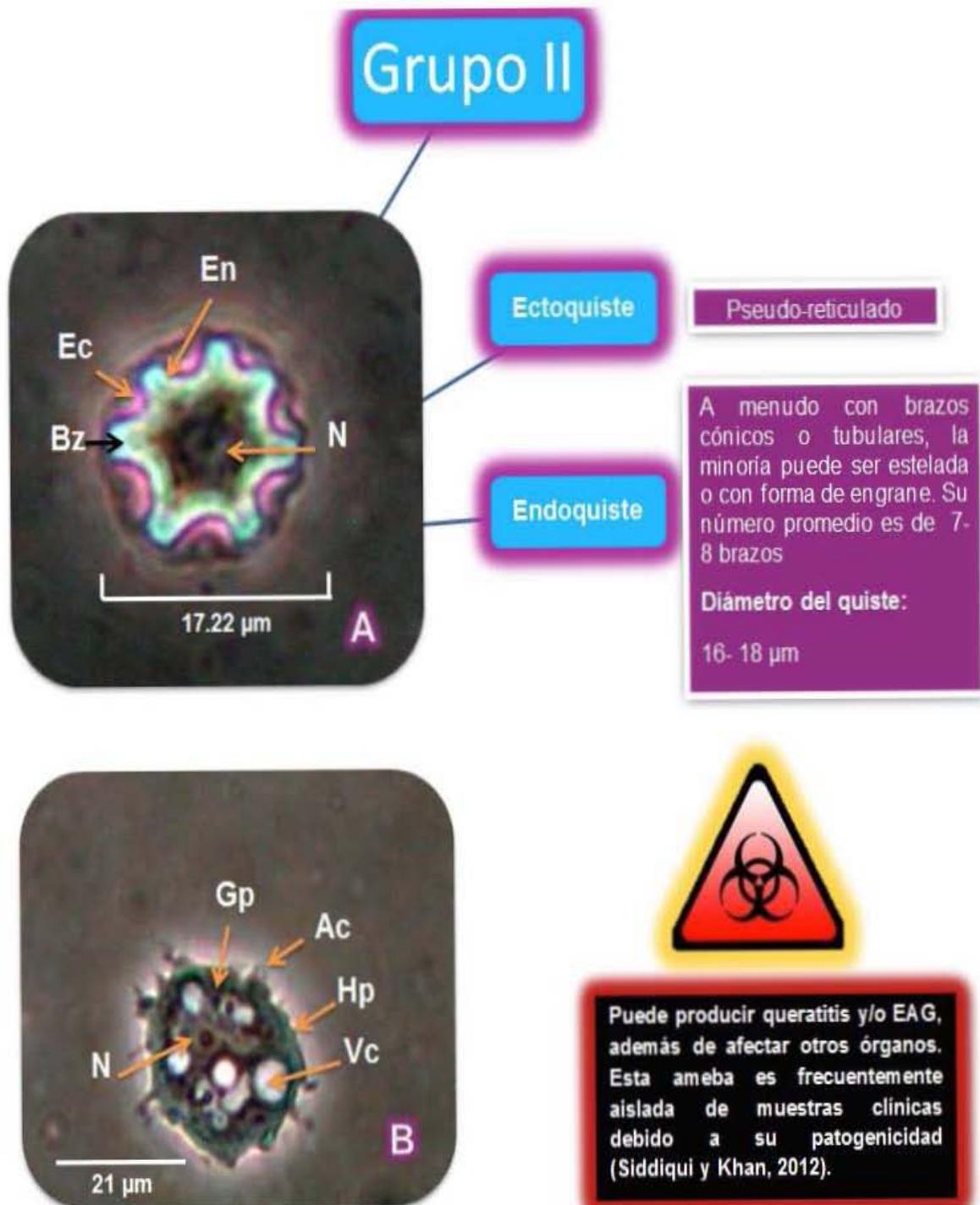


Figura 20. *Acanthamoeba rhyodes*. **(A)** Fotografía de la fase quística donde se puede observar el ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), núcleo (**N**) y brazo (**Bz**). **(B)** Fotografía de fase de trofozoito donde se observan los acantópodos (**Ac**), la vacuola contráctil (**Vc**), granuloplasma (**Gp**), hialinoplasma (**Hp**) y núcleo (**N**). Ambas fotografías fueron tomadas con microscopio invertido en contraste de fases 40X. El color rojo de la etiqueta de lado inferior derecho indica un nivel de patogenicidad alto según la bibliografía citada. Fotografías propiedad de María Jimena Mendoza Romero.

h) *Acanthamoeba* sp.

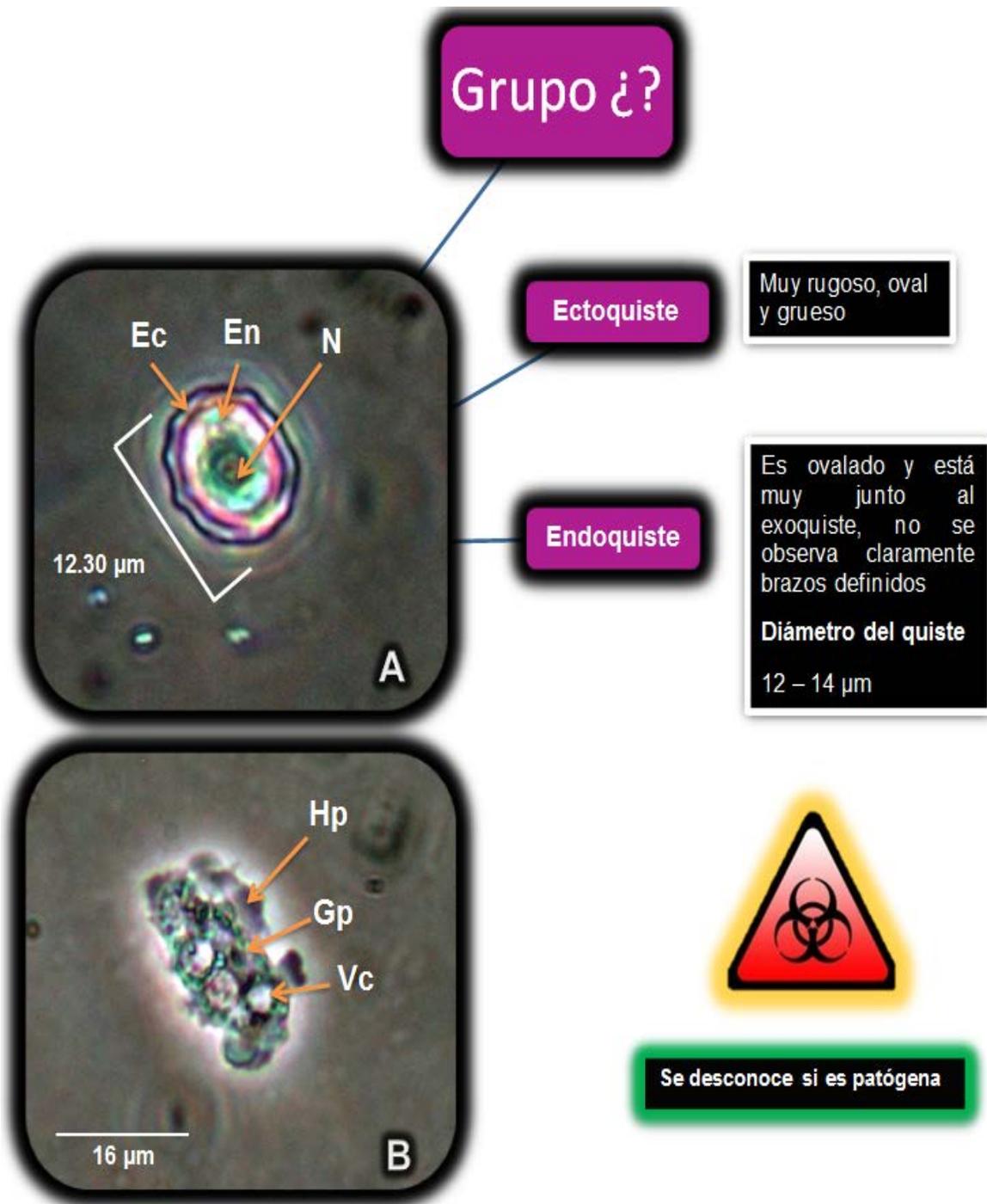


Figura 21. *Acanthamoeba* sp. **(A)** Fotografía de la fase quística donde se puede observar el ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**) y núcleo (**N**). **(B)** Fotografía de fase de trofozoíto donde se observa la vacuola contráctil (**Vc**), granuloplasma (**Gp**) e hialinoplasma (**Hp**). Ambas fotografías fueron tomadas con microscopio invertido en contraste de fases 40X. El color verde de la etiqueta de lado inferior derecho indica un nivel de patogenicidad, el cual es desconocido debido a que no está reportada en las claves de Page (1988). Fotografías propiedad de María Jimena Mendoza Romero.

i) *Acanthamoeba triangularis* (Pussard y Ponds, 1977)

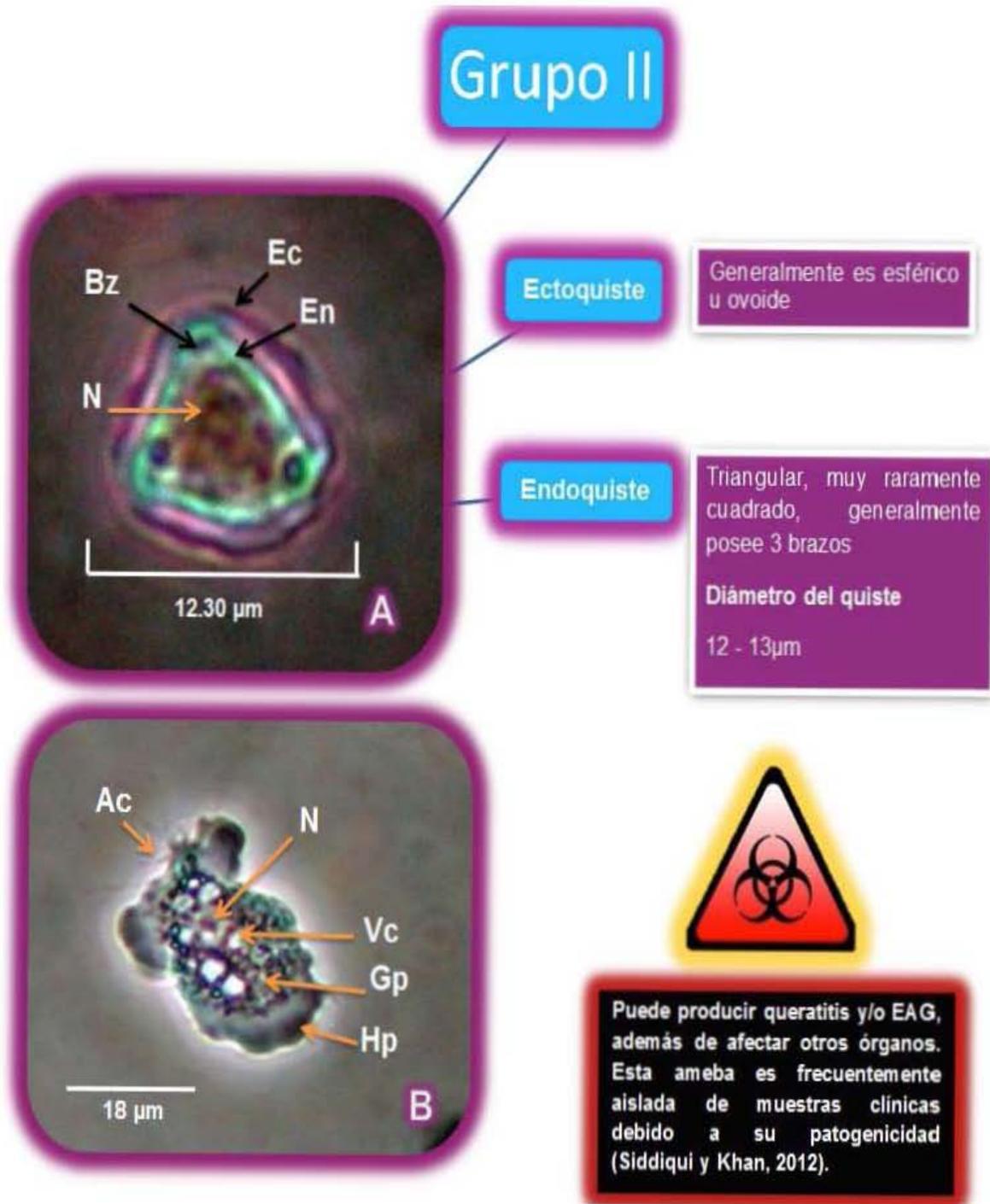


Figura 22. *Acanthamoeba triangularis*. **(A)** Fotografía de la fase quística donde se puede observar el ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), núcleo (**N**) y brazo (**Bz**). **(B)** Fotografía de fase de trofozoíto donde se observan los acantópodos (**Ac**), la vacuola contráctil (**Vc**), granuloplasma (**Gp**), hialinoplasma (**Hp**), núcleo (**N**) y uroide (**U**). Ambas fotografías fueron tomadas con microscopio invertido en contraste de fases 40X. El color rojo de la etiqueta de lado inferior derecho indica un nivel de patogenicidad alto según la bibliografía citada. Fotografías propiedad de María Jimena Mendoza Romero.

4. Distribución de *Acanthamoeba* en los sitios muestreados

Los sitios positivos para *Acanthamoeba* fueron los siguientes (Cuadro 5):

Cuadro 5. Sitios positivos para *Acanthamoeba*.

ZONA METROPOLITANA DEL VALLE DE MÉXICO	
Delegaciones	Municipios
<ul style="list-style-type: none">• Azcapotzalco• Cuajimalpa de Morelos• Gustavo A. Madero• Iztacalco• Tlalpan• Xochimilco	<ul style="list-style-type: none">• Coacalco• Cuautitlán• Cuautitlán Izcalli• Huehuetoca• Huixquilucan• Jilotzingo• Juchitepec• Ozumba• Temamatla• Tepetlixpa• Tlalmanalco• Tlalnepantla de Baz• Tultitlán• Valle de Chalco

Como se puede observar en el cuadro 5 fueron un total de 20 lugares positivos para *Acanthamoeba*, pero de estos 20 lugares en siete de ellos (Azcapotzalco, Cuajimalpa de Morelos, Iztacalco, Coacalco, Cuautitlán Izcalli, Huixquilucan y Tlalnepantla de Baz) el agua es suministrada por el sistema Cutzamala, cuya calidad es mala (Pérez, 2004). No se tiene mucha información de los demás afluentes que suministran el agua a la ZMVM, pero cabe mencionar que un estudio realizado por Thomas y Ashbolt en el 2011, mostraron que la mayoría de las veces, las plantas de potabilización son colonizadas por una densidad baja de AVL, las cuales al entrar en contacto con las tuberías del suministro encuentran un lugar favorable para reproducirse, debido a que las tuberías están cubiertas por materia orgánica o biopelículas. De esta forma la presencia de *Acanthamoeba* podría atribuirse a tres factores: mala calidad microbiológica del agua suministrada debido al inadecuada desinfección, mal estado de las redes de distribución y contaminación proveniente de las cisternas.

La distribución de *Acanthamoeba* se localizó principalmente en la zona sur y este de la ZMVM tal como se muestra en la figura 23.

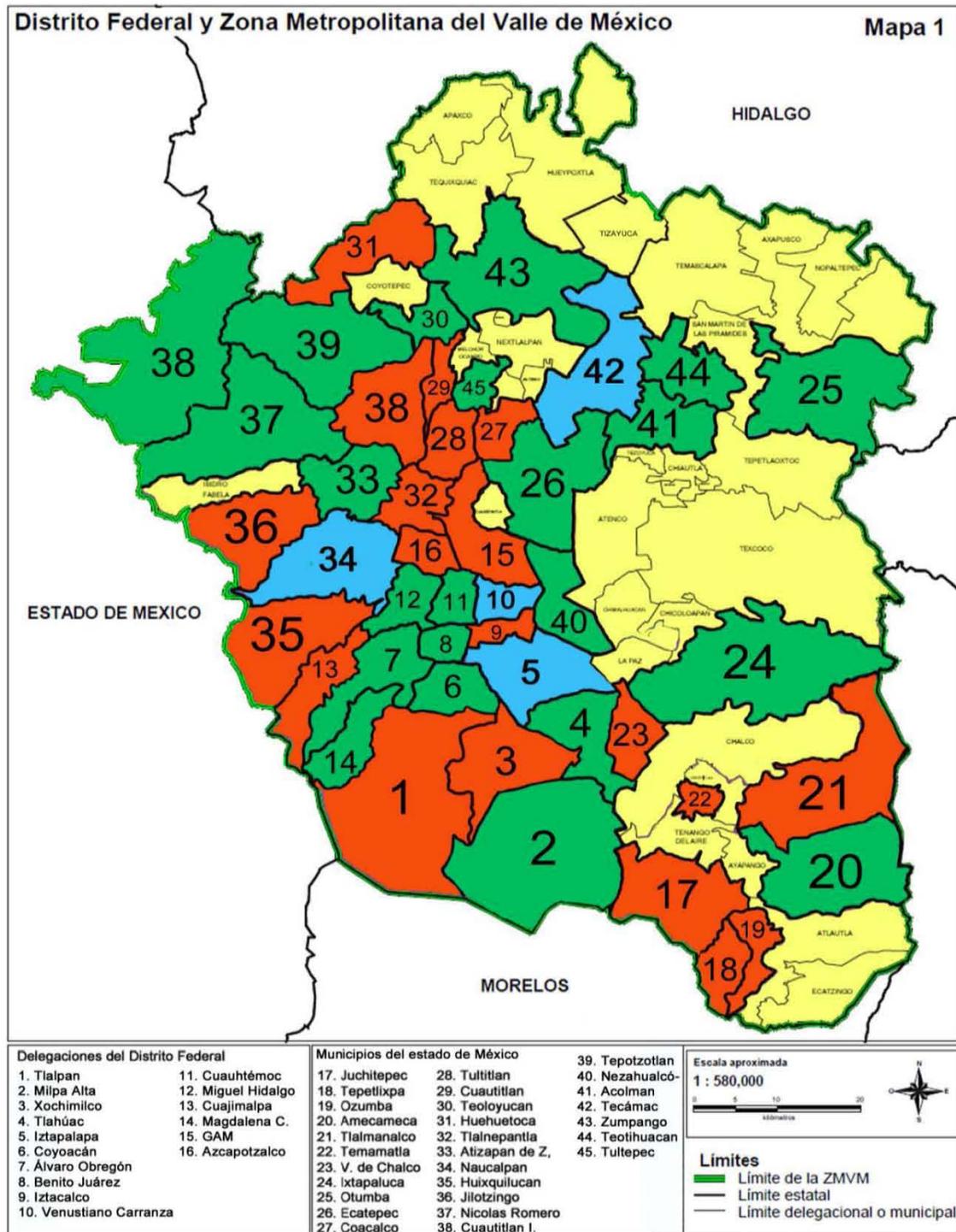


Figura 23. Muestra los lugares positivos para *Acanthamoeba* (color naranja), AVL (color verde) y muestras negativas (azul). Para más detalles de las especies identificadas por delegación y municipio consultar Anexo IV.

5. Parámetros fisicoquímicos

Se ha demostrado que *Acanthamoeba* es resistente a una amplia variedad de ámbitos de temperatura, cloro libre residual, pH, conductividad y oxígeno disuelto por mencionar algunos. La fase quística le confiere una resistencia única, que hace posible que esté presente casi en todos los biotopos (Loret y Greub, 2010; Siddiqui y Khan, 2012)

Se tomaron en cuenta los principales factores fisicoquímicos para saber en qué condiciones *Acanthamoeba* puede desarrollarse, de esta forma se registraron los siguientes parámetros.

5.1 Temperatura

En la figura 24 pueden observarse los datos de temperatura la cual osciló entre los 13.1 y los 29 °C. Las diferencias entre las temperaturas de las muestras no fueron muy diferentes entre sí y tomando en cuenta que algunas especies de *Acanthamoeba* son termofílicas, su presencia en las muestras era probable. Cabe mencionar que todos los aislados de *Acanthamoeba* crecieron a 37 °C por lo que posiblemente sean capaces de infectar humanos y otros mamíferos, aunque hay registros de especies termo-tolerantes pero no patógenas, por lo que la termo-tolerancia es una condición necesaria pero no suficiente para determinar patogenicidad (Rohr *et al.*, 1998; Todero *et al.*, 2011). Pero a pesar de ello se registraron especies de *Acanthamoeba* potencialmente patógenas (*A. triangularis*, *A. rhyodes*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis*) aún en temperaturas de 13.1 °C (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

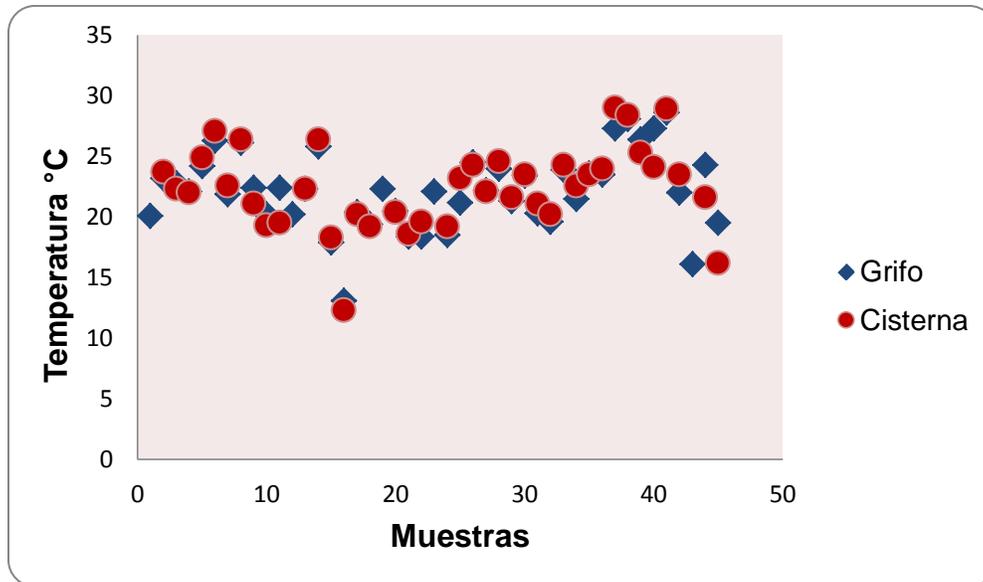


Figura 24. Valores de temperatura registrados en el agua de grifo y cisterna.

5.2 Cloro libre residual

Según la modificación a la NOM-127-SSA1-1994 los valores permisibles son de 0.2 a 1.50 mg/L, de los cuales los valores de las muestras estuvieron en un ámbito de 0 - 0.5 mg/L. Como se observa en la figura 25, en la mayoría de los valores de las muestras para cloro libre residual la concentración fue de cero, registrándose esto principalmente en las muestras de cisterna. En cambio, las muestras cuya concentración fue de 0.5 mg/L fueron principalmente en agua de la llave, originando con esto que posiblemente sea la razón por la que algunas de estas muestras fueran negativas a AVL, pero hubo otras muestras que tenían esta misma concentración de cloro y aún así hubo presencia amebiana.

Además, es conocido que en especial las especies de *Acanthamoeba* que pertenecen al grupo II son más resistentes, llegando a soportar 5mg/L de cloro libre residual y aún seguir viables (Shoff *et al.*, 2008).

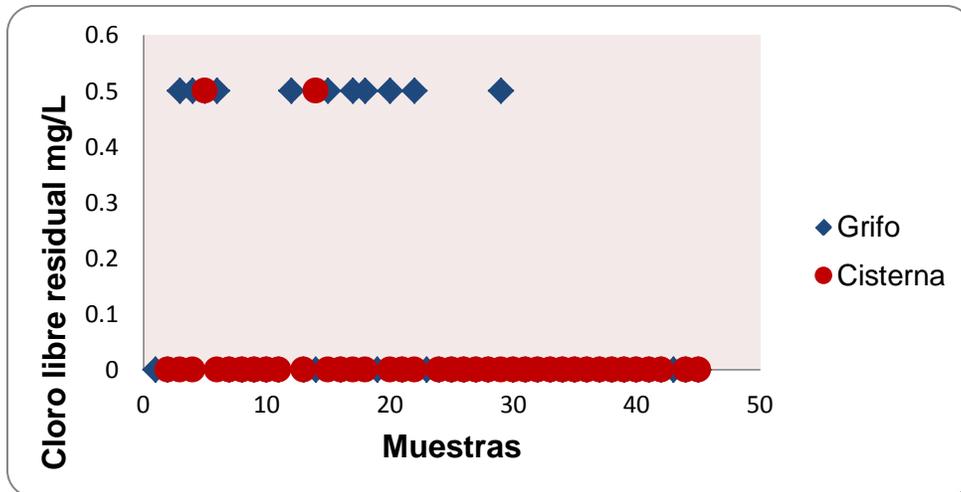


Figura 25. Valores de cloro libre residual registrados en las muestras de agua de grifo y cisterna.

5.1. pH

Los valores de pH en muestras de agua de grifo estuvieron en ámbitos desde 6.7 a 8.67, mientras que los valores en las muestras de cisterna fueron entre los 6.76 a 8.51. Como puede observarse en la figura 26, los datos estuvieron similares en ambos lugares de toma de muestra.

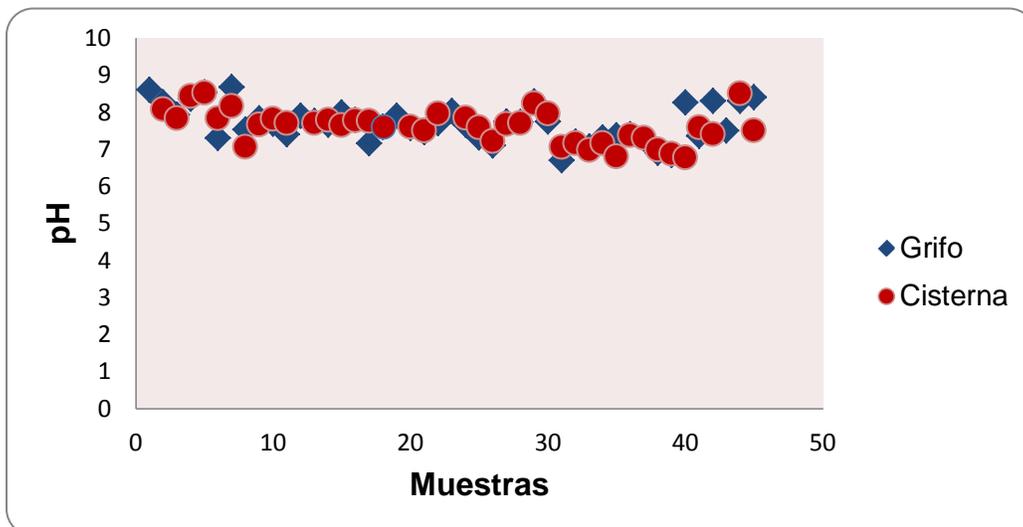


Figura 26. Valores de pH registrados en las muestras de agua de grifo y cisterna.

Cabe mencionar que, a pesar de que el valor más alto de pH pertenece a Iztacalco, ambas muestras de grifo y cisterna fueron positivas para *Acanthamoeba*, confirmando con esto el potencial de colonización de *Acanthamoeba* en diferentes ámbitos de pH. Además, los valores de pH sobrepasan los establecidos por la Modificación a la NOM-127-SSA1-1994 (Ver Anexo III) .

5.3. Conductividad

Las amebas son tolerantes a un amplio ámbito de osmolaridad, permitiéndole sobrevivir en agua destilada, cultivo de tejidos, fluidos corporales de mamíferos, así como en agua marina (Visvesvara, 2010). Por lo tanto valores de conductividad que van desde 0.02 a 1.55 $\mu\text{S}/\text{cm}^3$ no son ningún impedimento para la presencia de las amebas en el agua potable (Figura 27).

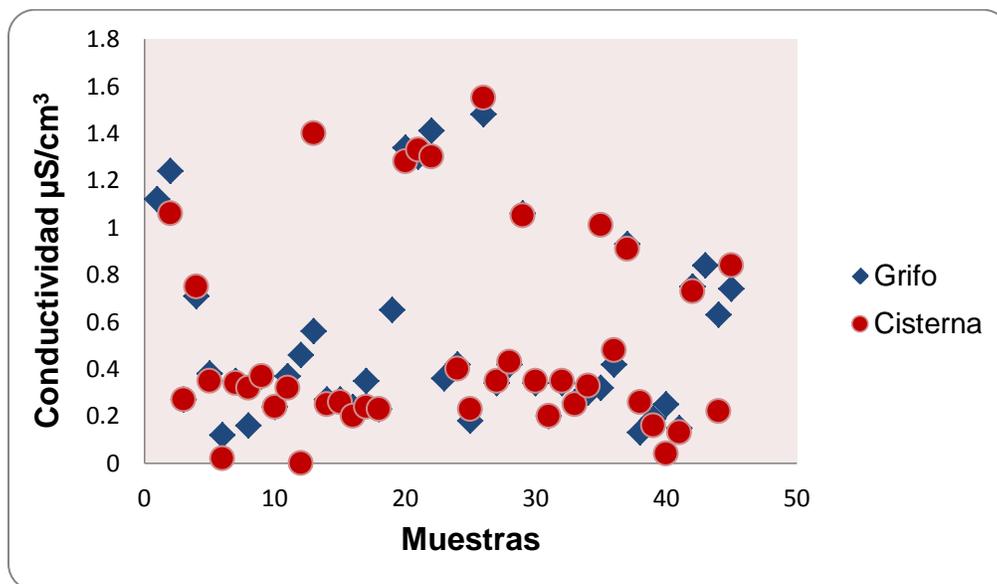


Figura 27. Valores de conductividad registrados de las muestras de agua de grifo y cisterna.

6. Análisis estadístico de parámetros fisicoquímicos

Para saber si los parámetros fisicoquímicos analizados tienen relación significativa con la presencia de *Acanthamoeba* en las muestras de agua, se realizaron dos análisis de correlación de Pearson, uno para las muestras de la llave y otro para las muestras de la cisterna. Se realizó a través del programa GraphPad Prism®. Obteniendo que los parámetros físico-químicos tanto en las muestras de cisterna como en las de grifo no mostraron una correlación significativa ($p < 0.05$).

IX. CONCLUSIONES

El panorama general que permitió mostrar el presente trabajo fue la mala calidad microbiológica de la mayoría de las muestras de agua analizadas, ya que el 75.3% fueron positivas para AVL. Se obtuvieron un total de 205 aislados amebianos, los que pertenecieron a 13 géneros: *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Platyamoeba*, *Rhizamoeba*, *Rosculus*, *Sappinia*, *Stachyamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella*, *Vexillifera* y *Willaertia*. El género con mayor frecuencia de aislamiento fue *Acanthamoeba* (41.46 %).

De acuerdo a criterios morfológicos se identificaron nueve especies de *Acanthamoeba*: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyssodes*, *A. sp.* y *A. triangularis*.

Las especies más frecuentes de *Acanthamoeba* fueron *A. polyphaga* y *A. rhyssodes*, ambas con el mismo porcentaje de presencia en las muestras. Es importante mencionar que todas las especies están reportadas en la bibliografía dentro del grupo de las patógenas, ya que pueden producir patologías asociadas a su género.

Mediante el análisis estadístico de los parámetros fisicoquímicos (temperatura, cloro libre residual, ph y conductividad) realizados, se determinó que no existe relación significativa con la presencia de *Acanthamoeba* en las muestras de agua. Cabe mencionar que independientemente de este resultado, la calidad del agua no cumple con los valores de cloro libre residual así como el pH establecidos en la NOM-127-SSA1-1994.

De los 45 sitios muestreados *Acanthamoeba* estuvo presente en 20 de ellos, en las delegaciones Azcapotzalco, Cuajimalpa de Morelos, Gustavo A. Madero, Iztacalco, Tlalpan y Xochimilco, incluyendo los municipios de Coacalco, Cuautitlán, Cuautitlán Izcalli, Huehuetoca, Huixquilucan, Jilotzingo, Juchitepec, Ozumba, Temamatla, Tepetlixpa, Tlalmanalco, Tlalnepantla de Baz, Tultitlán y Valle de Chalco.

X. RECOMENDACIONES

La presencia de *Acanthamoeba* en el agua potable es una señal de alerta sobre un riesgo potencial de adquirir enfermedades asociadas a estos organismos. Además, el diagnóstico incorrecto por parte de las autoridades médicas hace imposible que en casos de encefalitis se asocie primeramente *Acanthamoeba* y no a bacterias u otros organismos, trayendo como consecuencia la muerte del paciente.

Acanthamoeba es un organismo muy resistente, por lo que es necesario que los usuarios tomen medidas de precaución para evitar la presencia y proliferación de este organismo, tales medidas pueden resumirse en lo siguiente:

- ❖ Uso de filtro en grifos domiciliarios.
- ❖ Sustitución de estos filtros cada seis meses.
- ❖ En caso de que los usuarios tengan cisterna, se recomienda lavarla al menos dos veces al año.
- ❖ La limpieza de la cisterna debe realizarse adecuadamente, es decir, debe eliminarse totalmente cualquier rastro de biopelícula adherida a las paredes de la cisterna, ya que solamente la adición de cloro no implica una correcta limpieza.
- ❖ En caso de utilizar lentes de contacto, se recomienda una correcta higiene de manos y del estuche de las lentillas.
- ❖ Cambiar el estuche cada tres meses.
- ❖ No sustituir la solución salina de las lentes de contacto por agua del grifo.
- ❖ No ducharse mientras se usan lentes de contacto.

XI. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Adl, S., Simpson, A., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, R., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Karpov, S., Krugens, P., Drug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Lynn, D., Mann, D., Mccourt, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S., Nerad, T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegel, F. y Taylor, M. 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protist. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **52**(5): 399-451.
- ❖ Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., Mcmanus, H., Mitchell, E. A., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. y Spiegel, F.W. 2012. The revised classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **59** (5): 429-493.
- ❖ Aladro, L. M. 2006. *Principales clasificaciones de los protozoos*. Las prensas de Ciencias. UNAM. Facultades de Ciencias. Primera edición. México. 90p.
- ❖ Biocyclopedia. 2012. *Protozoan Groups*. http://www.eplantscience.com/index/general_zoology/form_and_function01.php (Consultado 12 de Agosto del 2013)
- ❖ Bonilla-Lemus, P., Ramirez-Bautista, G. A., Zamora-Muñoz, C., Ibarra-Montes, M.R., Ramirez-Flores, E. y Hernandez-Martinez, M. D. 2010. *Acanthamoeba* spp. In domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Experimental Parasitology*. **126**: 54-58.
- ❖ Booton, G. C., Rogerson, A., Bonilla, T. D., Seal, D. V., Kelly, D. J., Beattie, T. K., Tomlinson, A., Lares-Villa, F., Fuerst, P. A. y Byers, T. J. 2004. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **51** (2):192-200.
- ❖ Booton, G. C., Visvesvara, G. S., Byers, T., Kelly, D. y Fuerst, A. 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *Journal of Clinical Microbiology*. **43** (4): 1689-1693.
- ❖ Boost, M., Cho, P., Lai, S. y Sun, W. M. 2008. Detection of *Acanthamoeba* in tap water and contact lens cases using polymerase chain reaction. *Optometry and Vision Science*. **85**: 526–530
- ❖ Brusca, R. C. y Brusca, G. J. 2002. *Invertebrates*. Sinauer Associates. Segunda edición. Sunderland, Massachusetts, E.U. 936 p.

- ❖ Byron, L., Clasdotter, E., Linder, E. y Winiiecka-Krusnell, J. 2008. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amoebae in water sources of León, Nicaragua. *Revista de Biología Tropical*. **56** (2):439-446.
- ❖ Calderón, G. B. 2004. *Detección de Acanthamoeba spp. en Canales de Riego de Mexicali, Baja California*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores "Plantel Iztacala". Universidad Nacional Autónoma de México. México. 69p
- ❖ Castro, M. A. 2012. *Aislamiento e identificación de Amebas Patógenas del Género Acanthamoeba en Piscinas Termales en Tecozautla, Estado de Hidalgo*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores "Plantel Iztacala". Universidad Nacional Autónoma de México. México. 58p.
- ❖ Caumo, K. y Rott, M. B. 2011. *Acanthamoeba* T3, T4 y T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Tropica*. **117**: 233-235.
- ❖ Chang, C. W., Wu, Y. C. y Ming, K. W. 2010. Evaluation of real-time PCR methods for quantification of *Acanthamoeba* in antropogenic water and biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. **109**: 799-807.
- ❖ CONAGUA. 2012. *Cobertura de Agua Potable por Municipios*. <http://www.conagua.gob.mx/atlas/usosdelagua28.html>. (consultado el 12 de abril del 2012).
- ❖ Corsaro, D. y Venditti, D. 2010. Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitology Research*. **107**(1): 233-238.
- ❖ Coulon, C., Collignon, A., McDonell, G. y Thomas, V. 2010. Resistance of *Acanthamoeba* cyst to disinfection treatments used in health care settings. *Journal of clinical Microbiology*. **48**(8): 2689-2697.
- ❖ Crum-Cianflone, N. F. 2011. *Acanthamoeba*. <http://emedicine.medscape.com/article/211214-overview#showall> (Consultado el 23 de septiembre del 2012).
- ❖ Di Cave, D., Monno, R., Bottalico, P., Guerriero, S., D'Amelio, S., D'orazi, C. y Berrilli, F. 2009. *Acanthamoeba* T4 and T15 genotypes associated with keratitis infections in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. **28**: 607-612.
- ❖ Edawa, A., Kimura, A., Kawabuchi-Kurata, T., Kusuhaara, Y. y Karanis, P. 2009. Isolation and genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* and *Naegleria* species from tap-water sources in Osaka, Japan. *Parasitology Research*. **105**: 1109-1117.
- ❖ EPA. 2012. *Contaminant Candidate List: CCL 1 List and Regulatory determinations*. <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl1.cfm#microbial>. (Consultado el 25 de septiembre del 2013)

- ❖ 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. *Dermatología Peruana*. **16** (1): 36-40.
- ❖ Garcia, A., Goñi, P., Cieloszyk, J., Fernandez, M. T., Calvo-Beguería, L., Rubio, E., Fillat, M. F., Peleato, M. L. y Clavel, A. 2013. Identification of free-living amoeba and amoeba associated bacteria from reservoirs and water treatment plants by molecular techniques. *Environmental science & technology*. **47**: 3132- 3140
- ❖ Gertiser, M. L., Giagante, E., Sgattoni, E., Basabe, N., Rivero, F., Luján, H., Occhionero, L., Paniccia, L., Visciarelli, E. y Costamagna, S. R. 2010. Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*. **42**: 122-125.
- ❖ Gianinazzi, C., Schild, M., Wüthrich, F., Müller, N., Schürch, N. y Gottstein, B. 2009. Potentially human pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a heated indoor swimming pool in Switzerland. *Experimental Parasitology*. **121**: 180-186.
- ❖ Goñi, P., Fernandez, M. T. y Rubio, E. 2013. Identifying endosymbionts bacteria associated with free-living amoeba. *Environmental Microbiology*. **10**: 1-11
- ❖ Greub, G y Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoeba. *Clinical Microbiology Review*. **17**(2): 413- 433.
- ❖ Hall, W. A. 2012. Free-Living amoebas: is it safe to go in the water? *World Neurosurgery*. **3**: 1-2.
- ❖ Heinz, E., Kolarov, I., Kästner, C., Toenshoff, E. R., Wagner, M. y Horn, M. 2007. An *Acanthamoeba* sp. containing two phylogenetically different bacterial endosymbionts. *Environmental Microbiology*. **9** (6): 1604-1609.
- ❖ Hickman, C. P., Roberts, L. S. y Larson, A. 2001. *Principles of Zoology*. McGraw Hill. Eleven Edition. New York, E.U. 299 p.
- ❖ Hoffmann, R. y Michel, R. 2001. Distribution of free-living amoeba (FLA) during preparation and supply of drinking water. *International Journal of Hygiene and Environmental health*. **203**: 215-215.
- ❖ Instituto Nacional de Ecología (INE). 2011. *Zona Metropolitana del Valle de México*. <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/652/vallemexico.pdf>. (Consultado el 18 de octubre del 2012).
- ❖ Jeong, H. J. y Yu, H. K. 2005. The role of domestic tap water in *Acanthamoeba* contamination in contact lens storage cases in Korea. *Korean Journal of Parasitology*. **43** (2): 47-50.
- ❖ Jercic, L. M. 2007. Amebas de vida libre género *Acanthamoeba*. *Revista Chilena de infectología*. **24** (6): 491- 492.

- ❖ Kao, P.M., Hsu, B. M., Chen, N. H., Huang, K. H., Huang, C. C., Ji, D. D., Chen, J. S., Lin, W. C., Huang, S. W. y Chiu, Y. C. 2011. Molecular detection and comparison of *Acanthamoeba* genotypes in different functions of watersheds in Taiwan. *Environmental Monitoring and Assessment*. **184** (7): 4335-4344.
 - ❖ Khan, N. A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. **30** (4): 564-595.
 - ❖ Khan, N. A. 2009. *Acanthamoeba: Biology a Pathogenesis*. Caister Academic Press. Norfolk, UK. 271p.
 - ❖ Khunkitti, W., Lloyd, D., Furr, J. R. y Russell, A. D. 1998. *Acanthamoeba castellanii*: Growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *Journal of Infection*. **36**: 43-48.
 - ❖ Kilvington, S., Gray, T., Dart, J., Morlet, N., Beeching, J. R., Frazer, D. G. y Matheson, M. 2004. *Acanthamoeba* keratitis: The role of domestic tap-water contamination in the United Kingdom. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **45** (1): 165-169.
 - ❖ Ledee., D. R., Iovieno, A., Miller, D., Mandal, N., Diaz, M., Fell., J., Fini, M. E. y Alfonso, E. C. 2009. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *Journal of Clinical Microbiology*. **47**(5): 1458-1467.
 - ❖ Leiva, B., Clasdotter, E., Linder, E. y Winiiecka-Krusnell, J. 2008. Free-living *Acanthamoeba* and *Naegleria* spp. amebae in water sources of Leon, Nicaragua. *International Journal of Tropical Biology*. **56** (2): 439– 446.
- Lenntech. 2014. *A drinking water purification process*. <http://www.lenntech.com/applications/drinking/purification/drinking-water-preparation.htm>. (Consultado el 19 de Marzo del 2014).
- ❖ Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martinez, E. y Valladares, B. 2005. Isolation and Identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*. **95**: 273-277.
 - ❖ Loret, F. J. y Greub, G. 2010. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **213**: 167-175.
 - ❖ Mackean, D. G. 2004. Biology Teaching Resources. www.biology-resources.com/amoeba-01.html. (Consultado el 24 de febrero del 2013).
 - ❖ Maghsood, H. A., Sissons, J., Rezaian, M., Nolder, D., Warhurst, D. y Khan, N. A. 2005. *Acanthamoeba* genotype T4 from the UK and Iran and isolation of the T2 genotype from clinical isolates. *Journal of Medical Microbiology*. **54**: 755-759.

- ❖ Magnet, A., Galvan, A. L. Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez-Vadillo, C., Perez-Irezabal, J., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G. S., Da Silva, A. J. y Del Aguila, C. 2012. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitology Research*. **111**(1):383-392.
- ❖ Marciano-Cabral, F. y Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Review*. **16** (2): 273-307.
- ❖ Marciano-Cabral, F., Puffenbarger, R. y Cabral, G. A. 2000. The Increasing Importance of *Acanthamoeba* Infections. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **47** (1): 29-36.
- ❖ Miltner, E. C. y Bermudez, L. E. 2000. *Mycobacterium avium* grow in *Acanthamoeba castellanii* is protected from the effects of antimicrobial. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **44** (7): 1900 – 1994.
- ❖ Nagyová, V., Nagy, A. Janeček, S. y Timko, J. 2010. Morphological, physiological, molecular and phylogenetic characterization of new environmental isolates of *Acanthamoeba* spp. from the region of Bratislava, Slovakia. *Biologia*. **65**: 81-91.
- ❖ NOM-127-SSA1-1994. Norma oficial mexicana “salud ambiental, agua para uso y consumo humano-limites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilizacion” <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html> (Consultado el 20 de Septiembre del 2013)
- ❖ Nwachuku, N. y Gerba, C. P. 2004. Health effects of *Acanthamoeba* spp. and its potential for waterborne transmission. *Reviews of Environmental Contamination & Toxicology*. **180**:93–131
- ❖ Oddo, B. D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Revista Chilena de Infectología*. **23** (3): 200-214
- ❖ OMS. 2006. *Guías Para la Calidad del Agua Potable*. http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/. (Consultado el 6 de Febrero del 2014)
- ❖ Ortega, F. 2011. *El Agua en Números*. http://www.uam.mx/difusion/casadeltiempo/41_iv_mar_2011/casa_del_tiempo_eIV_num41_39_40.pdf. (Consultado el 12 de mayo del 2013).
- ❖ Ortega-Rivas, A. 2002. *Aplicación de la Técnica de Rapd para la Caracterización de Especies de Género Acanthamoeba*. Tesis Doctoral en Ciencias (Farmacología). Facultad de Farmacia. Universidad de la Laguna. España. 178pp.
- ❖ Ortíz-Hernández, A. A., Vázquez-Tsuji, O., Morales-Quiróz, D. M., Llamosas-Gallardo, B., Flores-Razo, J. O. y Valencia-Rojas, S. 2000. Encefalitis por amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* spp. *Acta Pediátrica Mexicana*. **21** (3): 61-66.

- ❖ Ovrutsky, A. R., Chan, E. D., Kartalija, M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., O. J., III, F., Iseman, M. Reynolds, P., McDonnell, G. y Thomas, V. Gerald. 2013. Cooccurrence of free-living amoebae and nontuberculous *Mycobacteria* in hospital water networks and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Applied and Environmental Microbiology*. **79** (10): 3185–3192

- ❖ Özçelik, S., Coşun, K., Yünlü, O., Alim, A. y Malatyali, E. 2012. The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*. **36**: 198-203.

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

- ❖ Peralta, R. M. y Ayala, O. J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Salud Uninorte*. **25** (2): 280-292.

- ❖ Pérez, A. R. 2004. *Ensayo Temático: “La Calidad del Agua en la Ciudad de México*.
<http://www.martha.org.mx/aldf/eventos/eventos/Ensayo%20Calidad%20del%20Agua.pdf>. (Consultado el 12 de mayo del 2013).

- ❖ Procuraduria Ambiental y del Ordenamiento Territorial (PAOT). 2010. *La Zona Metropolitana del Valle de México*.
<http://www.paot.org.mx/centro/sma/proaire/cap02.pdf>. (Consultado el 19 de octubre del 2012)

- ❖ 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. *Applied and Environmental Microbiology*. **64** (5): 1822-1824.

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

- ❖ Rositas-Noriega, F., Garza-Garza, R., Cortés-González, P., Rodríguez-Pérez, E., Morales, M., Salinas- Carmona, M., Medina de la Garza, C., Gómez- Sánchez, A. Hoyos- Pescador, R., Bonilla- Lemus, P. y Sáenz-Aguirre, C. 2006. Primer caso en un adulto de encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) por *Acanthamoeba* spp. en México. *Medicina Interna de México*. **22**(2): 175.

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

- ❖ Secretaria del Medio Ambiente (SMA). 2005. *Informe Climatológico Ambiental del Valle de México*.

http://www.sma.df.gob.mx/sma/download/archivos/informeclimatologico/05capitulo_1_2005.pdf. (Consultado el 13 de Mayo de 2013)

- ❖ Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2000. *Aguas Superficiales*.
http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/estadisticas_2000/naturaleza/estadistica-am/informe/acrobat/capitulo2-1-3.pdf. (Consultado el 22 de Mayo del 2013).
- ❖ Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2009. *Estadística del agua de la región hidrológica- administrativa XIII, aguas del Valle de México*. <http://www.conagua.gob.mx/CONAGUA07/Noticias/OCAVM-1-EAOCAVM2009.pdf>. (Consultado el 22 de mayo de 2013).
- ❖ Serra, G. P. 2003. *Estudio del biofilm: Formación y consecuencias*.
<http://www.adiveter.com/ftp/articles/A1070308.pdf>. (Consultado el 25 de septiembre de 2013)
- ❖ Shanmuganathan, V. y Khan, N. A. 2009. Presence of *Acanthamoeba* spp. in water purification plants in southern England. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. **2** (6): 40-42
- ❖ Shoff, M., Rogerson, A., Kessler, K., Schatz, S. y Seal, D. 2008. Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. *Journal of water and health*. **6** (1): 99-104.
- ❖ Siddiqui, R. y Khan, N. A. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & vectors*. **5** (6): 365-372
- ❖ Smirnov, A. V. y Brown, S. 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology*. **3** (3): 148-190.
- ❖ Thomas, V., Herrera-Rimann, K., Blanc, D. S. y Greub, G. 2006. Biodiversity of amoeba and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Environmental Microbiology*. **72** (4): 2428-2438.
- ❖ Thomas, V., Loret, J. F., Jousset, M. y Greub, G. 2008. Biodiversity of amoeba and amoeba-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environmental Microbiology*. **10** (10): 2728-2745.
- ❖ Thomas, V., McDonell, G. P., Denyer, S. y Maillard, J. 2009. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews*. **34**: 231-259.
- ❖ Thomas, J. y Ashbolt, N. 2011. Do free-living amoebae in treated drinking water systems present an emerging health risk?. *Environmental science & technology*. **45**(3): 860-869.

- ❖ Toderó, W. M., Caumo, K. y Brittes, R. M. 2011. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande. *Current Microbiology*. **63**: 464-469.
- ❖ Uribarren, B. T. 2011. *Naegleria, Acanthamoeba y Balamuthia*. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html>. (Consultado el 3 de febrero de 2012).
- ❖ Visvesvara, G. S. 2010. Review article: Free-Living Amebae as opportunistic agents of human disease. *Journal of Neuroparasitology*. **1**: 1-13.
- ❖ Visvesvara, G.S., Moura, H. y Schuster, F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, y *Sappinia diploidea*. *Federation of European Microbiological Societies*. **50**: 1-26
- ❖ Winięcka-Krusnell, J. y Linder, E. 2001. Bacterial infections of free-living amoebae. *Research in Microbiology*. **152** (7): 613-619.
- ❖ Xuan, Y. H., Chung, B. S., Hong, Y. C., Kong, H. H., Hahn, T. W. y Chung, D. 2008. Keratitis by *Acanthamoeba triangularis*: Report of cases and Characterization of isolates. *Korean Journal of Parasitology*. **46** (3): 157-164.
- ❖ Zhang, Y., Sun, X., Wang, Z., Li, R., Luo, S., Jin, X., Deng, S. y Chen, W. 2004. Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from patients with keratitis in north China. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. **45** (6): 1904-1907.

XII. ANEXOS

ANEXO I

Medio NNE (agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes*)

Reactivos:

- ❖ NaCl -----0.12g
- ❖ MgSO₄.7H₂O -----0.004g
- ❖ Na₂HPO₄ -----0.146g
- ❖ CaCl₂.2H₂O -----0.004g
- ❖ KH₂PO₄ -----0.136g
- ❖ Bactoagar -----15g
- ❖ Agua destilada -----1000mL

Procedimiento:

- ✓ Mezclar en seco todos los componentes, agregar primero 500mL y agitar hasta homogeneizar la solución, posteriormente aforar a 1L.
- ✓ Calentar hasta ebullición y disolver el agar.
- ✓ Esterilizar a 121°C durante 15 min.
- ✓ Verter en una placa Petri (15 a 20 mL).
- ✓ Al solidificar el agar, se coloca cuatro gotas de un cultivo puro de *Enterobacter aerogenes* inactivado por calor, se distribuye homogéneamente con un asa de vidrio estéril.
- ✓ Dejar reposar 1 hora aproximadamente.
- ✓ Guardar en el refrigerador de manera invertida.

ANEXO II

Medio PBSGM (Medio Chang)

Reactivos

- ❖ Peptona Biotriptasa ----- 16.6g
- ❖ Dextrosa ----- 2.7g
- ❖ Na₂HPO₄ ----- 1.5g
- ❖ KH₂PO₄ ----- 0.9g
- ❖ Agua destilada ----- 1000mL

Procedimiento:

- ✓ Mezclar en seco todos los componentes, agregar primero 500mL y agitar hasta homogeneizar la solución, posteriormente aforar a 1L.
- ✓ Colocar 2.7mL de medio en tubos de vidrio con tapón de rosca.
- ✓ Esterilizar a 121°C durante 15 min.
- ✓ Frio el medio, se agrega 0.3mL de suero fetal de ternera adicionada con antibiótico.
- ✓ Poner en refrigeración.

ANEXO III

MODIFICACION a la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización.

CARACTERISTICA	LÍMITE PERMISIBLE
Organismos coliformes totales	Ausencia o no detectables
<i>E. coli</i> o coliformes fecales u organismos termotolerantes	Ausencia o no detectables

4.1.4 El agua abastecida por los sistemas de distribución no debe contener *E. coli* o coliformes fecales u organismos termotolerantes en ninguna muestra de 100mL. Los organismos coliformes totales no deben ser detectables en ninguna muestra de 100mL; en sistemas de abastecimiento de localidades con una población mayor a 50'000 habitantes; estos organismos deberán estar ausentes en el 95% de las muestras tomadas en un mismo sitio de la red de distribución, durante un periodo de 12 meses de un mismo año.

CARACTERISTICA	LIMITE PERMISIBLE
Cloro libre residual	0.2 - 1.50
pH	6.5 - 8.5

ANEXO IV

Cuadro 6. Registro de especies identificadas en el presente estudio

Número de Muestra	Lugar	Especies de <i>Acanthamoeba</i>	Otras especies registradas
1	Tlalpan	<i>griffini</i> <i>culbertsoni</i> <i>castellanii</i> <i>polyphaga</i> <i>triangularis</i> <i>astronyxis</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas)	
2	Ecatepec		<i>Naegleria</i> sp. <i>Vahlkampfia</i> sp.
3	Ecatepec		<i>Naegleria</i> sp. <i>Vahlkampfia</i> sp.
4	Nicolás Romero		<i>Naegleria</i> sp. <i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia</i> sp.
5	Nicolás Romero		<i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Naegleria</i> sp.
6	Atizapán		<i>Sappinia</i> sp. <i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Hartmannella</i> sp. <i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria gruberi</i>
7	Atizapán		<i>Naegleria gruberi</i> <i>Naegleria</i> sp. <i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Hartmannella</i> sp.
8	Naucalpan	Negativo	Negativo
9	Naucalpan	Negativo	Negativo
10	Cuajimalpa		<i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria</i> sp.
11	Cuajimalpa	<i>rhyodes</i> <i>triangularis</i> <i>quina</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>castellanii</i>	<i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Rhizamoeba</i> sp. <i>Naegleria gruberi</i> .
12	Iztacalco	<i>culbertsoni</i> <i>polyphaga</i> <i>triangularis</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>rhyodes</i>	
13	Iztacalco	<i>culbertsoni</i> <i>triangularis</i>	<i>Naegleria gruberi</i>

		<i>castellanii</i> <i>rhyodes</i>	
14	Amecameca		<i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Platyamoeba</i> sp. <i>Vannella</i> sp. <i>Amoeba</i> sp.
15	Amecameca	Negativo	Negativo
16	Cuauhtémoc	Negativo	Negativo
17	Cuauhtémoc		<i>Naegleria gruberi</i> <i>Naegleria</i> sp. <i>Rosculus ithacus</i> <i>Vahlkampfia</i> sp.
18	Miguel Hidalgo	Negativo	Negativo
19	Miguel Hidalgo		<i>Vexillifera</i> sp.
20	Azcapotzalco	sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>rhyodes</i>	<i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria gruberi</i>
21	Azcapotzalco		<i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria</i> sp.
22	Teoloyucan		<i>Vahlkampfia aberdonica</i> <i>Vahlkampfia enterica</i> <i>Naegleria gruberi</i>
23	Iztapalapa	Negativo	Negativo
24	Iztapalapa	Negativo	Negativo
25	Álvaro Obregón		<i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria gruberi</i> <i>Naegleria</i> sp. <i>Hartmannella</i> sp.
26	Álvaro Obregón		<i>Naegleria gruberi</i> <i>Naegleria</i> sp.
27	Valle de Chalco	<i>castellanii</i> <i>polyphaga</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>rhyodes</i> <i>triangularis</i>	<i>Naegleria gruberi</i>
28	Valle de Chalco	Negativo	Negativo
29	Tepetlixpa	Negativo	Negativo
30	Tepetlixpa	<i>triangularis</i> <i>polyphaga</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>rhyodes</i> <i>astronyxis</i>	
31	Jilotzingo	sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>castellanii</i> <i>culbertsoni</i> <i>triangularis</i>	

		<i>polyphaga</i>	
32	Jilotzingo		<i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia</i> sp.
33	Huixquilucan	sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>rhysoles</i> <i>polyphaga</i> <i>astronyxis</i>	<i>Naegleria</i> sp.
34	Huixquilucan	Negativo	Negativo
35	Huehuetoca	<i>rhysoles</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>polyphaga</i>	<i>Naegleria</i> sp.
36	Coacalco	<i>polyphaga</i> <i>rhysoles</i>	<i>Naegleria gruberi</i> <i>Rosculus ithacus</i>
37	Coacalco		<i>Rosculus ithacus</i>
38	Tultitlan	<i>polyphaga</i> <i>rhysoles</i> <i>triangularis</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas)	
39	Tultitlan		<i>Willaertia magna</i>
40	Otumba		<i>Naegleria</i> spp. <i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria gruberi</i>
41	Otumba	-----	-----
42	Venustiano Carranza	-----	-----
43	Coyoacán		<i>Platyamoeba</i> sp.
44	Coyoacán	-----	-----
45	Tlalmanalco	<i>rhysoles</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>polyphaga</i>	<i>Naegleria</i> sp. <i>Naegleria gruberi</i> <i>Rosculus ithacus</i>
46	Tlalmanalco	<i>rhysoles</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>polyphaga</i> <i>astronyxis</i> <i>culbertsoni</i>	<i>Amoeba</i> sp.
47	Tlalnepantla	-----	-----
48	Tlalnepantla	<i>astronyxis</i> <i>rhysoles</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>polyphaga</i>	<i>Echinamoeba</i> sp.
49	Cuautitlán	<i>triangularis</i> <i>rhysoles</i> <i>polyphaga</i> sp. (no descrita en	<i>Rosculus ithacus</i> <i>Vahlkampfia inornata</i> <i>Vahlkampfia ustiana</i>

		claves taxonómicas) <i>castellanii</i>	
50	Cuautitlán		<i>Naegleria</i> sp. <i>Naegleria gruberi</i>
51	Tláhuac	Negativo	Negativo
52	Tláhuac		<i>Naegleria gruberi</i>
53	Gustavo A. Madero	<i>rhyodes polyphaga astronyxis</i>	<i>Vahlkampfia ustiana</i>
54	Gustavo A. Madero	Negativo	Negativo
55	Xochimilco	sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>rhyodes</i>	<i>Naegleria gruberi</i> <i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria</i> spp. <i>Vahlkampfia ustiana</i>
56	Xochimilco	<i>rhyodes astronyxis</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas)	<i>Naegleria gruberi</i>
57	Juchitepec		<i>Vahlkampfia enterica</i>
58	Juchitepec	<i>triangularis polyphaga</i> sp. (no descrita en claves taxonómicas)	<i>Stachyamoeba lipophora</i> <i>Vahlkampfia avara</i> <i>Naegleria angularis</i> <i>Naegleria gruberi</i>
59	Temamatla	<i>polyphaga triangularis</i>	<i>Rosculus ithacus</i> <i>Vahlkampfia entérica</i> <i>Naegleria gruberi</i>
60	Temamatla		<i>Rosculus ithacus</i> <i>Vahlkampfia enterica</i>
61	Acolman		<i>Willaertia magna</i> <i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia</i> sp.
62	Acolman		<i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia</i> sp.
63	Ixtapaluca		<i>Amoeba</i> sp.
64	Ixtapaluca		<i>Rosculus ithacus</i>
65	Ozumba	sp. (no descrita en claves taxonómicas) <i>rhyodes astronyxis</i>	
66	Ozumba		<i>Naegleria gruberi</i>
67	Benito Juárez		<i>Rosculus ithacus</i> <i>Vannella</i> sp.
68	Benito Juárez		<i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria gruberi</i>
69	Cuautitlán Izcalli	<i>polyphaga</i>	<i>Naegleria gruberi</i> <i>Willaertia magna</i> <i>Vahlkampfia enterica</i>
70	Cuautitlán Izcalli	<i>polyphaga</i>	<i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia enterica</i>

71	Tepotztlán		<i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria gruberi</i>
72	Tepotztlán	Negativo	Negativo
73	Nezahualcóyotl		<i>Naegleria gruberi</i>
74	Nezahualcóyotl		<i>Naegleria gruberi</i>
75	Tecámac	Negativo	Negativo
76	Tecámac	Negativo	Negativo
77	Zumpango		<i>Rosculus ithacus</i>
78	Zumpango	Negativo	Negativo
79	Teotihuacán		<i>Vahlkampfia entérica</i> <i>Naegleria gruberi</i>
80	Teotihuacán		<i>Naegleria gruberi</i> <i>Rosculus ithacus</i>
81	Tultepec		<i>Vannella</i> sp <i>Naegleria gruberi</i>
82	Magdalena Contreras		<i>Naegleria</i> sp. <i>Vannella platypodia</i>
83	Magdalena Contreras	Negativo	Negativo
84	Milpa Alta		<i>Naegleria</i> sp. <i>Vahlkampfia avara</i> <i>Willaertia magna</i>
85	Milpa Alta		<i>Naegleria</i> sp. <i>Rhizamoeba</i> sp.