



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**DETECCIÓN DE AMIBAS DE VIDA LIBRE EN QUIRÓFANOS  
DE HOSPITALES DEL ESTADO DE OAXACA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MARIANA PAREDES TÉLLEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**D EN C ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA**



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

*Dedico este trabajo:*

*A mis padres, Norma Téllez Rosas y Ernesto Paredes de la Cruz, los  
amo inmensamente.*

*Al profesor Arturo Calderón Vega, gracias por todas sus  
enseñanzas.*

*A Antonio Paredes Zafra, por todos los sueños que no alcanzaste a  
cumplir.*

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a mis padres; Mamá sabes que sin ti esto no hubiera sido posible gracias por ser mi apoyo, por enseñarme a luchar por mis sueños y a esforzarme a mejorar día con día, sabes que eres la mujer que más admiro, que valoro todos los sacrificios que has hecho por y para mí, que eres mi mayor ejemplo a seguir, gracias por ser la mejor madre y mi mejor amiga; Papá eres la persona a la que más respeto y admiro gracias por todas las enseñanzas y por todos valores que me has inculcado, sin ti no podría ser la persona que hoy soy, gracias por siempre creer en mí y por exigirme cada día un poco más ¡LOS AMO!

A mis hermanos, por creer en mí y apoyarme en todo, y a mis sobrinos Fabiola y Pablo, los quiero con toda mi alma y mi ser, gracias por ser mi inspiración y por llenar todos mis días de inmensa alegría, por motivarme a intentar ser una mejor persona y a tratar de ser un buen ejemplo para ustedes. Quiero agradecer en especial a toda mi familia, no puedo mencionar a todos porque somos una familia muy extensa pero todos me han dado su apoyo y siempre han estado ahí cuando los necesito.

A la Dra. Elvia Gallegos directora de esta tesis, por la paciencia y confianza que ha tenido conmigo, por todas sus enseñanzas, por ser siempre tan linda persona y por toda la felicidad que siempre transmite en el laboratorio pese a todas las adversidades que ha enfrentado ¡la quiero mucho Doctora! y especialmente quiero agradecer al Dr. Arturo Calderón que lamentablemente ahora no está con nosotros pero que desde mi primer día en el laboratorio me brindo su confianza, gracias por compartir su experiencia y conocimiento conmigo, siempre admiré la dedicación hacia su trabajo y el gran amor que tenía por la Biología y la investigación. Agradezco infinitamente haberlos tenido como asesores.

A mi comité de evaluación, por tomarse el tiempo de revisar este trabajo y por las recomendaciones que me hicieron: Doctora Rosario, Maestra Dolores, Bióloga Blanca Nieves y Maestra Ángeles Sanabria.

A todos mis amigos, por hacerme tan amena mi estancia en la FES y por alegrarme la vida: Gaby, Pao, Lucy, Miranda, Monse las quiero infinitamente y también a todo el CON EL PERRO GRUPO URBANO: Migue (Andrade y García), Lalo, Hiram, Fili, Majo, muchachos sin ustedes la vida sería demasiado tranquila y aburrida gracias por todos esos momentos de carcajadas y esas prácticas de campo tan inolvidables. También a aquellos amigos que han permanecido conmigo desde aquellos años CCHeros a pesar de la distancia y la dificultad para vernos: Erick ¡al fin lo logré! Gracias por siempre escucharme, por aguantar todos mis problemas y por ser como un hermano para mí, Arturo y Oscar gracias por sus buenos y malos consejos, por siempre cuidarme y estar ahí cuando más los necesito, no saben cuánto los quiero.

Y a todas las personas que por ciertos motivos han salido de mi vida pero que en su paso me brindaron apoyo y momentos de felicidad y a aquellas personas especiales que acaban de entrar en mi vida y espero que permanezcan ahí por mucho tiempo. Gracias a todos.

*Lo conocido es finito, lo desconocido infinito;*

*desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla*

*en medio de un océano ilimitable de inexplicabilidad.*

*Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra.*

*T. H. HUXLEY*

## CONTENIDO

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	2
1. Definición de protozoos.....	2
2. Amibas de vida libre.....	2
2.1 Taxonomía de las amibas de vida libre.....	3
2.2 Ecología.....	4
3. Géneros patógenos de amibas de vida libre.....	5
3.1 <i>Acanthamoeba</i> spp.....	6
3.2 <i>Naegleria fowleri</i> .....	10
4. Otros géneros amibianos patógenos .....	13
4.1 <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	13
4.2 <i>Sappinia diploidea</i> .....	14
4.3 <i>Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis</i> y <i>Vahlkampfia</i> spp.....	15
5. Infecciones intrahospitalarias.....	16
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	18
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	22
1. Objetivo general.....	22
2. Objetivos particulares.....	22
<b>VI. ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	23
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	25
1. Recolecta de muestras .....	25
2. Registro de parámetros fisicoquímicos .....	25
3. Aislamiento de amibas de vida libre.....	26
4. Clonación de morfotipos .....	26
5. Identificación morfológica de las AVL .....	27
6. Registro fotográfico .....	27
7. Prueba de flagelación .....	27
8. Pruebas de tolerancia a la temperatura .....	28
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	29
1. Aislados amibianos .....	29
2. Riqueza específica de AVL .....	32

3. Riqueza específica de AVL por hospitales .....	33
4. Frecuencia de especies de AVL .....	35
5. Identificación morfológica, descripción y registro fotográfico .....	37
a) Género: <i>Acanthamoeba</i> .....	37
b) Género: <i>Naegleria</i> .....	41
c) Género: <i>Vahlkampfia</i> .....	43
d) Género: <i>Hartmannella</i> .....	45
e) Género: <i>Vermamoeba</i> .....	46
f) Género: <i>Vannella</i> .....	47
g) Género: <i>Thecamoeba</i> .....	50
h) Género: <i>Saccamoeba</i> .....	51
i) Género: <i>Rhizamoeba</i> .....	52
j) Género: <i>Platyamoeba</i> .....	53
k) Género: <i>Rosculus</i> .....	54
l) Género: <i>Sappinia</i> .....	55
m) Género: <i>Paratetramitus</i> .....	56
6. Prueba de tolerancia a temperatura.....	57
7. Parámetros fisicoquímicos del agua .....	59
a) Temperatura .....	59
b) pH.....	60
c) Cloro libre residual.....	61
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>63</b>
<b>IX. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>64</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>65</b>
<b>XII. ANEXOS</b> .....	<b>75</b>

## CONTENIDO DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Esquema de clasificación de los géneros potencialmente patógenos de AVL .....	4
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	8
<b>Figura 3.</b> Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i> .....	11
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>Balamuthia mandrillaris</i> . ....	14
<b>Figura 5.</b> División regional del estado de Oaxaca .....	23
<b>Figura 6.</b> Diversidad de géneros amibianos .....	30
<b>Figura 7.</b> Distribución de los aislados positivos en cada una de las áreas muestreadas en los quirófanos .....	32
<b>Figura 8.</b> Riqueza específica por hospital y por área de quirófano .....	34
<b>Figura 9.</b> Frecuencia de los aislados amibianos identificados .....	36
<b>Figura 10.</b> Quiste de <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> . ....	37
<b>Figura 11.</b> Trofozoíto y quiste de <i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	38
<b>Figura 12.</b> Quiste de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> . ....	39
<b>Figura 13.</b> Quiste de <i>Acanthamoeba palestinensis</i> .....	40
<b>Figura 14.</b> Quiste de <i>Acanthamoeba triangularis</i> . ....	40
<b>Figura 15.</b> Trofozoíto y quiste de <i>Naegleria gruberi</i> . ....	42
<b>Figura 16.</b> Trofozoíto y quiste de <i>Vahlkampfia</i> sp. ....	44
<b>Figura 17.</b> Trofozoíto y quiste de <i>Hartmannella cantabrigiensis</i> . ....	45
<b>Figura 18.</b> Trofozoíto de <i>Vermamoeba vermiformis</i> . ....	46
<b>Figura 19.</b> Trofozoíto y forma flotante de <i>Vannella mira</i> . ....	48
<b>Figura 20.</b> Trofozoíto y forma flotante de <i>Vannella platypodia</i> . ....	49
<b>Figura 21.</b> Trofozoíto de <i>Thecamoeba similis</i> . ....	50
<b>Figura 22.</b> Trofozoíto de <i>Saccamoeba</i> sp. ....	51
<b>Figura 23.</b> Trofozoíto de <i>Rhizamoeba</i> sp. ....	52
<b>Figura 24.</b> Descripción de <i>Platyamoeba</i> sp. ....	53
<b>Figura 25.</b> Quiste de <i>Rosculus ithacus</i> . ....	54
<b>Figura 26.</b> Trofozoítos de <i>Sappinia</i> sp. ....	55
<b>Figura 27.</b> Quiste de <i>Paratetramitus jugosus</i> . ....	56
<b>Figura 28.</b> Porcentaje de aislados amibianos que crecieron a 25 y 45 °C. ....	58

<b>Figura 29.</b> Frecuencia de aislados amibianos con crecimiento a 45 °C .....	58
<b>Figura 30.</b> Valores registrados de temperatura y número de aislados positivos por hospital en cada región del estado de Oaxaca .....	60
<b>Figura 31.</b> Valores registrados de pH y número de aislados positivos por hospital en cada región.....	61
<b>Figura 32.</b> Valores registrados de cloro y número de aislados positivos por hospital en cada región .....	62

### CONTENIDO DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Hospitales pertenecientes a las regiones muestreadas.....	24
<b>Cuadro 2.</b> Presencia de AVL en los diferentes hospitales y áreas de quirófanos muestreadas.....	29
<b>Cuadro 3.</b> Riqueza específica en los diferentes sitios de muestreo.....	32
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación taxonómica de <i>Acanthamoeba</i> .....	37
<b>Cuadro 5.</b> Clasificación taxonómica de <i>Naegleria</i> .....	41
<b>Cuadro 6.</b> Clasificación taxonómica de <i>Vahlkampfia</i> .....	43
<b>Cuadro 7.</b> Clasificación taxonómica de <i>Hartmannella</i> .....	45
<b>Cuadro 8.</b> Clasificación taxonómica de <i>Vermamoeba</i> .....	46
<b>Cuadro 9.</b> Clasificación taxonómica de <i>Vannella</i> .....	47
<b>Cuadro 10.</b> Clasificación taxonómica de <i>Thecamoeba</i> .....	50
<b>Cuadro 11.</b> Clasificación taxonómica de <i>Saccamoeba</i> .....	51
<b>Cuadro 12.</b> Clasificación taxonómica de <i>Rhizamoeba</i> .....	52
<b>Cuadro 13.</b> Clasificación taxonómica de <i>Platyamoeba</i> .....	53
<b>Cuadro 14.</b> Clasificación taxonómica de <i>Sappinia</i> .....	55

## I. RESUMEN

Los quirófanos de hospitales son áreas de especial interés pues los pacientes que ingresan son individuos inmunocomprometidos lo que aumenta el riesgo de contraer una infección por amibas de vida libre oportunistas. En México el estudio de las AVL en hospitales es escaso, por ello este estudio tuvo como objetivo identificar las AVL presentes en los quirófanos de hospitales del estado de Oaxaca.

Se tomaron muestras de diferentes nosocomios del estado de Oaxaca de acuerdo a la división regional, fueron colectadas de diferentes áreas de los quirófanos (agua y biopelícula de lavabo, polvo de instrumental quirúrgico y mesa de cirugía), se obtuvieron 18. 75 % positivas, de las cuales se aislaron 12 géneros amibianos: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella*, *Vannella*, *Thecamoeba*, *Saccamoeba*, *Rhizamoeba*, *Platyamoeba*, *Rosculus*, *Sappinia* y *Paratetramitus*. *Acanthamoeba* fue el género predominante obteniéndose en un 25 % de los aislados.

Entre las especies de importancia médica que fueron aisladas se encuentran: *Acanthamoeba culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. palestinensis*, *A. triangularis*, *Naegleria* sp. y *Sappinia* sp.

La mayoría de las muestras positivas fueron provenientes de la biopelícula del lavabo (57 %) y del agua de lavabo (36 %), aunque también se encontró contaminación biológica en las mesas de cirugía (7 %).

En conclusión, la presencia de AVL potencialmente patógenas en los quirófanos es un hecho que debe ser tomado en cuenta ya que representa un riesgo para los pacientes que ingresan a los hospitales, por ello deben seguirse estrictamente las indicaciones de desinfección y limpieza de estas áreas sanitarias, así como las normas oficiales ya estipuladas para la prevención de infecciones intrahospitalarias, asimismo se recomienda continuar con el estudio de las AVL en otros hospitales del país.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Definición de protozoos

Los protozoos son organismos eucariontes unicelulares que presentan múltiples formas y tamaños y en su mayoría son microscópicos. Su movimiento es por medio de flagelos, cilios o pseudópodos, su reproducción es asexual (fisión binaria, fisión múltiple y gemación) (Sigala, 2008). Cada célula protozoaria funciona como una entidad independiente y lleva a cabo todos los procesos esenciales de la vida que ocurren en organismos metazoarios, aunque a un nivel menos sofisticado. En lugar de tejidos u órganos, encontramos organelos desarrollados para llevar a cabo estas funciones elementales (Laybourn, 1984). Debido a la gran diversidad de organismos que conforman este grupo, es posible encontrarlos en casi todo tipo de hábitats, muchos son parásitos del hombre y de otros organismos (Cortés, 2010).

El papel de los protozoos de vida libre es ampliamente reconocido, la depredación que llevan a cabo tiene un efecto significativo en el control de poblaciones bacterianas en suelo, contribuyen al mantenimiento de la fertilidad del suelo, debido a que juegan una parte integral en el ciclo de nutrientes en las cadenas tróficas acuáticas (Barker y Brown, 1994).

### 2. Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos de distribución cosmopolita que habitan ambientes húmedos como el suelo y el agua, aunque también se pueden encontrar en el aire, vehículo que utilizan como medio de dispersión (Bonilla *et al.*, 2004). También pueden ser encontradas en unidades de aire acondicionado, lentes de contacto, soluciones limpiadoras de ojos y unidades de tratamiento dental (Trabelsi *et al.*, 2012), así como en biopelículas en varias superficies y sustratos, ya que las biopelículas proporcionan alimento y protección a las AVL, las cuales se adhieren como trofozoítos en las superficies (Scheid, 2014).

La palabra amiba se deriva del griego *amoibe*, que significa “cambio”, refiriéndose al constante cambio de forma que presentan estos organismos (García, 2011). Las

amibas poseen una membrana plasmática y los orgánulos celulares pueden ser distinguidos en el citoplasma. En las áreas periféricas y centrales del citoplasma se observa el hialinoplasma y el granuloplasma, el primero es transparente y fluido y el segundo tiene una apariencia granular y usualmente es más rígido, este se encuentra en estado coloidal y en él se localizan el núcleo, cristales y los orgánulos citoplasmáticos. En la locomoción de las amibas se lleva a cabo mediante proyecciones del citoplasma llamadas pseudópodos, además la mayoría de las amibas pueden formar sub-pseudópodos los cuáles no forman parte de la locomoción, tal es el caso de los organismos pertenecientes al género *Acanthamoeba*, los cuales forman pseudópodos llamados “acantópodos” (Smirnov y Brown, 2004).

Las AVL patógenas y oportunistas como: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* y *Sappinia diploidea* son protistas eucariontes, aerobios, mitocondriados que potencialmente pueden causar infecciones en humanos y otros animales. Se les conoce con el término de organismos anfizóicos debido a que tienen la habilidad de existir como organismos de vida libre en la naturaleza y solo ocasionalmente invaden un hospedador en el cual viven como parásitos dentro del tejido (Visvesvara *et al.*, 2007).

## **2.1 Taxonomía de las amibas de vida libre**

La clasificación taxonómica clásica divide a los Protozoos en cuatro grupos: Sarcodina (amibas), Mastigophora (flagelados), Sporozoa (la mayoría de protozoos parásitos) e Infusoria (ciliados). Esta taxonomía ha sido totalmente reemplazada por la Sociedad Internacional de Protozoólogos por una nueva basada en características morfológicas, vías bioquímicas y filogenética molecular. De acuerdo a este nuevo esquema, los Eucariotes han sido clasificados en cinco grupos o “Súper Grupos”, llamados: Amoebozoa, Opisthokonta, Archaeplastida, Excavata y Sar (Stramenopila, Alveolata y Rhizaria) (Adl *et al.*, 2012).

En base a este esquema los cuatro géneros patógenos han sido clasificados bajo dos “Súper Grupos”, Amoebozoa y Excavata, de la siguiente manera:

*Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia* fueron clasificados en el Súper Grupo Amoebozoa; *N. fowleri* en el Súper Grupo Excavata (Fig. 1).

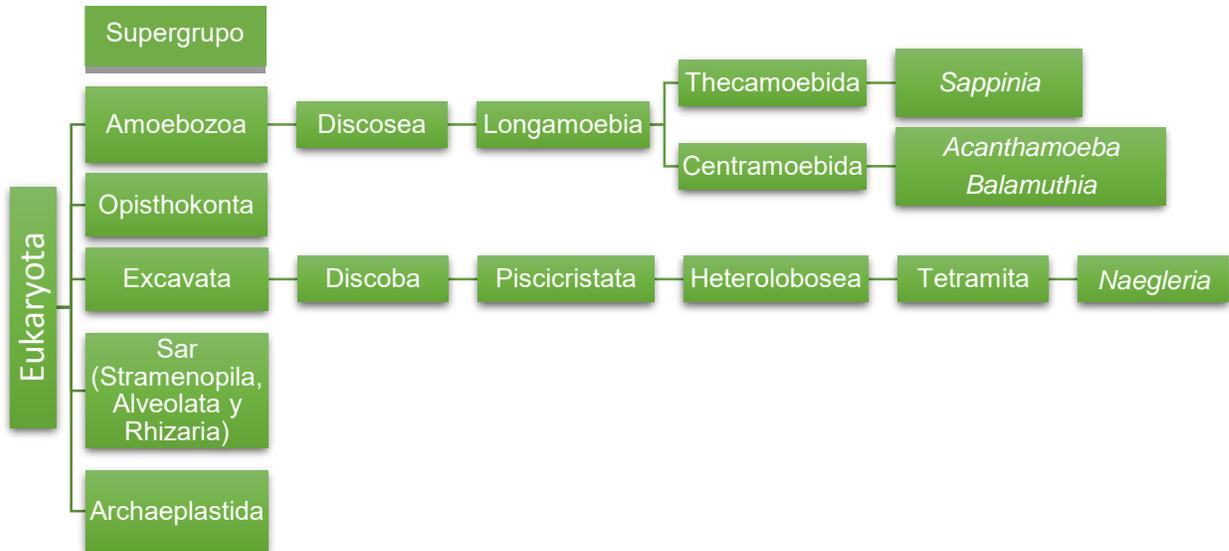


Figura 1. Esquema de clasificación de los géneros potencialmente patógenos de AVL de acuerdo a la clasificación de Eucariontes de Adl et al., 2012.

## 2.2 Ecología

Como se mencionó anteriormente las AVL son protozoos cosmopolitas, en los ecosistemas acuáticos desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento del flujo de energía y el reciclado de nutrientes. Debido a su eficiencia en el uso de los recursos son un enlace fundamental entre los organismos desintegradores y aquellos que pertenecen a niveles tróficos superiores (Bonilla et al., 2004).

Las temperaturas extremas a las cuales las AVL pueden sobrevivir están por debajo de los 4 °C y algunas pueden sobrevivir a temperaturas mayores de 45 °C. Generalmente las especies patógenas son termotolerantes aunque no todas las termotolerantes son patógenas. Los cuerpos de agua que tienen temperaturas estables por arriba de los 35 °C son lugares ideales para la sobrevivencia y el desarrollo de las especies patógenas. Así los cuerpos de agua contaminada térmicamente ofrecen un lugar abundante en materia orgánica, libre de

competencia y con nula depredación, ambiente que puede compararse con el cerebro de los vertebrados, en donde las amibas encuentran un ambiente con temperatura estable, abundante alimento, libre de competencia y con escasa presión depredadora por parte de los mecanismos de defensa (Gallegos, 1997).

El intervalo de pH que las amibas pueden soportar está entre 5.5 y 8.6. Solamente las especies del género *Acanthamoeba* son tolerantes a los cambios de salinidad en el agua cuando están en su forma trófica y el quiste es resistente a niveles de cloro de hasta 2 ppm (Gallegos, 1997). Por otra parte algunas especies pertenecientes al género *Naegleria* viven principalmente en el suelo y ambientes acuáticos calentados natural o artificialmente, aunque también han sido aislados de agua de grifo, piscinas, aguas termales y de desecho, canales de riego, tinas de hidroterapia, lagos artificiales y efluentes calientes de plantas termoeléctricas. Los factores ambientales favorables para este género son rangos de temperatura entre 30 y 45 °C, niveles óptimos de oxígeno, pH cercano a la neutralidad, alimento suficiente y un mínimo de humedad (Bonilla *et al.*, 2004).

### **3. Géneros patógenos de amibas de vida libre**

Entre las amibas de vida libre, solo cuatro géneros (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia*) son responsables de causar infecciones en humanos y otros animales (Schuster y Visvesvara, 2004). *Acanthamoeba* spp. se han asociado a enfermedades en humanos, como la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), lesiones cutáneas, infecciones nasofaríngeas, pulmonares y en riñón, principalmente en pacientes inmunocomprometidos; también causa queratitis amibiana (QA) en personas inmunocompetentes. *Balamuthia mandrillaris*, una especie relacionada filogenéticamente con *Acanthamoeba*, causa infecciones en la piel, pulmones y una EAG fatal principalmente en niños inmunocomprometidos. *Naegleria fowleri* causa una meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) en niños sanos y adultos jóvenes con antecedentes de natación en aguas calentadas natural o artificialmente. *Sappinia diploidea* ha sido

reportada, solo una vez, de un cerebro infectado en un hombre sano (Trabelsi *et al.*, 2012).

Las AVL también pueden ser hospederas de bacterias patógenas intracelulares (Huws *et al.*, 2008), tal es el caso de *Legionella pneumophila* la cual ha mostrado multiplicarse en 14 especies de amibas. *Legionella* es un parásito intracelular de protozoos de agua dulce y usa un mecanismo similar para multiplicarse dentro de las células de mamíferos, esta bacteria causa enfermedades respiratorias en humanos cuando un hospedero susceptible inhala aerosoles o aspira agua con contenido bacteriano; se considera que la infección de las células fagocíticas humanas es oportunista cuando los protozoos que funcionan como hospederos naturales de *Legionella* invaden el cuerpo (Fields *et al.*, 2002). Una vez que la bacteria es fagocitada por la amiba, *Legionella* se multiplica dentro del citoplasma, evadiendo el ataque lisosomal del hospedero, de modo que después de 36-48 horas una sola vesícula llena de legionelas móviles ocupa la mayor parte de la célula amibiana. El efecto final de la infección es la lisis de la célula y la liberación de muchas bacterias móviles en el ambiente (Barker y Brown, 1994).

### **3.1 *Acanthamoeba* spp.**

*Acanthamoeba* es el protozoo que se encuentra con mayor frecuencia en el ambiente. Ha sido aislado de suelo, aire, agua tratada y natural, agua de mar, albercas, aguas residuales, sedimentos, unidades de aire acondicionado, plantas de tratamiento de agua potable, unidades dentales, hospitales, unidades de diálisis y lentes de contacto (Marciano y Cabral, 2003). El factor principal en la distribución de *Acanthamoeba* en agua y suelo es la presencia de un suministro de alimento disponible. El agua cálida podría mejorar su crecimiento, particularmente aquellas cepas que son termotolerantes, sin embargo, las amibas se encuentran en un amplio ámbito de temperatura, salinidad y pH. Las cepas infectivas de *Acanthamoeba* spp. en humanos pueden ser capaces de sobrevivir a 37 °C y a temperaturas un poco más elevadas que la temperatura del cuerpo (Schuster y Visvesvara, 2004).

Las amibas de vida libre pertenecientes al género *Acanthamoeba* son los agentes causales de encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), una enfermedad fatal del sistema nervioso central (SNC), y queratitis amibiana (QA), una enfermedad dolorosa que pone en peligro la visión. *Acanthamoeba* spp. también ha sido asociada con acantamebiosis cutánea en pacientes con virus de inmunodeficiencia humana y síndrome de deficiencia inmune adquirido (VIH/SIDA), sinusitis y en otros individuos inmunocomprometidos (Marciano y Cabral, 2003).

El género *Acanthamoeba* se compone de 24 especies de acuerdo a su morfología, sin embargo por inconsistencias en esta clasificación, este género ha sido clasificado en 20 genotipos en función de la secuencia de la subunidad 18s del ARNr: T1-T20 (Cabello, 2015). Alrededor del 90 % de los aislados de *Acanthamoeba* que han sido asociados a la queratitis amibiana y que provienen de diferentes áreas geográficas han sido descritos como genotipo T4. El genotipo T4 también es predominante en infecciones como EAG; pero también se ha demostrado en esta patología la presencia de otros genotipos implicados: T1, T2, T5, T7, T10 y T12, sin embargo actualmente no está claro porque los aislamientos del genotipo T4 son más abundantes en infecciones en seres humanos, pero es probable que se deba a su mayor virulencia y propiedades que mejoran su transmisibilidad, así como su menor sensibilidad a agentes terapéuticos (Nuprasert *et al.*, 2010; Cabello, 2015). Algunas de las especies que han sido asociadas con infecciones humanas son: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. astroonyxix*, *A. divionensis*, *A. rhysodes*, *A. griffinni*, *A. triangularis*, *A. ludgunensis* y *A. polyphaga* (Schuster y Visvesvara, 2004).

### **Ciclo de vida y morfología**

*Acanthamoeba* spp. tiene dos estadios durante su ciclo de vida: una etapa de trofozoíto o vegetativa (8-40  $\mu\text{m}$ ) y una etapa de quiste o latente (8-29  $\mu\text{m}$ ) (Fig. 2). La morfología del trofozoíto se caracteriza por la presencia de un núcleo simple y unos acantopodios finos proyectándose hacia el exterior de la superficie del cuerpo. Los acantopodios permiten al parásito adherirse a las superficies, tener

movimientos celulares y capturar a las presas. El trofozoíto se alimenta de bacterias, algas o partículas pequeñas de materia orgánica. El quiste es la forma infecciosa e invasiva y puede sobrevivir mucho tiempo en condiciones ambientales adversas (escasez de alimento, valores de pH y temperatura extremos, incrementos de osmolaridad, etc.) y diferenciarse en un quiste uninucleado con una estructura de doble pared (endo y ectoquiste). Esta forma resistente posee poros, los cuales son usados para monitorear los cambios ambientales ya que con el regreso de las condiciones óptimas las amibas desenquistan para dar lugar a trofozoíto (Trabelsi *et al.*, 2012).

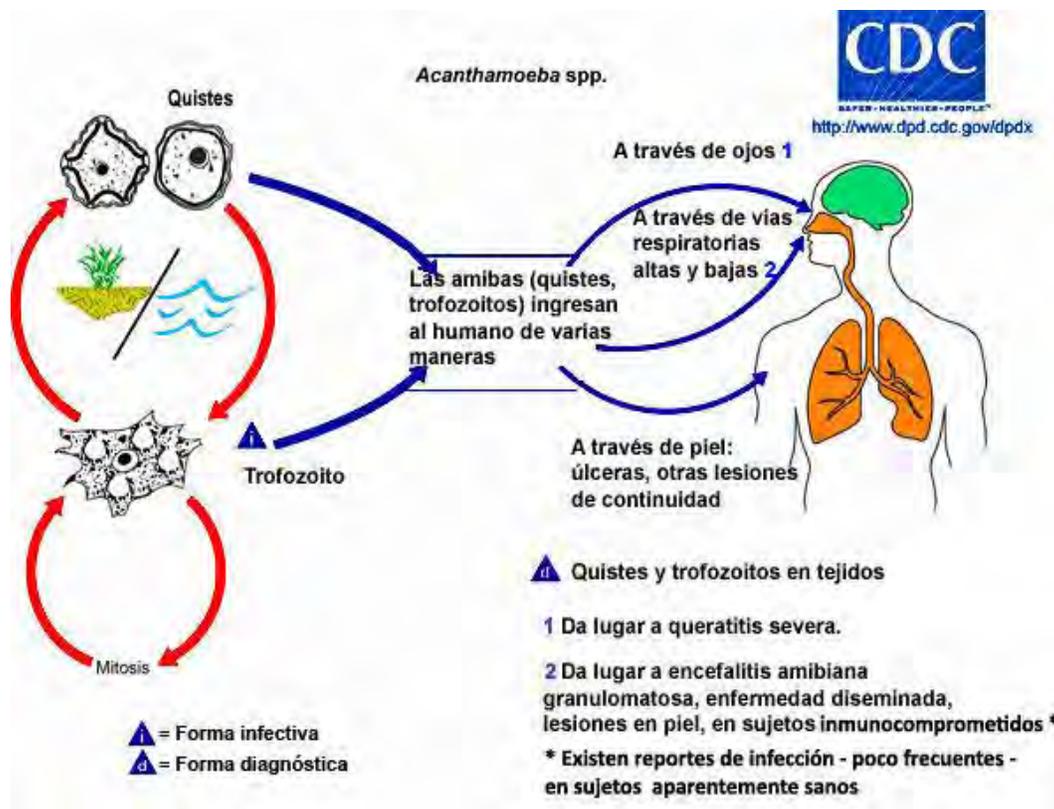


Figura 2. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. (CDC, 2013).

Morfológicamente el género *Acanthamoeba* se divide en tres grupos, que se distinguen uno de otro por las diferencias en la morfología del quiste. El grupo I tiene quistes grandes (18  $\mu\text{m}$  o más) con endoquistes estrellados y ectoquistes lisos o arrugados; el grupo II tiene quistes pequeños (menores de 18  $\mu\text{m}$ ) con

endoquistes poliédricos, globulares, ovoides o estrellados y ectoquistes ondulados; el grupo III tiene quistes menores a 19 µm con endoquistes globulares u ovoides y ectoquistes lisos u ondulados. El grupo II el más abundante en la naturaleza e incluye muchos de los aislados más comunes y especies potencialmente patógenas como: *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga* (Schuster y Visvesvara, 2004).

## **Importancia médica**

### **Encefalitis amibiana granulomatosa**

La EAG es una enfermedad oportunista fatal, que afecta individuos inmunocomprometidos o debilitados (pacientes particulares con VIH/SIDA, diabetes, o que han sido sometidos a trasplante de órganos) (Trabelsi *et al.*, 2012). Aunque el período de incubación de las infecciones de *Acanthamoeba* spp. es desconocido, varias semanas o meses pueden ser necesarios para establecer los signos clínicos. La ruta de infección es mediante la inhalación de las amibas a través de los conductos nasales y pulmones o introduciéndose a través de las lesiones en la piel. El acceso al SNC puede ser por propagación hematógena desde un sitio primario en los pulmones, piel o directamente a través del neuroepitelio olfatorio. Los síntomas de la infección en el SNC incluyen dolor de cabeza, confusión, náusea, vómito, fiebre, letargia, dolor en el cuello, déficits neurológicos focales, o signos de incremento de presión intracraneal, convulsiones, coma y muerte (Marciano y Cabral, 2003). La amiba ataca el tejido cerebral produciendo lesiones hemorrágicas necrotizantes, más comúnmente encontradas en el cerebro, cerebelo y tallo cerebral (Schuster y Visvesvara, 2004).

### **Queratitis amibiana**

La queratitis amibiana (QA) es una infección corneal que se desarrolla en personas inmunocompetentes. Usuarios de lentes de contacto tienen más riesgo de contraer una infección debido a malas prácticas de higiene o a la preparación de solución salina hecha en casa (Kilvington *et al.*, 1991). Típicamente solo un ojo

está involucrado, pero la queratitis bilateral también ha sido reportada. La invasión de *Acanthamoeba* spp. en la córnea es dependiente de su virulencia y del estado fisiológico de la córnea (Trabelsi *et al.*, 2012).

En general ha sido establecido que la patofisiología de la infección involucra una serie de eventos en los cuales el primer paso es la adhesión del trofozoíto a la célula del hospedero, después de la adhesión, la amiba produce varias proteasas líticas las cuales son capaces de degradar el epitelio, induciendo citólisis y apoptosis de los elementos celulares de la córnea. Este proceso culmina con la penetración del parásito en las capas profundas de la córnea y con la disolución del colágeno estromal de la córnea (Omaña *et al.*, 2010).

La QA se caracteriza por la inflamación de la córnea, dolor ocular y fotofobia, un característico anillo estromal central infiltrado de 360°, ruptura recurrente del epitelio corneal, y una lesión corneal refractaria por el uso común de antibióticos, si esta no es tratada prontamente puede llevar a ulceración de la córnea, pérdida de la agudeza visual, eventualmente a la ceguera y enucleación (Clarke y Niederkorn, 2006).

### **3.2 *Naegleria fowleri***

*Naegleria fowleri* es el agente causal de la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), es un ameboflagelado encontrado en suelo y agua, pero no es ubicuo como *Acanthamoeba* spp. En general, es más sensible a las condiciones ambientales como la sequía y pH extremos además no puede sobrevivir en agua de mar (De Jonckheere, 2004). *N. fowleri* es termofílica y puede tolerar temperaturas arriba de los 45 °C. Además, esta amiba prolifera durante los meses más cálidos del año, cuando la temperatura del agua tiende a aumentar. Las infecciones ocurren en niños, jóvenes, adultos mayores o grupos que tienen mayor contacto con actividades acuáticas y por lo tanto tienen mayor contacto con la amiba en el agua. En la naturaleza la amiba se alimenta de bacterias y ha sido aislada de albercas, lagos, ríos, aguas termales, albercas de hidroterapia y acuarios (Visvesvara *et al.*, 2007).

## Ciclo de vida y morfología

El ciclo de vida de *Naegleria fowleri* incluye tres etapas: una quística, una trófica, así como una flagelada (Fig. 3). La fase trófica tiene un distintivo patrón de locomoción unidireccional (parecido a las babosas de jardín) con uno o más pseudópodos ectoplasmicos. Los flagelos surgen cuando la amiba está bajo una transformación morfológica (alrededor de 30-60 minutos), desencadenada por suspensión en agua. Se cree que el flagelado juega un papel en la dispersión de la amiba en su hábitat natural (De Jonckheere, 2002).

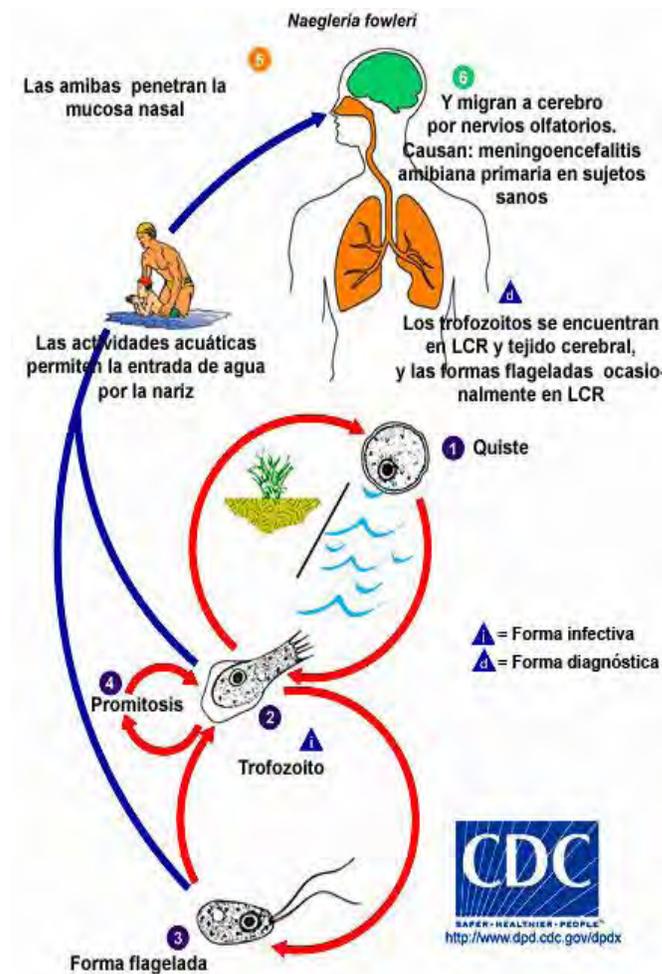


Figura 3. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri* (CDC, 2013)

La temperatura es uno de los factores determinantes (además de nutrientes y concentraciones de iones) en la persistencia de etapas específicas del ciclo de vida, los trofozoítos son prominentes cuando la temperatura del agua se eleva y crecen mejor a temperaturas cerca de los 35 °C (Ferrante, 1991). El trofozoíto se transforma en quiste cuando la disponibilidad de alimento disminuye o las condiciones ambientales para su crecimiento se vuelven adversas. El quiste es usualmente esférico y con doble pared, con el endoquiste grueso y un ectoquiste delgado. La pared del quiste tiene poros, aunque estos son difíciles de ver con microscopio de luz. Tanto la forma flagelada como el quiste poseen un núcleo simple con un prominente nucléolo (Visvesvara *et al.*, 2007).

### **Importancia médica**

#### **Meningoencefalitis amibiana primaria**

*Naegleria fowleri* causa una meningoencefalitis aguda, fulminante y hemorrágica principalmente en niños sanos y adultos jóvenes con un historial de reciente exposición al agua dulce caliente. La característica notable de la MEAP es el comienzo rápido de síntomas que siguen después de la exposición. La enfermedad progresa rápidamente, y sin un diagnóstico e intervención pronta, usualmente ocurre la muerte dentro de una semana o menos (Visvesvara *et al.*, 2007). La vía de entrada de *N. fowleri* al cuerpo es a través de las fosas nasales. El trofozoíto penetra la mucosa olfativa y migra a través del nervio olfatorio, cruzando la lámina cribosa hasta los bulbos olfatorios del SNC (Schuster y Visvesvara, 2004). Dentro de los bulbos olfatorios, *Naegleria* induce una intensa respuesta inflamatoria con necrosis lítica rodeada de exudados purulentos. Se presentan también numerosas áreas hemorrágicas superficiales en la corteza. Muchas de las lesiones son observadas alrededor de la base del lóbulo orbitofrontal y temporal, base del cerebro, hipotálamo, mesencéfalo y la parte superior de la médula espinal (Trabelsi *et al.*, 2012).

Los síntomas de la MEAP incluyen dolor de cabeza intenso, náusea, vómito, fiebre, anormalidades conductuales y rigidez en la nuca, después, la fotofobia y la

parálisis del nervio craneal pueden indicar edema cerebral. El incremento de la presión intracraneal y la hernia cerebral son usualmente la causa de la muerte (Trabelsi *et al.*, 2012)

#### **4. Otros géneros amibianos patógenos**

##### **4.1 *Balamuthia mandrillaris***

*Balamuthia mandrillaris* es la única especie conocida que pertenece al género *Balamuthia* que causa EAG tanto en humanos y en otros animales. Aunque *Balamuthia* ha sido descrita como una amiba de vida libre, solo hay dos reportes de su aislamiento en el ambiente (Matin *et al.*, 2008). La balamutiosis es similar a la EAG causada por *Acanthamoeba*, y ocurre en individuos inmunocomprometidos, incluyendo pacientes con VIH/SIDA y usuarios de drogas intravenosas, también ha sido reportada en individuos inmunocompetentes, especialmente en niños y adultos mayores. La enfermedad tiene una fase crónica, subaguda que se desarrolla sobre un periodo de tiempo que abarca de dos semanas a dos años. *B. mandrillaris* también es conocida por causar infecciones en la piel, similar a la causada por *Acanthamoeba* (Retana *et al.*, 2014)

Su ciclo de vida consiste en dos estadios, el trofozoíto que mide de 15 a 60  $\mu\text{m}$  en diámetro y el quiste que tiende a ser más pequeño (13 a 30  $\mu\text{m}$ ) y el cual posee tres paredes, una pared exterior delgada e irregular conocida como ectoquiste, una pared media fibrilar conocida como el mesoquiste y una capa interna gruesa llamada endoquiste (Fig. 4). El trofozoíto es pleomórfico y, usualmente, uninucleado con un núcleo vesicular que contiene un nucléolo largo y central. Los quistes también son uninucleados y más o menos esféricos. Estos pueden ser encontrados en cerebro, piel, pulmones y otros órganos (Matin *et al.*, 2008; Trabelsi *et al.*, 2012).

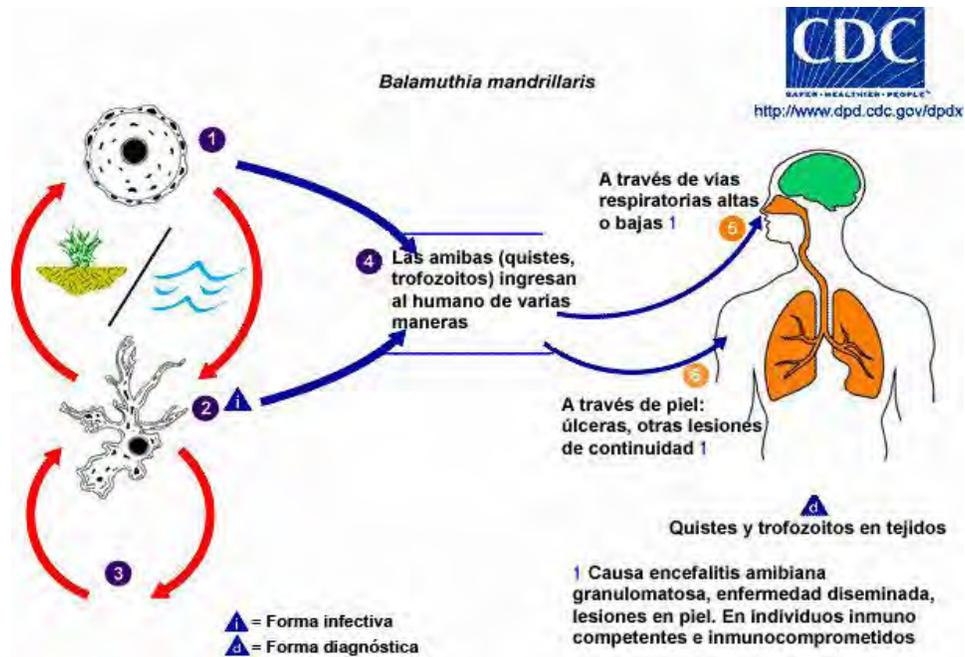


Figura 4. Ciclo de vida de *Balamuthia mandrillaris* (CDC, 2013).

#### 4.2 *Sappinia diploidea*

El género *Sappinia* comprende dos especies *Sappinia pedata* y *Sappinia diploidea*, estas son amibas desnudas lobosas cuya característica es que los trofozoítos poseen dos núcleos, estos son usualmente de 50-60  $\mu\text{m}$  de largo y de 20-30  $\mu\text{m}$  de ancho, tienen locomoción monopodial con un largo hialoplasma en la parte anterior de la célula y la superficie celular sin proyecciones pseudopodiales. Los quistes son generalmente pequeños, con un diámetro promedio de 18-25  $\mu\text{m}$ . La característica diagnóstica para *S. pedata* es la formación de un “pie”, mientras que para *S. diploidea* es la formación de quistes bicelulares como resultado de la copulación de dos trofozoítos, para después transformarse en quistes unicelulares binucleados (Walochnik *et al.*, 2010).

Solo un caso de encefalitis causada por *Sappinia diploidea* fue reportada en individuos inmunocompetentes (Gelman *et al.*, 2001, 2003). Los síntomas en el caso de encefalitis por *Sappinia* son: dolor de cabeza, visión borrosa, fobia y vómito. Un análisis histopatológico del tejido cerebral revela trofozoítos, pero no quistes y no hay evidencia de reacción granulomatosa (Schuster y Visvesvara, 2004).

### 4.3 *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis* y *Vahlkampfia* spp.

Desde el reconocimiento de los casos iniciales de queratitis amibiana por *Acanthamoeba*, es bien aceptado que estas amibas pueden causar infecciones en la córnea, sin embargo, hace relativamente poco tiempo se reconoció que esta habilidad no puede limitarse a este género. En 1992 se demostró la presencia de *Vahlkampfia* y *Hartmannella* en el tejido corneal en usuarios de lentes de contacto, y estudios más recientes muestran el efecto citopático en queratocitos *in vitro* con un mecanismo de patogenicidad similar a *Acanthamoeba castellanii* (Kinnear, 2003), por otra parte en 1998, se reportó un caso de queratitis amibiana derivado de una infección por *Vahlkampfia* (Alexandrakis *et al.*, 1998).

Algunos reportes particularmente antiguos, de infecciones por *Acanthamoeba* referían a la amiba como *Hartmannella*, sin embargo *Hartmannella* es una amiba distinta y las patologías en humanos no han sido realmente asociadas a esta amiba hartmanelida, aunque estos aislados y los de *Vahlkampfia* son citopáticos en cultivos de tejidos de queratocitos, la evidencia es escasa sobre si son patógenos en modelos animales (Kinnear, 2003). Sin embargo, existe un polémico reporte de aislamiento de *Vermamoeba vermiformis* de fluido cerebroespinal de un paciente con signos y síntomas de meningoencefalitis cuyo curso clínico evolucionó en un síndrome de hipertensión endocraneal con bronconeumonía, coma y muerte; aparentemente la amiba no fue la causa de la enfermedad pero puede ser considerada como un colonizador oportunista que pudo haber empeorado la evolución de la enfermedad (Centeno *et al.*, 1996).

Se conoce que *Vermamoeba vermiformis* puede contener a *L. pneumophila* como endosimbionte, proporcionándole así resistencia a temperaturas extremas y a los efectos de biocidas, lo cual puede contribuir a la dificultad de erradicar *Legionella* de sistemas de agua usando procedimientos convencionales de desinfección (Barker y Brown, 1994; Donlan *et al.*, 2005).

La resistencia a la digestión por la amiba también es considerada como un factor de virulencia y varias especies de bacterias resistentes a amibas son también

resistentes a la digestión por monocitos y macrófagos, en consecuencia las AVL representan un importante reservorio de patógenos humanos. Se han realizado investigaciones probando un modelo de endocitosis de *Legionella pneumophila* por *Vermamoeba vermiformis*, describiendo una fusión del endosoma conteniendo la *Legionella* internalizada con las células hospederas del retículo endoplasmático. El retículo endoplasmático se convierte en el sitio de multiplicación de la bacteria porque es rico en nutrientes y previene la exposición a los lisosomas (Harf, 1994).

## **5. Infecciones intrahospitalarias**

Las infecciones nosocomiales o intrahospitalarias (IN) se definen como aquellas que no estaban presentes o en periodo de incubación al momento en que el paciente ingresó al hospital. Hasta la fecha muchos de los países en vías de desarrollo no se han percatado de la importancia del control de las IN, y en los escasos reportes basados en sistemas de vigilancia inadecuados se informa una muy baja frecuencia. En América Latina, y pese a los esfuerzos de las naciones por enfrentar este problema, únicamente 5 % de los hospitales informan tener comités con programas regulares de control de IN. En México se asume que el promedio de IN es de 10 a 15 %, el impacto más importante de este problema es la mortalidad, la cual se estima que es de 5 % en promedio. En la mayoría de los hospitales generales la causa más frecuente de IN son las de vías urinarias, seguidas por las de herida quirúrgica, bacteriemias y neumonías, estas infecciones se relacionan directamente con técnicas y procedimientos que son susceptibles de supervisión y mejoramiento, de tal manera que se pueden disminuir las tasas de infección (Ponce *et al.*, 1999).

El impacto de las IN en países en desarrollo es proporcionalmente más grande que en países desarrollados, debido a que las tasas de infección son más altas y los recursos más limitados. Existen varios problemas graves que necesitan ser urgentemente abordados en términos de revisión de procedimientos invasivos y quirúrgicos en especial aquellos que se llevan a cabo en salas de emergencia o de cuidados intensivos (García *et al.*, 2010).

Uno de los componentes de mayor relevancia para los programas de limpieza de instalaciones hospitalarias podría ser el de la capacitación y la creación de una conciencia sobre la importancia de adoptar prácticas cotidianas de desinfección y control. La calidad de la asistencia sanitaria es un valor muy apreciado por los pacientes pues esperan de los profesionales de la salud la curación de sus enfermedades, o al menos la paliación de los síntomas de los mismos, pero una mala calidad higiénica en el ambiente hospitalario podría llegar a causarles daño, y en algunos casos extremos, provocarles la muerte, en ambos supuestos, debido a una infección nosocomial (Vinuesa, 2004).

México tiene limitaciones económicas que han afectado el sector social y dentro de éste el rubro de la salud, sin embargo la problemática actual en esta materia no se reduce solamente a un problema de presupuesto, sino que se deben analizar otros factores como la ética en el servicio médico, la calidez en el trato de los pacientes, la simplificación administrativa, los mecanismos de defensa de los usuarios de los servicios hospitalarios, entre otros y aunque no existe bibliografía en el tema de insalubridad en las instituciones de salud, es deber humano enfrentar este tema, ya que representa un problema de salud para los usuarios y sus familias. La limpieza se ha asociado siempre y de manera inseparable con la salud, y es una condición imprescindible para garantizar una avanzada atención médica (Ruiz, 2011).

En México se ha establecido la Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005, para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales, la cual tiene como objetivo establecer criterios que deberán seguirse para la prevención, vigilancia y control epidemiológicos de las infecciones nosocomiales que afectan la salud de la población usuaria de los servicios médicos prestados por los hospitales.

### III. ANTECEDENTES

En 1998, Rhor y colaboradores compararon aislados de amibas de vida libre de áreas húmedas sanitarias de sistemas de agua caliente de seis hospitales en los cuáles identificaron los géneros y determinaron la tolerancia a la temperatura. En las muestras de sistemas de agua caliente aislaron los siguientes géneros: *Hartmannella vermiformis* (65 %), *Echinamoeba* spp. (15 %), *Saccamoeba* spp. (12 %), y *Vahlkampfia* spp. (9 %), mientras que en muestras de las áreas sanitarias identificaron: *Acanthamoeba* (22 %), *Naegleria* (22 %), *Vahlkampfia* (20 %), *Hartmannella* (15 %), y *Vannella* (7 %). En cuanto a las pruebas de tolerancia a la temperatura encontraron que a 44 °C en agar, 59 % de los aislados de muestras de sistemas de agua caliente mostraron crecimiento, mientras que solo el 17 % de los aislados en las áreas húmedas crecieron.

En 2003, Silva y Rosa observaron la presencia de amibas de vida libre de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* en muestras de polvo colectadas en dos hospitales de Sao Paulo, Brasil, éstas fueron colectadas de unidades de terapia intensiva, centro quirúrgico, aislamiento de enfermedades infecciosas, vivero, sala de emergencias y cocina, de 132 muestras ellos obtuvieron 60 (45.5 %) de muestras positivas. De las muestras de polvo colectadas obtuvieron 65 aislados de AVL, en todas las muestras positivas fueron identificadas especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* lo que corresponde a un 45.5 %. Especies del género *Naegleria* fueron identificadas en cinco muestras de polvo (3.8 %).

En 2006, Thomas y colaboradores investigaron la biodiversidad de bacterias y sus hospederos amibianos en una red de agua de un hospital. Aislaron 15 cepas protistas de 200 muestras (7.5 %). Una *Hartmannella vermiformis* aislada albergó tanto *Legionella pneumophila* como *Bradyrhizobium japonicum*. Cuatro nuevas bacterias resistentes a las amibas fueron recuperadas por cultivo, y uno de estos aislados estuvo ampliamente presente en la red de agua. También observaron una fuerte asociación entre la presencia de amibas y la presencia de *Legionella* y micobacterias, además se sugirió que las amibas de vida libre son un reservorio para estas bacterias resistentes a las amibas, resaltando la importancia de

considerar a las amibas al momento de diseñar las medidas de control de calidad del agua.

En 2007, Carlesso y colaboradores realizaron un estudio sobre la presencia de amibas de vida libre en un hospital público de la ciudad de Porto Alegre. El polvo y las biopelículas de 15 ambientes hospitalarios, incluyendo, sala de emergencias, unidad de cuidados intensivos, cocina, centros quirúrgicos, reservorios de agua, grifos y bebedores colectivos fueron colectados mensualmente. De las 135 muestras colectadas de 15 ambientes estudiados, 47 (35 %) fueron positivas para AVL. De estas, 34 % presentaron características morfológicas propias del género *Acanthamoeba*.

En 2009, Carlesso y colaboradores aislaron y caracterizaron AVL de biopelículas y polvo en ambientes hospitalarios. Colectaron 135 muestras de 15 ambientes hospitalarios en un nosocomio al sur de Brasil, 31 de estos aislados fueron identificados morfológicamente como el género *Acanthamoeba* y 10 de estos fueron sometidos a pruebas de tolerancia a la temperatura y osmotolerancia como criterios para evaluar la viabilidad y patogenicidad. Las pruebas indicaron que cuatro (40 %) de estos aislados pueden ser potencialmente patógenos pues crecieron a altas temperaturas (40 °C). Las pruebas moleculares revelaron que uno de los aislados del polvo perteneció al genotipo T3 y tres al T4 y dos aislados de biopelículas al T5.

En 2011, Lasjerdi y colaboradores realizaron una investigación sobre la presencia de AVL en salas de atención a pacientes inmunodeficientes en Teherán, Irán. Colectaron un total de 70 muestras de polvo y biopelículas de salas de atención a pacientes con trasplantes, VIH, leucemia y cáncer. De las 70 muestras, 37 (52.9 %) fueron positivas para AVL. *Acanthamoeba* perteneciente al genotipo T4 fue el aislado más prevalente, la presencia de este genotipo en instrumentos médicos incluyendo una máscara de oxígeno es de gran importancia para ser tomada en cuenta por las autoridades sanitarias. El genotipo T5 de *Acanthamoeba*, *Hartmannella vermiformis*, y *Vahlkampfia avara* también estuvieron presentes.

En 2013, Ovrutsky y colaboradores evaluaron la presencia de amibas de vida libre y micobacterias no tuberculosas en muestras de agua y biopelículas colectadas de un hospital, confirmando así su alta prevalencia en sistemas de agua potable, particularmente en biopelículas. *Acanthamoeba* spp. fue la que principalmente se encontró (47 %), seguida de *Hartmannella vermiformis* (41 %). En cuanto a las micobacterias, fue evaluada la prevalencia y replicación dentro de varias AVL de un aislado de *Micobacterium avium*, demostrando la supervivencia en todas las especies de amibas probadas, pero solo una tasa de alta replicación se dio en *Acanthamoeba lenticulata*.

En 2015, Pagnier y colaboradores aislaron amibas de vida libre de muestras de agua tomadas en tres diferentes hospitales en Marsella (Francia). De 105 muestras tomadas, 14 fueron positivas para crecimiento amibiano (13 %). La identificación morfológica mostró que cinco especies pertenecían al género *Acanthamoeba* y nueve a *Hartmannella*. Ninguna de las amibas mostró la presencia obligada de endosimbiosis bacteriana. Las especies aisladas de bacterias incluídas *Stenotrophomonas maltophilia*, *Legionella* sp. y *Legionella taurinensis* fueron aisladas por primera vez en asociación con amibas.

En 2015, Trabelsi y colaboradores realizaron la identificación morfológica y molecular de amibas de vida libre en circuitos de agua en hospitales de Túnez, las muestras fueron colectadas de diferentes salas del hospital: servicios quirúrgicos, unidades médicas de cuidados intensivos, sala de operaciones tanques de almacenamiento de agua. Ellos detectaron AVL en 45 muestras de 84 (53.5 %) de la siguiente manera: servicios quirúrgicos (80 %), sala de operaciones (13.3 %), unidades médicas de cuidado intensivo (0 %), y tanques de almacenamiento de agua (6.6 %). Identificaron siete morfotipos: acantopodial (89 %), monopodial (40 %), dactilopodial (22 %), rugoso (62 %), eruptivo (24 %), en forma de abanico (18 %) y polipodial (18 %). El género *Acanthamoeba* fue detectado en 40 muestras (47.6 %): 79.4 % en salas de servicios quirúrgicos; 17.6 % en salas de operaciones. Mediante PCR se identificaron 64.2 % aislados como *Acanthamoeba* sp. estos aislados pertenecen a los genotipos T4, T10 y T11.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Las IN son aquellas que ocurren durante el ingreso y estancia hospitalaria, y también se relacionen con cuidados sanitarios. Estas están condicionadas por tres factores: el agente etiológico, la transmisión y el huésped (Pérez *et al.*, 2010).

Aunque en México se tenga un control sobre la desinfección y limpieza de los quirófanos para reducir al mínimo la exposición del personal de atención médica y de los pacientes a microorganismos potencialmente infecciosos (Ledesma, R. 2009) hay investigaciones que reportan que amibas como *Acanthamoeba* spp. son altamente resistente a diferentes tratamientos desinfectantes como cloro, bromo e isotiazolina (Dupuy *et al.*, 2014), debido a esto y a la amplia distribución de las AVL, ya que incluso se han encontrado en hospitales y unidades de diálisis se incrementa el riesgo de contraer una infección intrahospitalaria, este riesgo aumenta en individuos inmunocomprometidos pues son más susceptibles de adquirir una infección por AVL oportunistas, es por ello que el objetivo de este trabajo es identificar las AVL presentes en ambientes hospitalarios del estado de Oaxaca.

## **V. OBJETIVOS**

### **1. Objetivo general**

- Detectar la presencia de amibas de vida libre en quirófanos de Hospitales Generales y Regionales del estado de Oaxaca.

### **2. Objetivos particulares**

- Aislar las amibas de vida libre de las muestras colectadas.
- Identificar los organismos amibianos existentes en diferentes áreas de los quirófanos.
- Determinar la relación de los factores fisicoquímicos con la presencia de AVL.

## VI. ÁREA DE ESTUDIO

El estado de Oaxaca se localiza en la porción sureste de la República, hacia el extremo suroeste del istmo de Tehuantepec, limita al norte con Veracruz, al noroeste con Puebla, al este con Chiapas, al oeste con el estado de Guerrero y al sur con el océano Pacífico. Se encuentra a una altitud que varía del nivel del mar, hasta los 3750 msnm. Tiene una extensión de 91 783 km<sup>2</sup>, representa 4.8 % de la superficie nacional, lo que lo coloca en el quinto estado más grande de la República. Desde 1993, atendiendo a una clasificación etnográfica-folklórica, el estado fue dividido en ocho regiones (Fig. 5) (Ordoñez, 2000).



**Figura 5. División regional del estado de Oaxaca (Ordoñez, 2000)**

De cada una de las ocho regiones fueron seleccionados dos hospitales, uno regional y otro comunitario (Cuadro 1).

Cuadro 1. Hospitales pertenecientes a las regiones muestreadas.

Cañada	<ul style="list-style-type: none"><li>•Hospital General “Dr. Alberto Vargas Merino”, San Juan Bautista Cuicatlán</li><li>•Hospital Básico Comunitario Doce Camas, Teotitlán de Flores Magón</li></ul>
Costa	<ul style="list-style-type: none"><li>•Hospital General “Dr. Pedro Espinoza Rueda”, Pinotepa, Santiago Pinotepa Nacional</li><li>•Hospital Básico Comunitario, Santa Catarina, Juquila</li></ul>
Istmo	<ul style="list-style-type: none"><li>•Hospital General con Especialidades, Salina Cruz</li><li>•Hospital Básico Comunitario, Santo Domingo Tehuantepec</li></ul>
Mixteca	<ul style="list-style-type: none"><li>•Hospital General " E.S.P. Pilar Sánchez Villavicencio", Huajuapán de León</li><li>•Hospital Básico Comunitario, Asunción Nochixtlán</li></ul>
Papaloapan	<ul style="list-style-type: none"><li>•Hospital General, San Juan Bautista Tuxtepec</li><li>•Hospital Básico Comunitario, Loma Bonita</li></ul>
Sierra Norte	<ul style="list-style-type: none"><li>•Hospital General, María Lombardo de Caso</li><li>•Hospital Básico Comunitario,, Ixtlán de Juárez</li></ul>
Sierra Sur	<ul style="list-style-type: none"><li>•Hospital General "Amigo Del Niño Y De La Madre", Putla de Guerrero</li><li>•Hospital Básico Comunitario, La Paz Teojomulco-Texmelucan</li></ul>
Valles Centrales	<ul style="list-style-type: none"><li>•Hospital General “Dr. Aurelio Valdivieso”</li><li>•Hospital de la Niñez Oaxaqueña</li></ul>

## **VI. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **1. Recolecta de muestras**

Se tomaron muestras en enero de 2015 de diferentes nosocomios en el estado de Oaxaca de acuerdo a la división regional. Por cada región se muestrearon dos hospitales, uno general y uno comunitario y las muestras fueron colectas de agua y biopelículas de lavabos, así como del polvo de la mesa de cirugía y del instrumental quirúrgico hallados en los quirófanos de urgencias (Anexo I).

Las muestras de agua del lavabo fueron tomadas de los grifos donde el personal médico se lava las manos, estas se tomaron en tres tiempos, el primero del chorro inicial, el segundo dejando correr un poco de agua aproximadamente un minuto y el tercero dejando fluir un poco más de agua, estas muestras (de aproximadamente 1L) se almacenaron en recipientes de polipropileno de boca ancha con tapa de rosca correctamente etiquetados y fueron transportados al laboratorio 10 y 11 (Cepario y Micoteca) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca (UABJO).

Las muestras tomadas de la biopelícula del lavabo, el polvo de mesa de cirugía e instrumental quirúrgico se recolectaron con hisopos estériles raspando las biopelículas del lavabo, las mesas de cirugía y las charolas donde se coloca el instrumental quirúrgico. El hisopo se sumergió en tubos Falcon con 35 ml de solución de Page (previamente esterilizada), estos se etiquetaron, transportaron y almacenaron de la misma forma que las muestras de agua de lavabo.

### **2. Registro de parámetros fisicoquímicos**

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

En el sitio donde se tomaron las muestras de agua de lavabo, también se determinaron parámetros fisicoquímicos como: pH, temperatura y cloro libre residual.

### **3. Aislamiento de amibas de vida libre**

Las muestras fueron transportadas al Laboratorio de Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y Educación (UIICSE) de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala. Posteriormente se tomó una alícuota de 50 ml, la cual fue centrifugada a 1000 xg por 10 minutos, el sobrenadante fue desechado y el sedimento fue suspendido e inoculado en cajas de Petri con medio NNE (agar no nutritivo adicionado con bacteria *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor) (Anexo II). La cepa bacteriana sirve de fuente de carbono para que las amibas se desarrollen (Anexo III). Las placas se incubaron a 37 °C en posición invertida y después de 24 horas fueron observadas en un microscopio invertido en busca de organismos amibianos (De Jonckheere, 1977).

### **4. Clonación de morfotipos**

De las muestras que resultaron positivas se buscó la zona de mayor crecimiento amibiano y se cortó un segmento de 5mm<sup>2</sup> el cual fue resembrado en una placa nueva para tener cultivos libres de contaminantes hasta su identificación.

Los aislados se revisaron después de 24 horas y en aquellos donde se observaron diferentes morfotipos se procedió a separarlos y resembrarlos en nuevas placas de NNE hasta lograr separar un aislado de otro (cultivo monoxenico) y clonar los organismos. Las cepas aisladas se axenizaron mediante la transferencia de porciones de agar de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> a tubos con medio líquido para cultivo axénico en medio Chang, que contiene sales y fuente de carbono como glucosa, además de suero fetal de bovino para hacer crecer los trofozoítos libres de bacterias (cultivo axénico) (De Jonckheere, 1977).

## **5. Identificación morfológica de las AVL**

Para llevar a cabo la identificación se tomaron las placas que tenían trofozoítos y quistes y que no estuvieran contaminadas con algún hongo o bacteria, posteriormente, en un campo estéril, se colocó 1 ml de solución salina a la placa y se realizó un barrido para formar un concentrado, el cual fue colocado en un portaobjetos para después observarlo en un microscopio invertido. Por cada aislado se midió longitud y ancho de 50 trofozoítos y diámetro de 50 quistes.

La identificación fue realizada en primera instancia con las claves de Smirnov (2004), las cuales ofrecen un sistema de clasificación para morfotipos, basado en las distintas formas de locomoción. Posteriormente se llevó a cabo la identificación para llegar a género y especie con las claves taxonómicas de Page (1988).

## **6. Registro fotográfico**

Se realizó el registro fotográfico de cada aislado con una cámara fotográfica Nikon coolpix 990 y se elaboró un esquema de cada aislado.

## **7. Prueba de flagelación**

Para identificar los organismos que pertenecen al género *Naegleria* sp. se realizó la prueba de flagelación, la cual consiste en añadir 1 ml de agua destilada esterilizada a placas con presencia de trofozoítos, para proporcionar a las amibas un medio en el que se puedan desplazar con facilidad. Después de 15 minutos las placas fueron observadas al microscopio invertido a intervalos de 15 minutos para buscar la presencia de formas flageladas (Cable y John, 1986; Calderón, 2008).

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

## **8. Pruebas de tolerancia a la temperatura**

Las amibas patógenas tienen la capacidad de tolerar temperaturas elevadas, muchas especies del género *Naegleria* son termotolerantes y se desarrollan bien a temperaturas superiores a los 37 °C y algunas especies pueden tener un crecimiento óptimo a temperaturas superiores a los 45 °C, esta característica es importante para poder separar las posibles amibas patógenas para el hombre. Los aislados se resembraron e incubaron a 37 y a 45 °C por separado para registrar el valor de tolerancia a la temperatura, estos fueron observados durante una semana (Calderón, 2008).

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Aislados amibianos

De un total de 64 muestras colectadas 12 resultaron positivas (18.75 %) para amibas de vida libre, en el cuadro 2 se puede observar la presencia de las AVL en los diferentes hospitales muestreados por región, así como del área donde fueron colectadas.

Cuadro 2. Presencia de AVL en los diferentes hospitales y áreas de quirófanos muestreadas.

Región \ Hospital	General	Comunitario
Cañada		■
Costa		■
Istmo	▲	■ ●
Mixteca		
Papaloapan		▲ ■
Sierra Norte		
Sierra Sur	▲ ■	■
Valles Centrales		▲ ■

Simbología: Agua de lavabo ▲ Biopelícula de lavabo ■ Mesa de cirugía ● Instrumental quirúrgico ★

De las 64 muestras se obtuvieron 60 aislados que corresponden a 12 géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella*, *Vannella*, *Thecamoeba*, *Saccamoeba*, *Rhizamoeba*, *Platyamoeba*, *Rosculus*, *Sappinia* y *Paratetramitus*. (Fig. 6). Se puede observar que *Acanthamoeba* fue el género más predominante

sobre los demás con un 25 % seguido del género *Naegleria* con un 18 %, los géneros con menor presencia fueron *Sappinia* y *Paratetramitus* con un 2 %, esto concuerda con lo reportado por Carlesso y colaboradores en 2007 donde mencionan que el género *Acanthamoeba* fue el más predominante ya que del total de aislados 34 % resultaron pertenecer a este género. Esto puede explicarse debido a la alta resistencia que posee *Acanthamoeba* a algunos desinfectantes, un estudio realizado por Canals y colaboradores en 2015, reportó que *Acanthamoeba* es resistente a más de 100 mg de cloro L<sup>-1</sup> durante la etapa de quiste; además los quistes de *Acanthamoeba* han mostrado resistir la inactivación por glutaraldehído y otros desinfectantes usados en hospitales (Coulon *et al.*, 2010).



Figura 6. Diversidad de géneros amibianos

Es importante señalar también la presencia del género *Naegleria*, pues junto con *Acanthamoeba*, son géneros de importancia médica al ser causantes de enfermedades fatales para el hombre (Ferrante, 1991).

La mayoría de los aislados positivos fueron encontrados en las muestras provenientes de la biopelícula de lavabo (57 %) y del agua de lavabo (36 %) (Fig. 7), este resultado coincide con el reportado por Ovrutsky y colaboradores en 2013 y por Lasjerdi y colaboradores en 2011, donde indican que la mayoría de muestras positivas fueron recuperadas de biopelículas, ya que es conocido que las AVL se enriquecen en presencia de estas (Barbeau *et al.*, 2001). Las biopelículas procariotas predominan en un diverso rango de ecosistemas y están compuestas de comunidades altamente estructuradas de multiespecies creando de esta forma un nicho ecológico que favorece la proliferación de la amiba (Stoodley *et al.*, 2002).

También se aislaron AVL de las mesas de cirugía (7 %), por otra parte en el instrumental quirúrgico no se obtuvieron aislados positivos. Es importante recalcar el hallazgo de la contaminación en las mesas de cirugía pues es una zona de contacto continuo con los pacientes, los que en su mayoría son individuos inmunocomprometidos, además de que los aislados obtenidos en este sitio de muestreo pertenecen a especies del género *Acanthamoeba* potencialmente patógenas (Cuadro 3), esto aumenta el riesgo de contraer una infección intrahospitalaria, pues como se ha mencionado anteriormente *Acanthamoeba* sp. es causante de enfermedades oportunistas que afectan a hospederos cuya integridad metabólica, fisiológica o inmunológica está comprometida (Visvesvara *et al.*, 2007).



Figura 7. Distribución de los aislados en cada una de las áreas muestreadas en los quirófanos

## 2. Riqueza específica de AVL

En el cuadro 3 se puede observar el total de aislados identificados en los diferentes sitios de muestreo, así como la región y el hospital de donde fueron obtenidos.

Cuadro 3. Riqueza específica en los diferentes sitios de muestreo; se resaltan las especies con importancia médica.

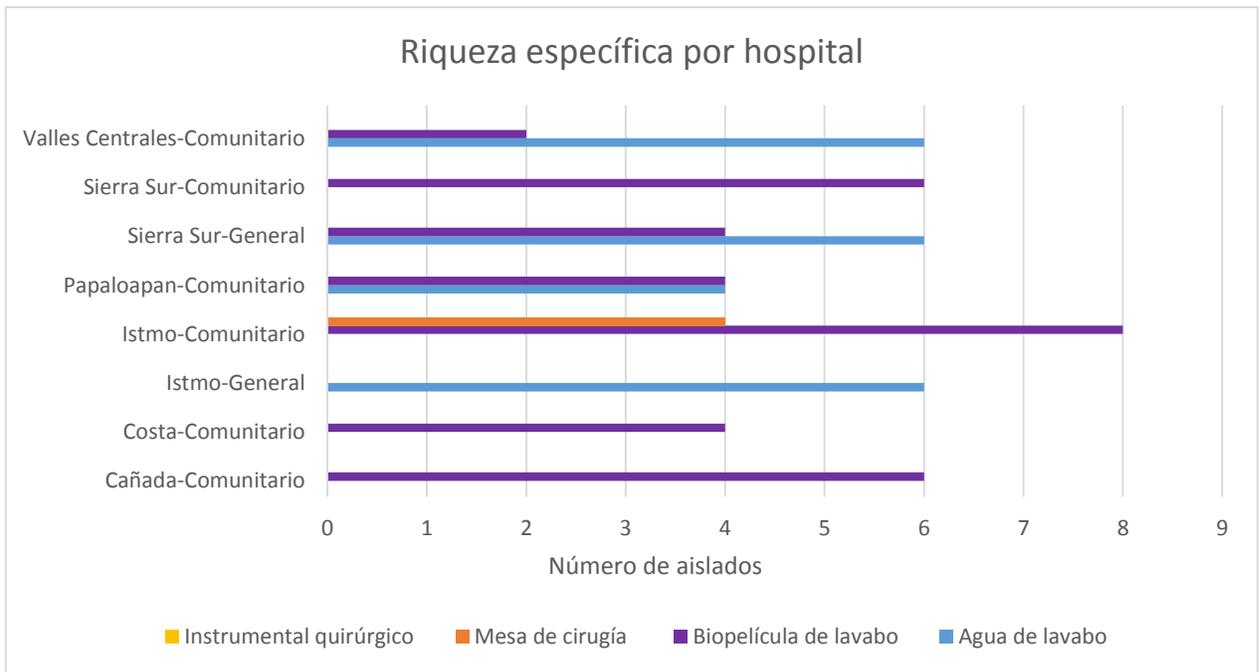
Sitio de muestreo Región/Hospital	Agua de lavabo	Biopelícula de lavabo	Polvo de mesa de cirugía
Cañada-Comunitario		<i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Hartmannella</i> sp. <i>Saccamoeba</i> sp. <i>Rhizamoeba</i> sp. <i>Sappinia</i> sp. <b><i>Naegleria</i> sp.</b>	
Costa-Comunitario		<b><i>Acanthamoeba</i> sp.</b> <b><i>Acanthamoeba culbertsoni</i></b> <i>Vahlkampfia</i> sp. <i>Platyamoeba</i> sp.	
Istmo-General	<b><i>Acanthamoeba polyphaga</i></b> <i>Thecamoeba</i> sp. <i>Vannella lata</i>		

	<i>Platyamoeba</i> sp. <b>Naegleria</b> sp. <i>Vahlkampfia</i> sp.		
Istmo-Comunitario		<b>Acanthamoeba castellanii</b> <i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia</i> sp. <b>Acanthamoeba culbertsoni</b> <i>Thecamoeba</i> sp. <i>Rhizamoeba</i> sp. <i>Hartmannella cantabrigiensis</i> <b>Hartmannella vermiformis</b>	<b>Acanthamoeba castellanii</b> <b>Acanthamoeba polyphaga</b> <b>Acanthamoeba culbertsoni</b> <b>Acanthamoeba palestinesis</b>
Papaloapan-Comunitario	<i>Naegleria gruberi</i> <i>Vahlkampfia</i> sp. <b>Acanthamoeba castellanii</b> <b>Acanthamoeba polyphaga</b>	<b>Acanthamoeba culbertsoni</b> <b>Acanthamoeba castellanii</b> <b>Acanthamoeba triangularis</b> <i>Vahlkampfia</i> sp.	
Sierra Sur-General	<i>Saccamoeba</i> sp. <i>Paratetramitus jugosus</i> <i>Naegleria gruberi</i> <i>Rosculus ithacus</i> <i>Vahlkampfia</i> sp. <b>Naegleria</b> sp.	<i>Saccamoeba</i> sp. <b>Naegleria</b> sp. <i>Rosculus ithacus</i> <i>Naegleria gruberi</i>	
Sierra Sur-Comunitario		<b>Acanthamoeba polyphaga</b> <i>Vahlkampfia</i> sp. <b>Naegleria</b> sp. <i>Hartmannella</i> sp. <i>Vannella</i> sp. <i>Naegleria gruberi</i>	
Valles Centrales-Comunitario	<i>Hartmannella</i> sp. <i>Vannella mira</i> <i>Vannella platypodia</i> <i>Hartmannella cantabrigiensis</i> <i>Hartmannella vermiformis</i> <i>Thecamoeba similis</i>	<i>Vahlkampfia</i> sp. <b>Naegleria</b> sp.	

### 3. Riqueza específica de AVL por hospitales

En 12 de los 16 hospitales (en su mayoría comunitarios) hubo presencia de organismos amibianos, esto posiblemente se debe a que las condiciones y recursos con los que cuentan los hospitales comunitarios difieren de los hospitales generales. La mayor riqueza de organismos se observó en el Hospital Básico

Comunitario ubicado en la región del Istmo, la menor riqueza fue encontrada en el Hospital Básico Comunitario de la región de la Costa lo cual puede observarse en la Fig. 8, donde también se presenta la riqueza de acuerdo al área muestreada en el quirófano, en este caso las muestras con mayor riqueza fueron las provenientes de la biopelícula del lavabo.



**Figura 8. Riqueza específica por hospital y por área de quirófano muestreada.**

En México se tienen registrados siete casos de queratitis amibiana, 35 de MEAP por *Naegleria fowleri*, tres casos de EAG por *Acanthamoeba* spp., y 12 casos de EAG por *Balamuthia mandrillaris* (Urribarren, 2015). Sin embargo en el estado de Oaxaca solo existe un caso reportado de morbilidad por MEAP en el 2008 (DGE) por lo que en este momento no es posible relacionar la presencia de AVL en estos hospitales con casos registrados de infecciones, sin embargo es importante mencionar que las patologías causadas por AVL se consideran subregistradas, pues la mayor proporción de diagnósticos registrados de estas patologías es en países con mejores recursos y con mayor conocimiento sobre este tipo de infecciones, por lo que es probable que el número de casos sea mayor (Urribarren, 2015).

Aunque el número de muestras positivas obtenidas es relativamente bajo (18.75 %) es importa tomar en cuenta que los quirófanos deben de ser áreas libres de microorganismos y por lo tanto deben de aplicarse todas las medidas posibles para prevenir posibles infecciones, por lo tanto el conocimiento de los agentes causales, su control, así como la práctica aséptica meticulosa y las técnicas de esterilización, constituyen la base de la prevención (INER, 2009). En México se ha estimado que la frecuencia de infecciones en unidades hospitalarias varía desde 2.1 hasta 15.8 %, siendo la neumonía la infección más común (39.7 %), seguida de las infecciones urinarias (20.5 %), heridas quirúrgicas (13.3 %) y de torrente sanguíneo (7.3 %) (DGED, 2011). Debido a esto aumenta la importancia de seguir las medidas de prevención y los estándares de desinfección establecidos pues aunque las IN no sean precisamente por AVL, existen bacterias resistentes a amibas (BRA) como *Legionella* sp. (un agente establecido de neumonía) que resisten la fagocitosis amibiana y las usan como un “campo de entrenamiento” para resistir la destrucción por macrófagos. Además, la amiba que es reservorio de ARB rápidamente se propaga en el ambiente y en sistemas de agua potable y una vez dentro de la amiba, la bacteria puede ser protegida de diversas condiciones, particularmente de agentes usados para la desinfección de agua, ya que las amibas son resistentes a la mayoría de estos desinfectantes, especialmente cuando están enquistadas (Thomas *et al.*, 2006).

#### **4. Frecuencia de especies de AVL**

Las especies que se presentaron con mayor frecuencia fueron: *Vahlkampfia* sp. al encontrarse en nueve de los aislados positivos, seguida de *Naegleria* sp. que se obtuvo en seis muestras y *Naegleria gruberi* la cual se registró en cinco muestras (Fig. 9); a nivel de género cabe resaltar la frecuencia de *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Vahlkampfia*. Estos resultados concuerdan con un estudio realizado por Rohr y colaboradores en 1998 en el cual obtuvieron muestras de diferentes áreas sanitarias en hospitales e identificaron entre sus géneros más frecuentes a *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Vahlkampfia*. Hasta el momento *Vahlkampfia* spp. no ha sido reportada como especie patógena, sin embargo se ha descubierto en el

estroma corneal de personas que usan lentes de contacto desechables y por lo regular aparece en infecciones mixtas con *Hartmannella* sp. (Hay et al., 1996).

Las especies con menor frecuencia fueron *Sappinia* sp., *Paratetramitus jugosus*, *Acanthamoeba triangularis*, *Vannella* sp., *Vannella mira*, *Vannella platypodia* y *Vannella lata*.

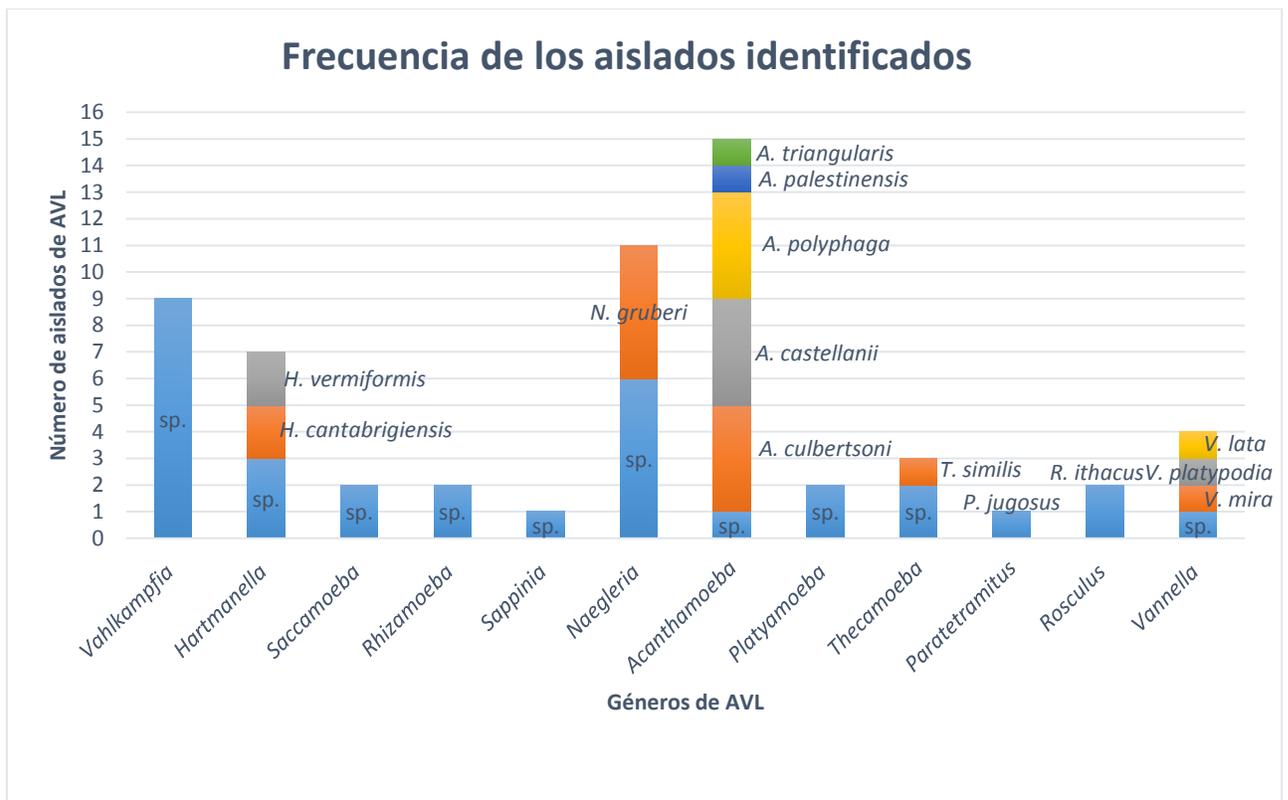


Figura 9. Frecuencia de los aislados amebianos identificados

## 5. Identificación morfológica, descripción y registro fotográfico

La determinación de los aislados se realizó con las claves taxonómicas de Page (1988) de acuerdo a las características morfológicas del trofozoíto y quiste, el registro fotográfico fue llevado a cabo en el Laboratorio de Patógenos Emergentes de la FES Iztacala.

### a) Género: *Acanthamoeba* (Volkonsky, 1931)

Cuadro 4. Clasificación taxonómica de *Acanthamoeba* spp. (Adl *et al.*, 2016)

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Amoebozoa
<b>Rango 1:</b>	Discosea
<b>Rango 2:</b>	Longamoebia
<b>Rango 3:</b>	Centramoebida
<b>Género:</b>	<i>Acanthamoeba</i>

*Acanthamoeba culbertsoni* (Singh & Das, 1970)

Endoquiste regularmente redondeado, ligeramente poligonal, ectoquiste delgado, ondulado o rugoso, más o menos cercano al endoquiste, con un número de poros 5 a 6 en promedio, diámetro del quiste de 15-18  $\mu\text{m}$ .

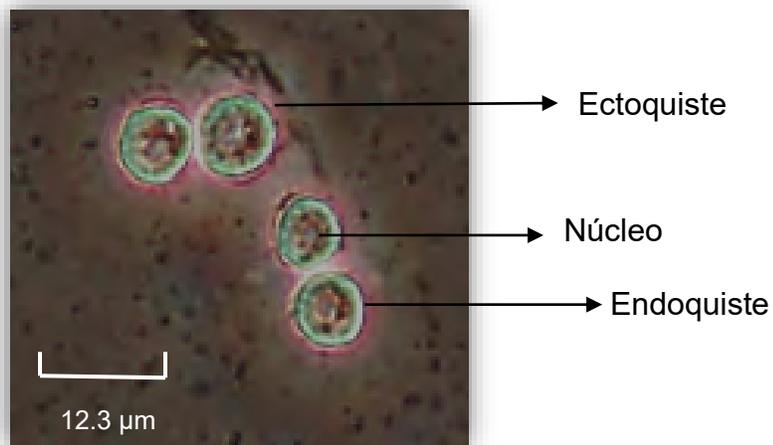


Figura 10. Quiste de *Acanthamoeba culbertsoni*. Fotografía tomada con microscopio invertido de contraste de fases a 40X

*Acanthamoeba castellanii* (Douglas, 1930)

Quiste reticulado más o menos esférico, endoquiste conectado al ectoquiste por pequeños brazos cónicos; ectoquiste grueso, diámetro de 14-16  $\mu\text{m}$ .

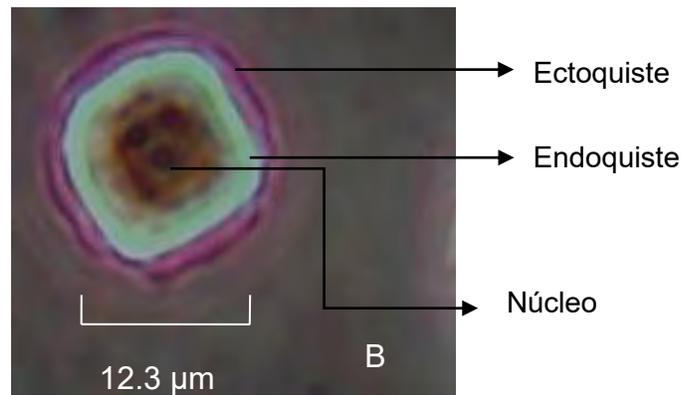
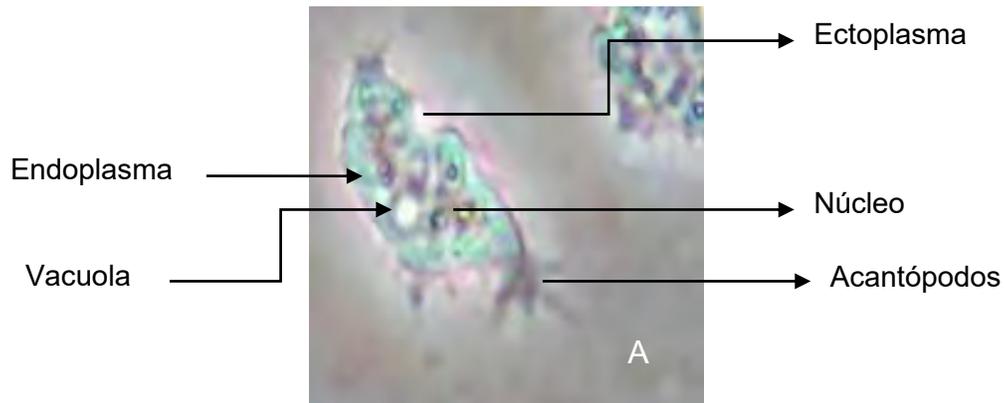


Figura 11. *Acanthamoeba castellanii*. Trofozoíto (A); Quiste (B). Fotografías tomadas con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

*Acanthamoeba polyphaga* (Puschkarew, 1913)

Una pequeña porción del quiste es reticulada; endoquiste muy irregular, prácticamente nunca estrellado; ectoquiste menos plegado que en *A. castellanii* o *A. mauritaniensis*, delgado, ampliamente separado del endoquiste, el endoquiste posee de cinco a seis brazos; el tamaño promedio del quiste es de 14  $\mu\text{m}$ .

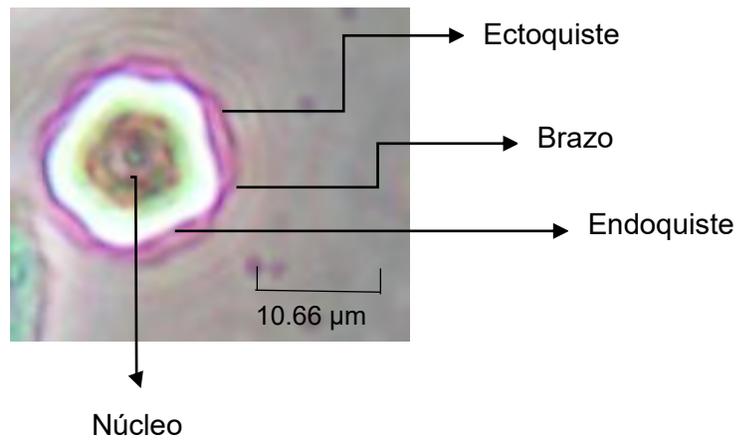


Figura 12. Quiste de *Acanthamoeba polyphaga*. Fotografía tomada con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

*Acanthamoeba palestinensis* (Reich, 1933)

No crece a 37°C; el endoquiste es esférico u ovoide, raramente con protuberancias cónicas; ectoquiste fino, más o menos rugoso, usualmente bastante cercano al endoquiste; poros difícilmente de discernir, posee un promedio de 7 poros; el diámetro del quiste es usualmente de 17-18 µm.

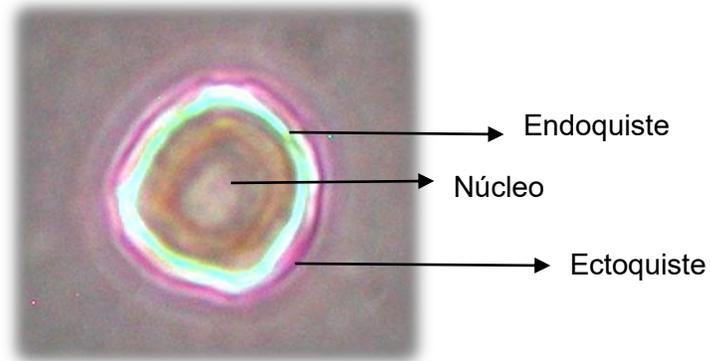


Figura 13. Quiste de *Acanthamoeba palestinensis*. Fotografía tomada con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

*Acanthamoeba triangularis* Pussard & Pons, 1977

Crece en cultivos a 37 °C; número de brazos del endoquiste menor a 4; diámetro promedio del quiste 13 µm.

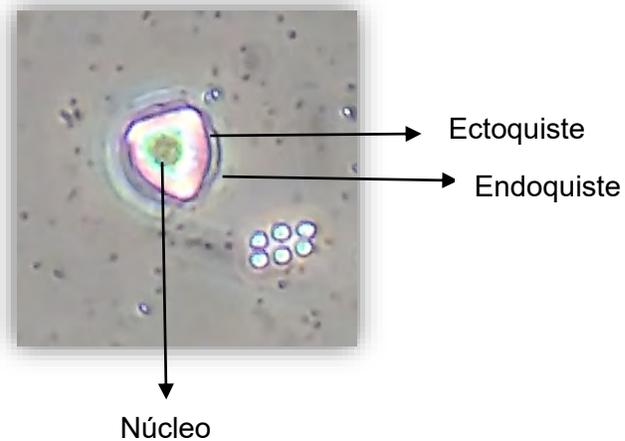


Figura 14. Quiste de *Acanthamoeba triangularis*. Fotografía tomada con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

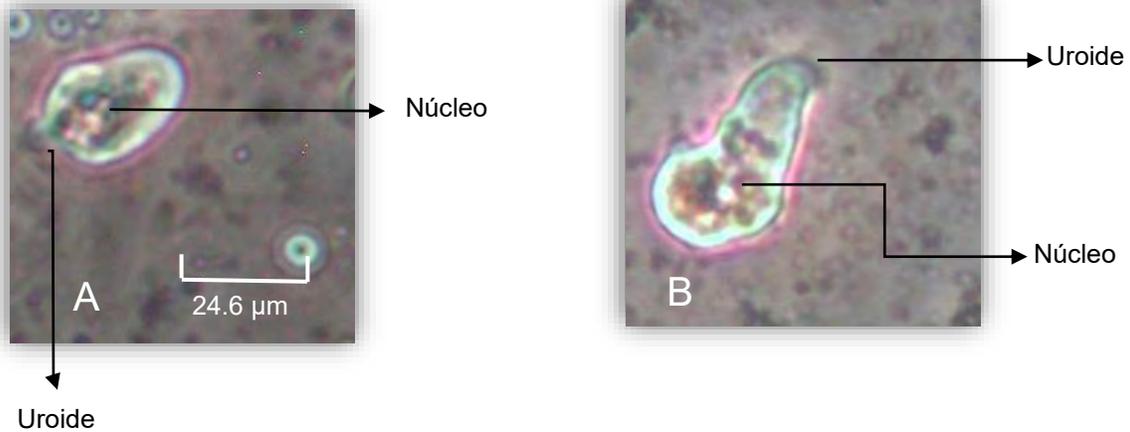
**b) Género: *Naegleria* (Alexeieff, 1912; emend. Calkins, 1913)**

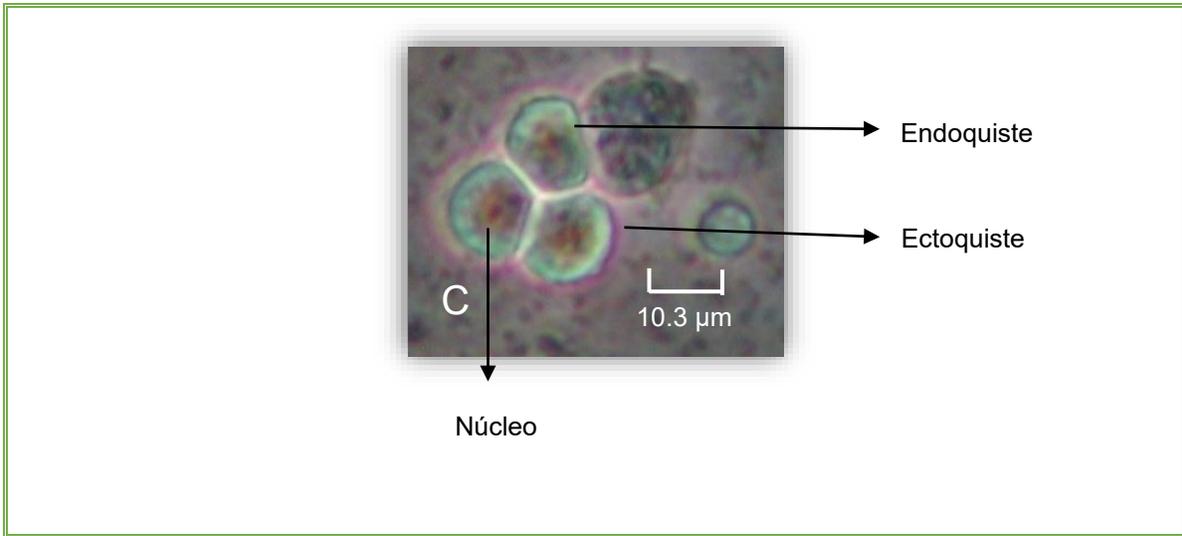
Cuadro 5. Clasificación taxonómica de *Naegleria* (Adl *et al.*, 2016)

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Excavata
<b>Rango 1:</b>	Discoba
<b>Rango 2:</b>	Piscicristata
<b>Rango 3:</b>	Heterolobosea
<b>Rango 4:</b>	Tetramita
<b>Género:</b>	<i>Naegleria</i>

*Naegleria gruberi* (Schardinger, 1899)

Quistes esféricos u ovoides, usualmente con la pared lisa, contiene varios poros cerrados distinguibles con microscopio de luz; regularmente el quiste tiene una capa perinuclear de gránulos gruesos; muchas cepas se transforman rápidamente a formas flageladas entre los 20 y 25 °C. Los quistes miden entre 9 y 23  $\mu\text{m}$  y la forma trófica entre 21 y 24  $\mu\text{m}$ .





**Figura 15. *Naegleria gruberi*. Trofozoíto (A y B); Quiste (C). Fotografías tomadas con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.**

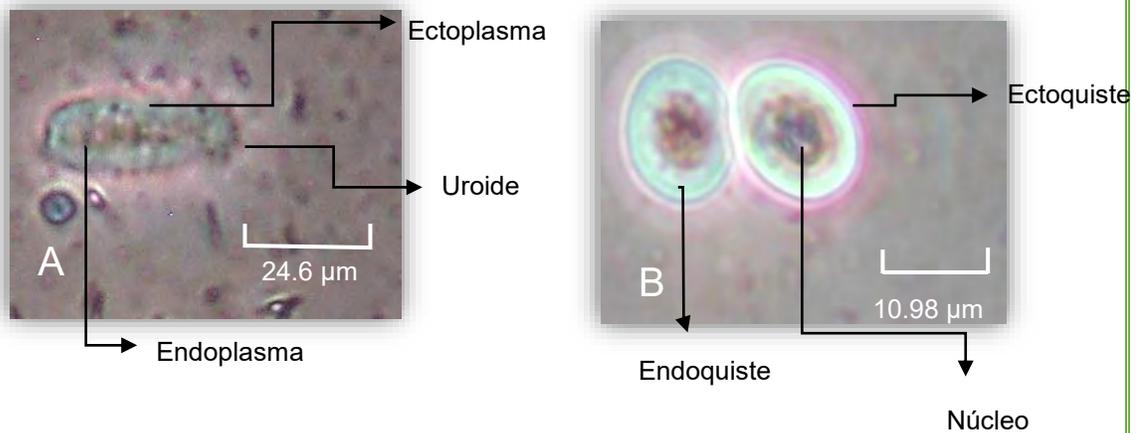
**c) Género: *Vahlkampfia* (Chatton & Lalung-Bonnaire, 1912)**

Cuadro 6. Clasificación taxonómica de *Vahlkampfia* (Adl et al., 2016).

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Excavata
<b>Rango 1:</b>	Discoba
<b>Rango 2:</b>	Piscicristata
<b>Rango 3:</b>	Heterolobosea
<b>Rango 4:</b>	Tetramita
<b>Género:</b>	<i>Vahlkampfia</i>

*Vahlkampfia* sp. (Chatton & Lalung-Bonnaire, 1912)

Amibas heteroloboseas sin forma flagelada descrita en su ciclo de vida. Quistes con o sin cubierta gelatinosa.



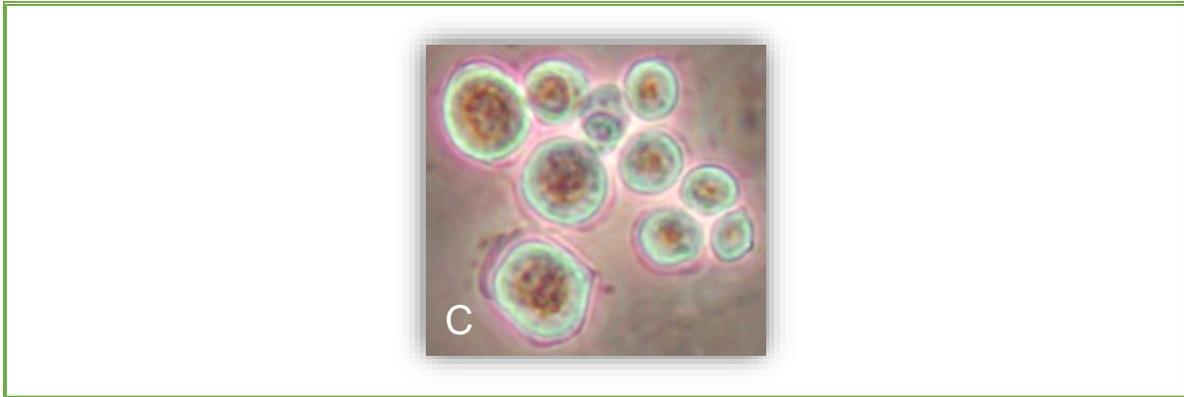


Figura 16. *Vahlkampfia* sp. Trofozoíto (A); Quiste (B y C); C- se observa la cubierta gelatinosa del quiste característica del género *Vahlkampfia*. Fotografías tomadas con microscopio invertido de contraste de fases a 40X.

d) Género: *Hartmannella* (Alexeieff, 1912; emend. Page, 1974)

Cuadro 7. Clasificación taxonómica de *Hartmannella* (Adl. et al., 2012)

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Amoebozoa
<b>Rango 1:</b>	Tubulinea
<b>Rango 2:</b>	Euamoebida
<b>Género:</b>	<i>Hartmannella</i>

*Hartmannella cantabrigiensis* (Alexeieff, 1912; Page, 1974)

Forma locomotiva monopodial con una prominente zona anterior hialina. Locomoción estable, no-eruptiva. A menudo con una vacuola contráctil. Quistes lisos, redondos, ligeramente ovales, bilaminares. Posee un glicocalix, delgado con diámetro alrededor de 12.5  $\mu\text{m}$ . Mitocondria, de aquellas especies examinadas, algunas veces elongada. Se encuentra distribuida en agua fresca y también hay especies marinas. Su longitud es de 16-33  $\mu\text{m}$  (promedio 23  $\mu\text{m}$ ) con una relación longitud/anchura alrededor de 4.5, máxima alrededor de 6.5; el núcleo mide de 2.5-4.5  $\mu\text{m}$ ; comúnmente posee varios cristales pequeños (1  $\mu\text{m}$ ) bipiramidales y estructuras de superficie con forma de copa con un diámetro de 1-20 nm.

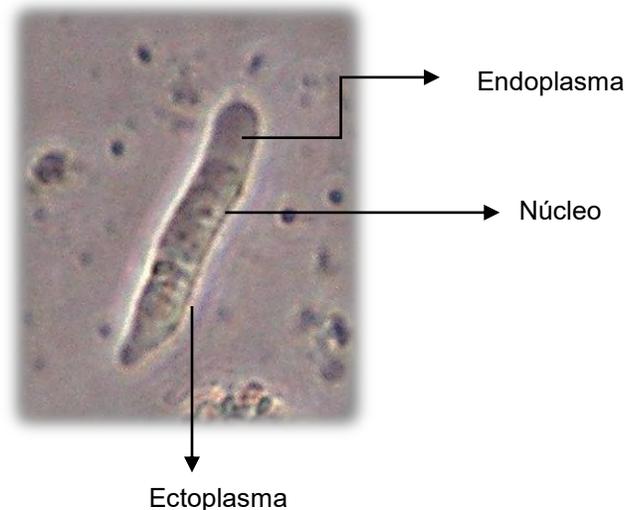


Figura 17. Trofozoito de *Hartmannella cantabrigiensis*. Fotografía tomada con microscopio óptico con contraste de fases a 40X.

e) Género: *Vermamoeba* (Cavalier-Smith and Smirnov, 2004)

Cuadro 8. Clasificación taxonómica de *Vermamoeba* (Adl. et al., 2012)

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Amoebozoa
<b>Rango 1:</b>	Tubulinea
<b>Rango 2:</b>	Arcellinida
<b>Rango 3:</b>	Echinamoebida
<b>Género:</b>	<i>Vermamoeba</i>

*Vermamoeba vermiformis* (Page, 1988)

Relación longitud/anchura mayor a 6, máxima alrededor de 8.4, capa hialina siempre presente; longitud de 12 a 37  $\mu\text{m}$ , no posee cristales; quistes esféricos o ligeramente ovoide, capa externa de la pared un tanto separada, diámetro de 4 a 9.5  $\mu\text{m}$  (promedio de 7  $\mu\text{m}$ ); estructuras de superficie con forma de copa cuyo diámetro es de 12.5 nm.

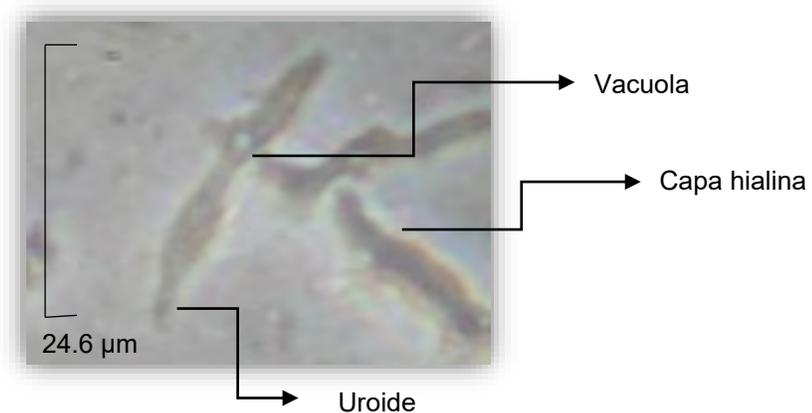


Figura 18. Trofozoito de *Vermamoeba vermiformis*. Fotografía tomada con microscopio óptico con contraste de fases a 20X.

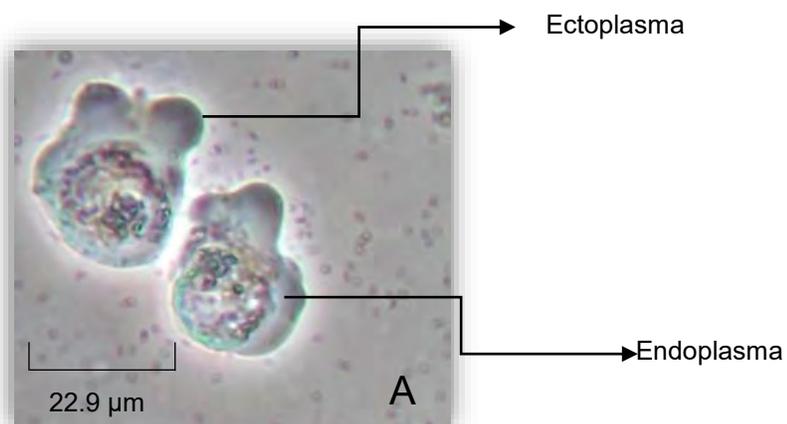
**f) Género: *Vannella* (Bovee, 1965)**

Cuadro 9. Clasificación taxonómica de *Vannella* (Adl *et al.*, 2016)

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Amoebozoa
<b>Rango 1:</b>	Discosea
<b>Rango 2:</b>	Flabellinia
<b>Rango 3:</b>	Vannellida
<b>Rango 4:</b>	<i>Vannella</i>

*Vannella mira* (Schaeffer, 1926; Smirnov 2002)

Locomoción en forma de abanico, semicircular o (raramente) espatulada. Prominentes pliegues o lóbulos en el hialoplasma frontal. Único núcleo vesicular, con diámetro de alrededor de 6  $\mu\text{m}$ . La forma flotante no es simétrica, con más de 11 pseudópodos, a menudo con un engrosamiento cónico desde la base. Los pseudópodos de la forma flotante están redondeados. Largo y ancho de la forma locomotiva 15-35  $\mu\text{m}$  (promedio de largo 28.5  $\mu\text{m}$ ; promedio ancho 26.5  $\mu\text{m}$ ) relación l/a 0.5-1.8 (promedio 1.08). Se diferencia de otras especies en la organización de la forma flotante. Además *V. arabica* tiene filamentos simples distintivos entre los glicostilos, los cuales no son encontrados en *V. mira*.



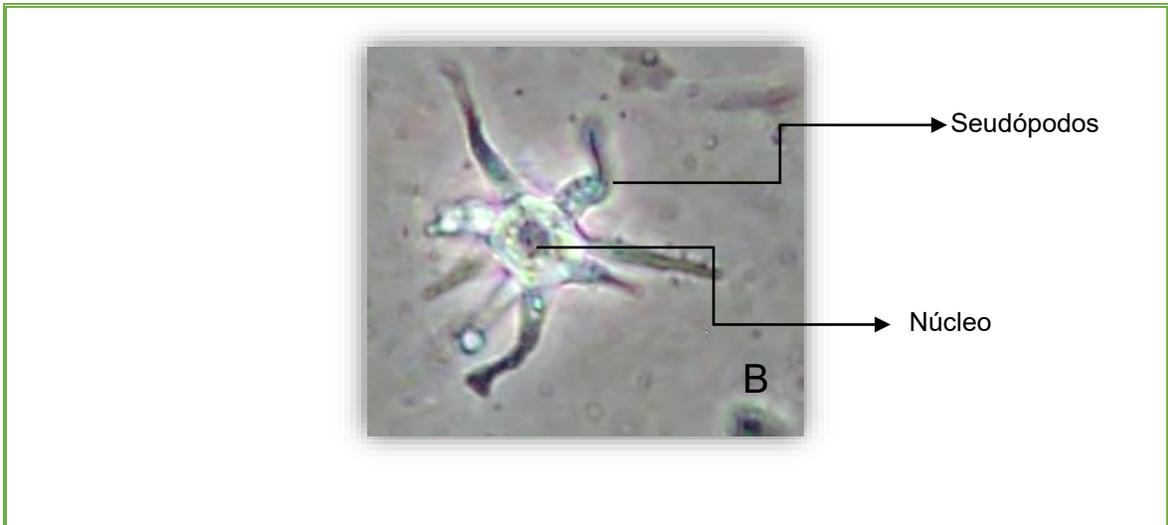
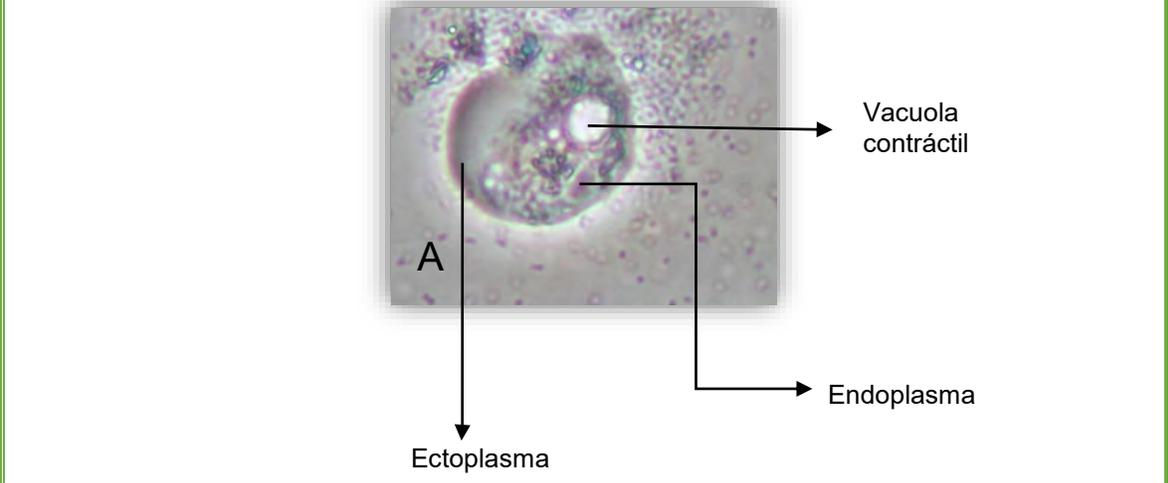


Figura 19. *Vannella mira*. Trofozoíto (A); Forma flotante (B). Fotografías tomadas con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

*Vannella platypodia* (Gläser, 1912)

Forma locomotiva de largo menor, algo más larga que ancha, algunas veces espatulada, prolongada posteriormente; grande dimensión 10-30  $\mu\text{m}$ ; núcleo de 3.4-5.0  $\mu\text{m}$ ; se establece como forma flotante en unos pocos minutos; con filamentos simples entre glicostilos.



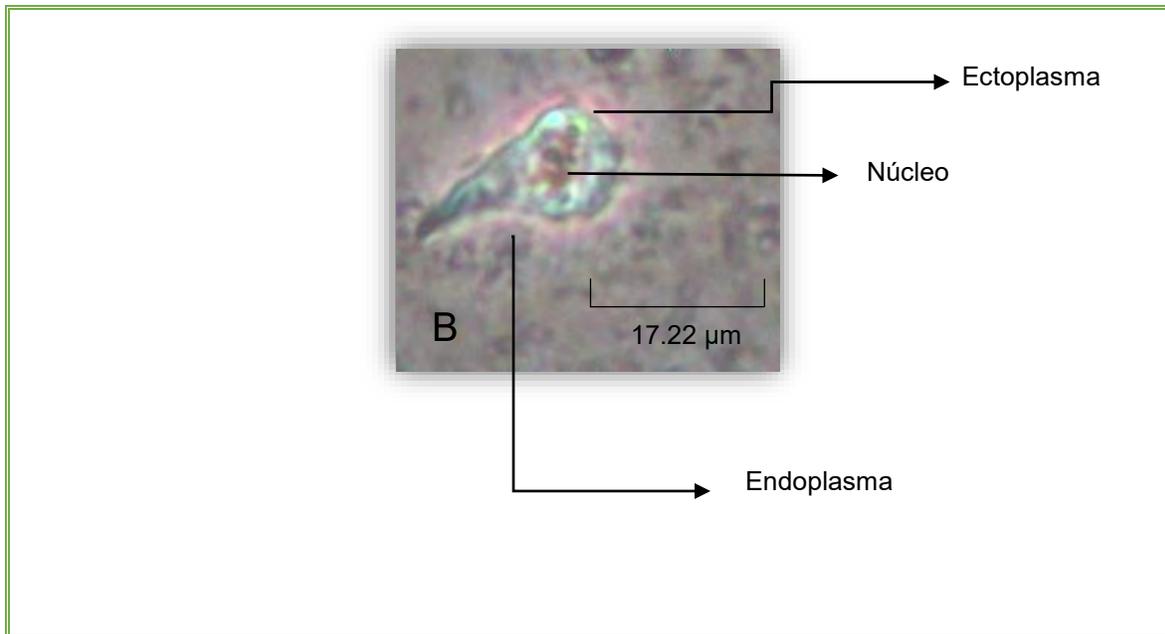


Figura 20. *Vannella platypodia*. Trofozoíto (A); Forma flotante (B). Fotografías tomadas con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

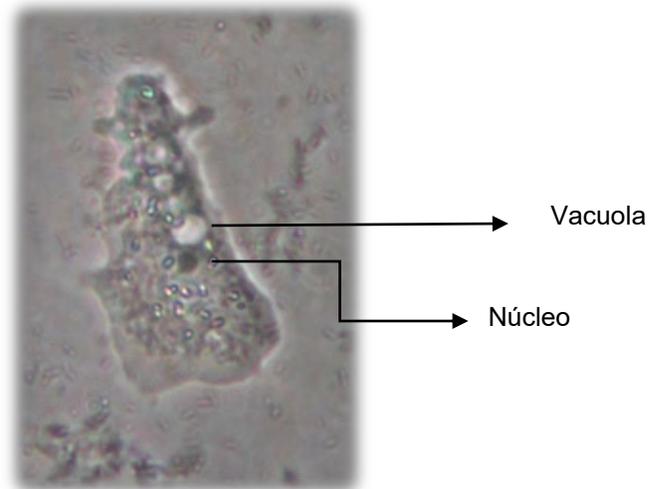
**g) Género: *Thecamoeba* (Fromentel, 1874)**

Cuadro 10. Clasificación taxonómica de *Thecamoeba* (Adl. et al., 2016)

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Amoebozoa
<b>Rango 1:</b>	Discosea
<b>Rango 2:</b>	Longamoebia
<b>Rango 3:</b>	Thecamoebida
<b>Género:</b>	<i>Thecamoeba</i>

*Thecamoeba similis* (Greeff, 1891)

Trofozoíto con un largo de 30 a 80  $\mu\text{m}$ , a menudo más amplio que los demás miembros del género; superficie moderadamente arrugada (en la amiba estacionaria); locomoción más suave, a veces con algunos pliegues dorsales posteriores; núcleo usualmente ovoide o elipsoidal con numerosas y pequeñas piezas nucleolares, 7.7-13.9  $\mu\text{m}$ .



**Figura 61.** Trofozoíto de *Thecamoeba similis*. Fotografía tomada con microscopio óptico con contraste de fases a 40X.

**h) Género: *Saccamoeba* (Frenzel, 1897; emend. Bovee, 1972)**

Cuadro 11. Clasificación taxonómica de *Saccamoeba* (Adl. et al., 2016)

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Amoebozoa
<b>Rango 1:</b>	Tubulinea
<b>Rango 2:</b>	Euamoebida
<b>Género:</b>	<i>Saccamoeba</i>

*Saccamoeba* sp. Frenzel, 1897; emend. Bovee, 1972

Forma locomotiva activa pero no eruptiva, su tamaño va desde los 30  $\mu\text{m}$  hasta los 175  $\mu\text{m}$ ; amiba de forma limax con un núcleo vesicular; el uroide posee vellosidades, posee una vacuola contráctil abultada; usualmente con cristales en el citoplasma; forma flotante con pseudópodos irregulares alrededor, sin pseudópodos largos granulares. Quistes reportados en algunas especies.

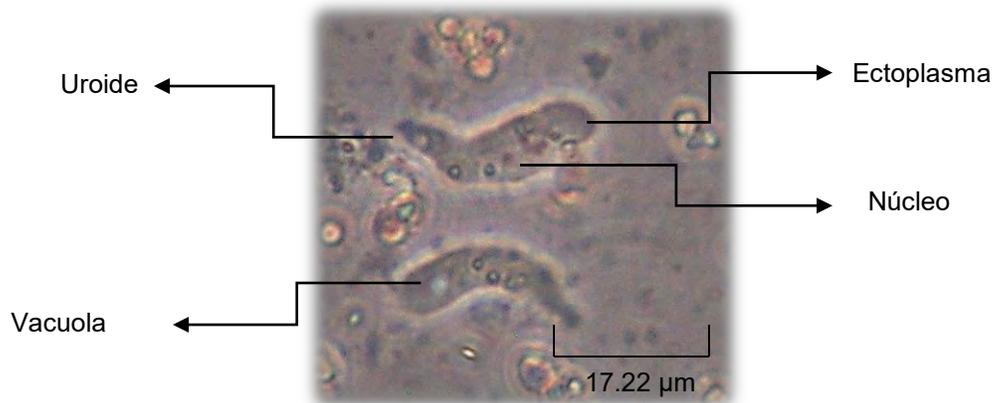


Figura 22. Trofozoíto de *Saccamoeba* sp. Fotografía tomada con microscopio óptico con contraste de fases a 40X.

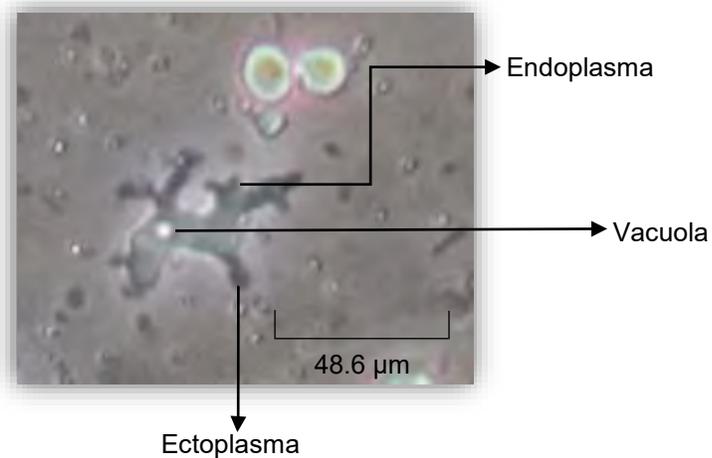
**i) Género: *Rhizamoeba* (Page, 1972)**

Cuadro 12. Clasificación taxonómica de *Rhizamoeba* (Adl. et al., 2016)

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Amoebozoa
<b>Rango 1:</b>	Tubulina
<b>Rango 2:</b>	Leptomyxida
<b>Género:</b>	<i>Rhizamoeba</i>

*Rhizamoeba* sp. (Page, 1988)

Los filamentos que producen para adherirse al sustrato es lo que dan el nombre al género, son más o menos conspicuos en la parte posterior final de la forma limax. La actividad eruptiva es notable en las formas limax, algunas veces con hialoplasma desplazado a lo largo del lado posterior, así como en formas más expandidas.



**Figura 23. Trofozoíto de *Rhizamoeba* sp. Fotografía tomada con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.**

**j) Género: *Platyamoeba* (Pagr, 1969)**

Cuadro 13. Clasificación taxonómica de *Platyamoeba* (Adl et al., 2012)

<b>Dominio:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Amoebozoa
<b>Rango 1:</b>	Discosea
<b>Rango 2:</b>	Flabellinia
<b>Rango 3:</b>	Vannellida
<b>Rango 4:</b>	<i>Platyamoeba</i>

*Platyamoeba* sp. (Page, 1969)

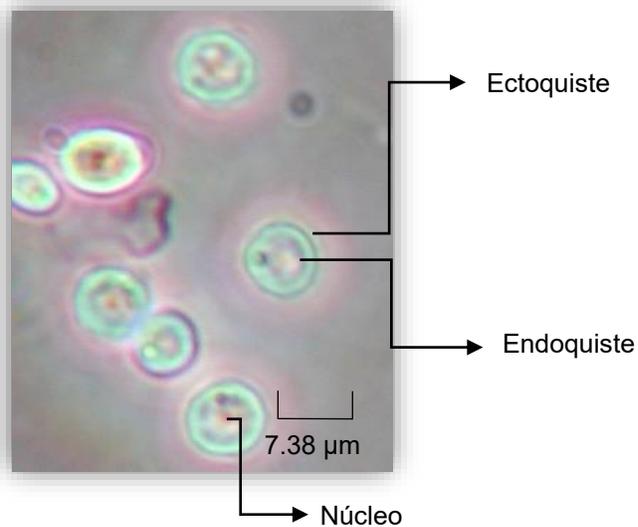
Forma locomotiva generalmente oval o lingüiforme pero ocasionalmente con forma de abanico con una extensa zona hialina; algunos con débiles pliegues superficiales. El largo usualmente va de los 10 a los 35  $\mu\text{m}$ . Núcleo esférico por lo regular con un nucléolo central pero ocasionalmente con forma de copa o parietal. La mayoría de las platyamoebas tienen formas flotantes con pseudópodos romos.

Figura 24. Descripción de *Platyamoeba* sp.

**k) Género: *Rosculus* (Hawes, 1963)**

*Rosculus ithacus* (Hawes, 1963)

La forma locomotiva alcanza una dimensión de 5 a 17  $\mu\text{m}$ , algunas veces se llega a expandir un poco más; el núcleo mide en promedio de 1.9 a 2.4  $\mu\text{m}$ ; los quistes son lisos, de forma oval o esférica, con un tamaño promedio de 3.5 a 8.8  $\mu\text{m}$ .



**Figura 25. Quiste de *Rosculus ithacus*. Fotografías tomadas con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.**

**I) Género: *Sappinia* (Dangeard, 1896)**

Cuadro 14. Clasificación taxonómica de *Sappinia* (Adl *et al.*, 2016)

<b>Reino:</b>	Eukaryota
<b>Supergrupo:</b>	Amoebozoa
<b>Superclase:</b>	Discosea
<b>Clase:</b>	Longamoebia
<b>Familia:</b>	Thecamoebida
<b>Género:</b>	<i>Sappinia</i>

*Sappinia* sp. (Dangeard, 1896)

Amiba binucleada, con el par de núcleos estrechamente próximos; algunas veces con pares supernumerarios; apariencia de la amiba parecida a *Thecamoeba* pero usualmente no rugosa; posible proceso sexual en el quiste.

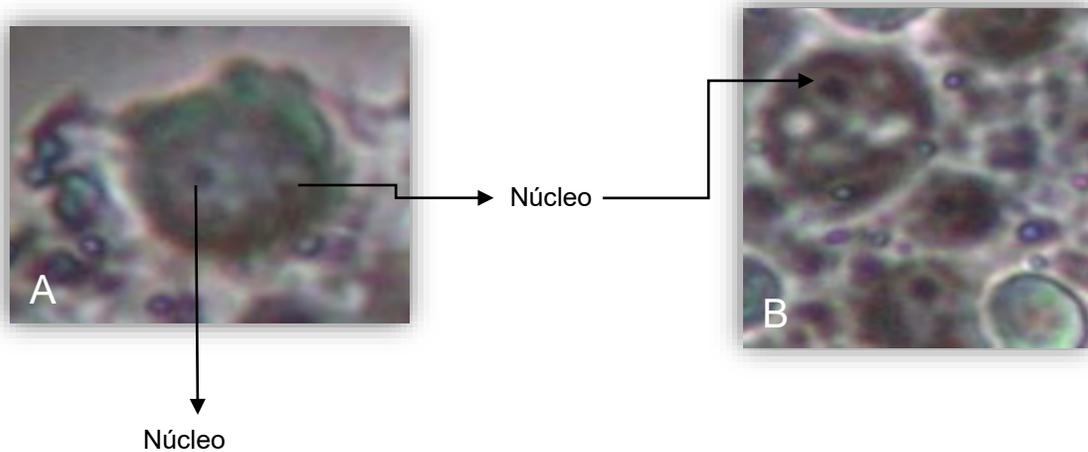


Figura 267. Trofozoítos de *Sappinia* sp. (A y B). Fotografías tomadas con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

m) Género: *Paratetramitus* (Darbyshire, Page & Goodfellow, 1976)

*Paratetramitus jugosus* (Page, 1988)

Amiba con un largo de aproximadamente 13 a 18  $\mu\text{m}$ ; núcleo de 2.8-4.0  $\mu\text{m}$ , quistes con la pared separada en dos capas, con la capa exterior comúnmente proyectada en ondas irregulares, a menudo con apariencia festoneada, pero no rugosa, la medida aproximada de los quistes es de 7.5 a 11.8  $\mu\text{m}$ .

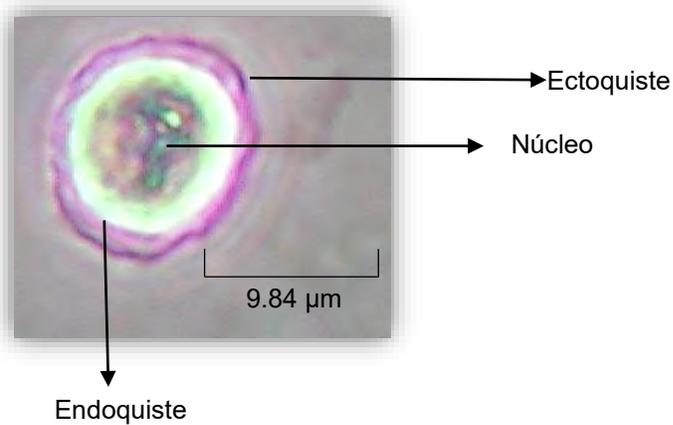


Figura 278. Quiste de *Paratetramitus jugosus*. Fotografías tomadas con microscopio invertido con contraste de fases a 40X.

## 6. Prueba de tolerancia a temperatura

De los 60 aislados obtenidos, 27 (45 %) mostraron crecimiento a 45 °C y 33 aislados (55 %) a 37 °C (Fig. 28), la mayoría de los aislados se obtuvieron a la temperatura de incubación de 37°C lo cual significa que dominaron los organismos mesófilos. Todos los aislados mostraron crecimiento a temperatura ambiente (22 °C) esto refleja que las cepas son termotolerantes y no termófilas, estos también cumplieron el requisito de crecer a 37 °C, primera característica a cumplir por un organismo patógeno (Lares y Lares, 2009) ya que las especies patógenas son termotolerantes aunque no todas las termotolerantes son patógenas (Peralta *et al.*, 2009).

En la Fig. 29 puede observarse la frecuencia de aislamientos que crecieron a 45 °C; entre los géneros que crecieron a esta temperatura se encuentran *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, esto concuerda con los resultados obtenidos por Rohr y colaboradores en 1998 donde mostraron que *Vermamoeba vermiformis* fue la especie dominante distribuida sistemáticamente en sistemas de agua caliente en hospitales, sus pruebas de tolerancia revelaron que a 44 °C, 59 % de los aislados amibianos de sistemas de agua caliente mostraron crecimiento (*Hartmannella*, 41 %; *Saccamoeba*, 12 %; *Vahlkampfia* 6 %). Los aislados correspondientes a las áreas húmedas fueron: *Vahlkampfia*, 7 %; *Hartmannella*, 5 % y *Acanthamoeba*, 2 %. La presencia de *Hartmannella* concuerda con los resultados de Thomas y colaboradores en 2006, donde reportan la presencia de *Hartmannella vermiformis* en un 86.7 % en muestras obtenidas a una temperatura media de 56 °C debido a que es una especie reportada por ser tolerante a altas temperaturas, por otra parte encontraron a *L. pneumophila* (la cual también es resistente a altas temperaturas) presente en uno de los trece aislados de *H. vermiformis*.

Es importante recalcar el crecimiento de los aislados de *Naegleria* sp. a 45 °C ya que solo siete especies pertenecientes al género son conocidas por crecer a esta temperatura (*N. fowleri*, *N. lovaniensis*, *N. carteri*, *N. niuginensis*, *N. endoi*, *N. martinezi* y *N. johanseni*) (Guzmán *et al.*, 2008), por lo que sería importante

continuar con las pruebas de identificación molecular para determinar si alguno de los aislados pertenece a *Naegleria fowleri*.

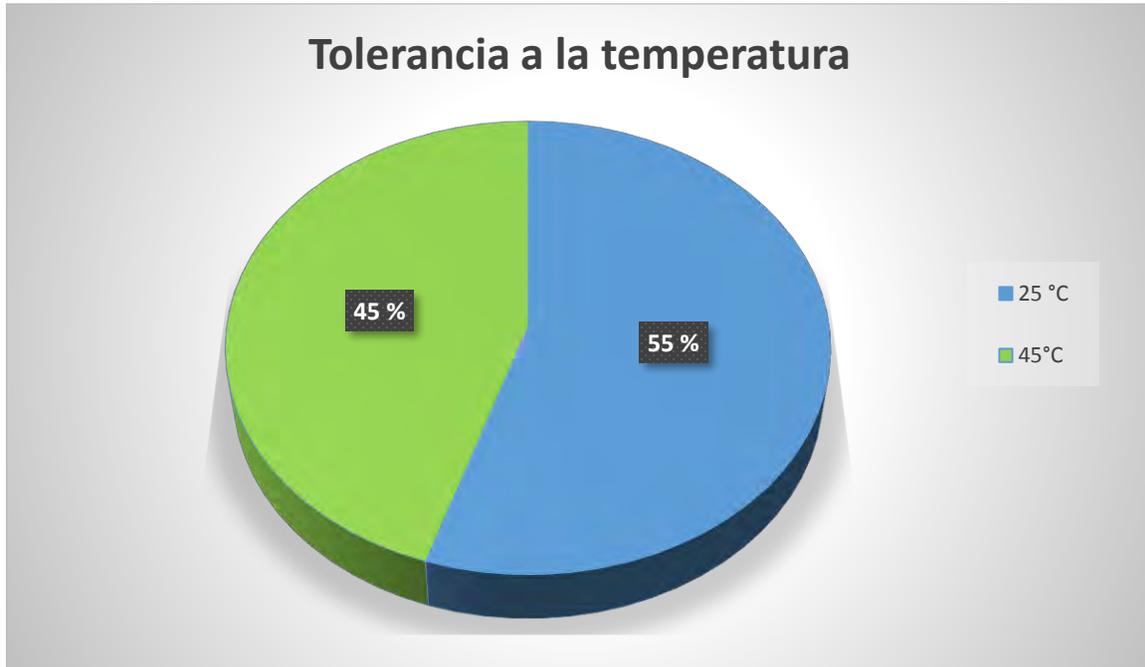


Figura 28. Porcentaje del total de aislados ambientales que crecieron a 25 y 45 °C.

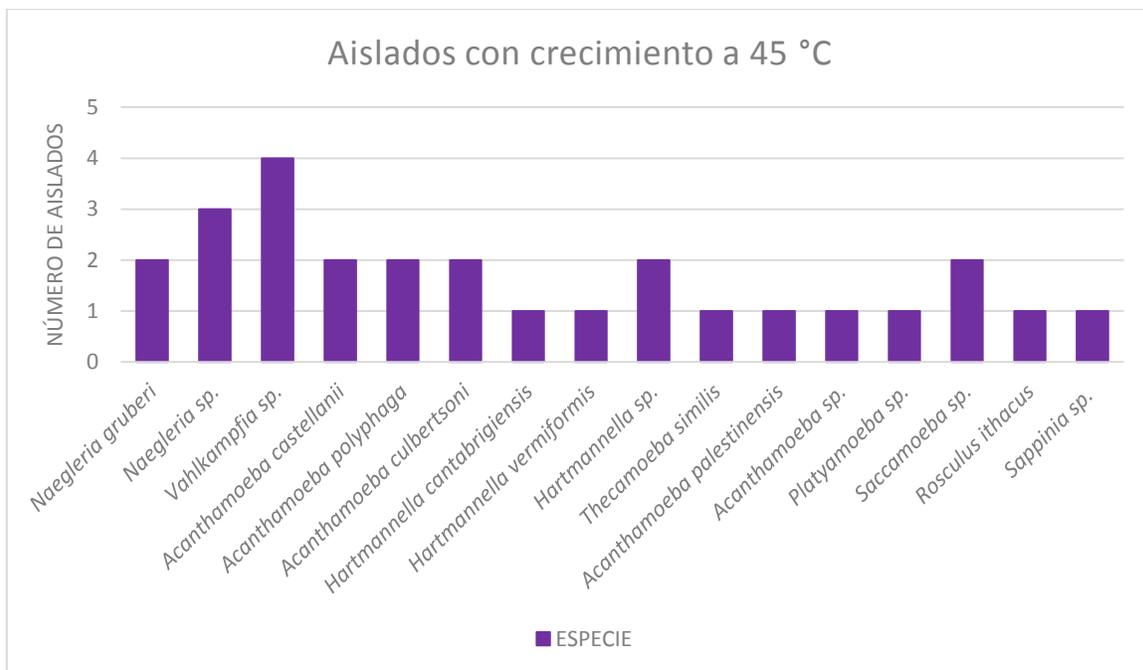


Figura 29. Frecuencia de aislados ambientales con crecimiento a 45 °C

## 7. Parámetros fisicoquímicos del agua

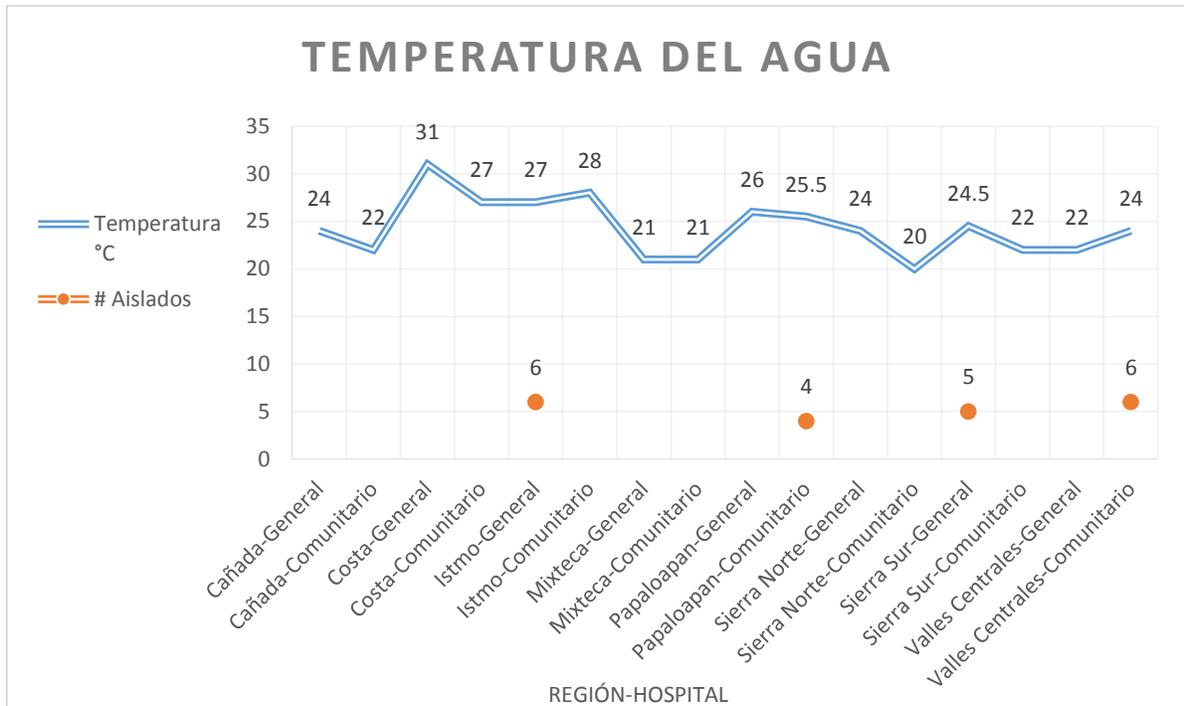
Los parámetros fisicoquímicos fueron tomados del agua del lavabo donde los médicos se lavan las manos antes de realizar la cirugía, los valores registrados pueden ser observados en el anexo IV.

### a) Temperatura

La temperatura del agua fluctuó entre los 20 y 31 °C, obteniéndose una media de 24.3 °C, el valor máximo de temperatura se obtuvo en el Hospital General de la Costa y el mínimo en el Hospital Comunitario de Sierra Norte. Las variaciones entre las temperaturas de las muestras no fueron muy diferentes e incluso la mayoría se encontraron por debajo del valor óptimo para el desarrollo de las AVL patógenas (arriba de los 30 °C) lo cual pudo ser un factor limitante en su desarrollo y diversidad. (Bonilla *et al.*, 2000).

Los aislados positivos fueron obtenidos del Hospital General del Istmo donde se registró una temperatura de 27 °C, Hospital Comunitario de Papaloapan (25.5 °C), Hospital General Sierra Sur (24.5 °C) y del Hospital Comunitario de Valles Centrales (24 °C) (Fig. 30).

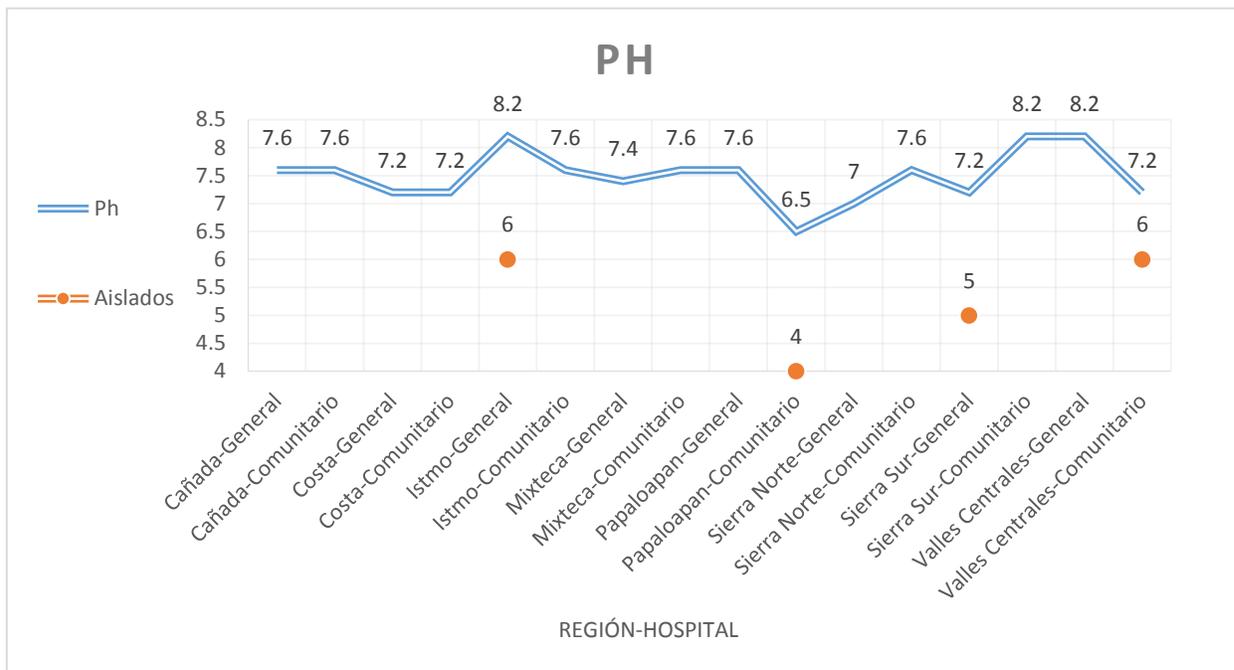
El mayor número de aislamientos se obtuvo de sitios con una temperatura de 27 y 24 °C. Posiblemente esto se debe a que a altas temperaturas disminuye la colonización de AVL, esto lo demuestran Canals y colaboradores en 2015 donde obtuvieron una mayor cantidad de aislados en muestras con temperaturas bajas (27.8±5.8 °C), ellos realizaron esta investigación con el fin de comprobar el método de desinfección utilizado en sistemas de agua para remover microorganismos patógenos por medio de altas temperaturas donde observan que la cantidad de AVL se ve claramente reducida a temperaturas mayores de 50 °C.



**Figura 30. Valores registrados de temperatura y número de aislados positivos por hospital en cada región del estado de Oaxaca**

## b) pH

El pH presentó valores cercanos a la neutralidad, con un promedio de 7.4, un valor mínimo de 6.5 registrado en el Hospital Comunitario de la región del Papaloapan en donde fueron obtenidos cuatro aislados positivos, un valor máximo de 8.2 que se registró en el Hospital General de la región del Istmo (donde se obtuvieron seis aislados), Hospital Comunitario de Sierra Sur y Hospital General de Valles Centrales. Los demás aislados fueron obtenidos de hospitales donde el valor registrado de pH fue de 7.2 (Fig. 31). Estos valores se encuentran dentro de los límites permisibles que se indican en la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994, "salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización", sin embargo, los intervalos de tolerancia de pH para las AVL fluctúan de 4.6 a 9.5 (Bonilla y Ramírez, 1993) por lo que este factor no parece ser limitante para el desarrollo de las AVL, incluso para el género *Naegleria* los valores de pH cercanos a la neutralidad son factores favorables para su desarrollo (Bonilla *et al.*, 2004)

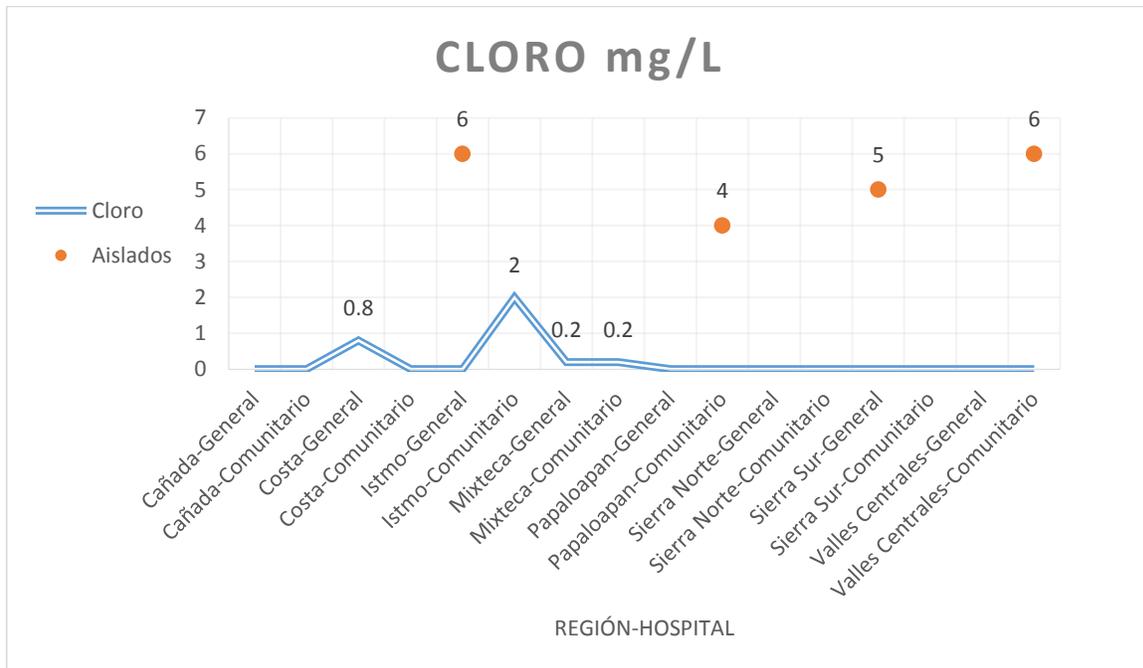


**Figura 31. Valores registrados de pH y número de aislados positivos por hospital en cada región**

### c) Cloro libre residual

Los valores registrados de cloro en las muestras de agua oscilan entre 0 y 2.0 ppm, con un promedio de 0.18ppm. Todos los aislados positivos fueron obtenidos de muestras cuyo valor de cloro registrado fue 0 ppm (Fig. 32). Cabe mencionar que según la NOM.127-SSSA1-1994 los valores permisibles son de 0.2 a 1.50 mg/L, por lo que los valores obtenidos en las muestras están fuera de los límites, además nuevamente es importante mencionar que AVL del género *Acanthamoeba* (principalmente su quiste) son capaces de resistir extremas condiciones de temperatura, pH y exposición a diversos químicos. La presencia de este protozoo en el ambiente hospitalario representa un riesgo de salud a trabajadores, pacientes y otros individuos que circulen en estas locaciones (Carlesso *et al.*, 2009). Los resultados de Canals y colaboradores en 2015 muestran que las altas concentraciones de cloro ( $7.5 \pm 1.5$  mg cloro  $L^{-1}$ ) reducen la presencia de AVL en un 63.8 % comparado con muestras con bajas concentraciones de cloro ( $0.04 \pm 0.08$  mg cloro  $L^{-1}$ ), sin embargo observaron algunas amibas en muestras

colectadas con un nivel de 8 mg cloro L<sup>-1</sup>) lo cual podría indicar que *Acanthamoeba* spp. es resistente a la continua desinfección con cloro, método de desinfección usado regularmente.



**Figura 92. Valores registrados de cloro y número de aislados positivos por hospital en cada región**

## VIII. CONCLUSIONES

En 12 de los 16 hospitales (en su mayoría comunitarios) hubo presencia de organismos amibianos.

Se obtuvo un 18.75 % de muestras positivas para amibas de vida libre.

Se obtuvieron 60 aislados que corresponden a 12 géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Hartmannella*, *Vannella*, *Thecamoeba*, *Saccamoeba*, *Rhizamoeba*, *Platyamoeba*, *Rosculus*, *Sappinia* y *Paratetramitus*.

*Acanthamoeba* fue el género más abundante sobre los demás con un 25 %; los géneros con menor presencia fueron *Sappinia* y *Paratetramitus* con un 2%.

Se aislaron especies de AVL de importancia médica entre las que se encuentran: *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. palestinensis*, *A. triangularis*, *Naegleria* sp y *Sappinia* sp.

La mayoría de los aislados positivos fueron provenientes de la biopelícula de lavabo (57 %) y del agua de lavabo (36 %), aunque también se encontró contaminación biológica en las mesas de cirugía (7 %).

Entre los géneros que crecieron a 45 °C se encuentran *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, por lo que es importante considerar su posible patogenicidad.

En cuanto a los parámetros fisicoquímicos no se encontraron variaciones significativas en cuanto a la temperatura; los valores de pH encontrados están dentro de los límites permisibles de las normas y en cuanto al cloro libre residual, los aislados se obtuvieron en muestras cuyos valores están por debajo de los límites permisibles estipulados en la NOM-127-SSA1-1994.

## IX. RECOMENDACIONES

La presencia de AVL en quirófanos de hospitales puede considerarse una situación de riesgo para los pacientes de contraer una infección intrahospitalaria, especialmente porque en su mayoría son individuos con sistema inmunológico comprometido, por lo que es importante que se lleven a cabo las normas oficiales y medidas de prevención que ya están descritas en los procedimientos de limpieza como las que se mencionan a continuación:

- ❖ Desinfección total y continua en toda el área, especialmente en aquellas donde tenga contacto directo el paciente o el personal médico, por ejemplo, las mesas de cirugía.
- ❖ Remoción de las biopelículas adheridas a los lavabos donde el personal médico se lava las manos.
- ❖ Limpieza de la zona de suministro de agua y aplicación de desinfectantes de acuerdo a lo estipulado en la NOM-127-SSA1-1994.
- ❖ Cumplir con las indicaciones de la NOM-045-SSA2-2004 para tener un control y prevención de las infecciones intrahospitalarias.
- ❖ Revisión constante de los suministros de agua de los hospitales.
- ❖ Por otra parte, también se recomienda continuar con estudios de identificación a nivel molecular para identificar las especies de AVL potencialmente patógenas.

## X. BIBLIOGRAFÍA

Adl, S. M., Simpson, A. G. M., Lane, C. E., Lukes, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Laraj, E., Gall, L., Lynn, D. H., Mcmanus, H., Mitchell, E., Stanridge, S. E., Parfrey, L., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C., Smirnov, A. y Spiege, F. 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* **59** (5): 429-493.

Alexandrakis, G., Miller, D. y Huang, A. 1998. Amoebic keratitis due to *Vahlkampfia* infection following corneal trauma. *Arch. Ophthalmol.* **116** (7): 950-951.

Alexeieff, A. 1912. Sur quelques noms de genres des flagellés qui doivent disparaître de la nomenclature pour cause de synonymie ou pour toute autre raison. Diagnoses de quelques genres récemment étudiés. *Zool. Anz.* **39**: 674-680.

Barbeau, J. y Buhler, T. 2001. Biofilms augment the number of free-living amoebae in dental unit waterlines. *Res. Microbiol.* **152**: 753-760.

Barker, J. y Brown, R. M. 1994. Trojan Horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol.* **140**: 1253-1259.

Bonilla, L. P., Ramírez, E., Ortiz, R. y Eslava, C. 2004. La ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. *En: Microbiología ambiental. México. INE-SEMARNAT.* pp. 67-81.

Bonilla, P. y E. Ramírez. 1993. Sistema de tratamiento de lecho de raíces: Las amebas de vida libre. *Revista Ciencia y Tecnología.* **15**: 22-25.

Cabello, V. A. 2015. *Acanthamoeba* spp. un agente oportunista en infecciones humanas. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener* **4**:11-32.

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

Calderón, V. A. 2008. *Aislamiento de la Amiba Patógena Naegleria fowleri del Agua de los Canales de Riego de Mexicali, Baja California*. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Experimental). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 84 p.

Canals, O., Serrano, S. A., Salvadó, H., Méndez, J., Cervero, A. S., Ruiz, V. Dellundé, J. y Araujo, R. 2015. Effect of chlorine and temperatura on free-living protozoa in operational man-made wáter systems (cooling towers and hot sanitary water systems) in Catalonia. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **22**: 6610-6618.

Carlesso, M. A., Braga, S. A., Lazzari, A. G. y Brittes, R. M. 2007. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **40** (3): 316-320.

Carlesso, M.A., Lazzari, A. G., Caumo, K. y Brittes, R. L. 2009. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brasil. *Curr. Microbiol.* **60** (3): 185-190.

Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderon, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez y E., Suarez, G. 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and cronchopneumonia. *Arch. Med. Res.* **27**: 579-586.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2013. Free Living Amebic Infections. Recuperado el 15 de Marzo de 2016. Disponible en línea: <http://www.cdc.gov/dpdx/freeLivingAmebic/index.html>

Chatton, E. y Lalung, B. 1912. Amibe limax (*Vahlkampfia* n. gen.) dans l'intestin humain. Son importance pour l'interprétation des amibes de culture. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **5**: 135-143.

Clarke, D. W. y Niederkorn, J. Y. 2006. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends. Parasitol.* **22** (4): 175-180.

Cortés, C. 2010. *Guía para el Estudio de los Protistas de Vida Libre: Protozoos*. Tesina de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 71 p.

Coulon, C., Collignon, A., McDonnell, G. y Thomas V. 2010. Resistance of *Acanthamoeba* cyst to disinfection treatments used in health care settings. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 2689-2697

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

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

De Jonckheere, F. J., 2004. Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Protist.* **155**: 89-103.

Dirección General de Epidemiología (DGE). Casos de Meningoencefalitis amebiana primaria (B60.2, G05.2) por fuente de notificación. Recuperado el 14 de Enero de 2016. Disponible en línea: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2008/casos/fuente/068.pdf>

Dirección General de Evaluación de Desempeño (DGED). Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. 2011. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones públicas de salud. Recuperado el 14 de Enero de 2016. Disponible en línea: [http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/estudios\\_especiales/NOSOCOMIAL\\_SE.pdf](http://www.dged.salud.gob.mx/contenidos/dess/descargas/estudios_especiales/NOSOCOMIAL_SE.pdf)

Donlan, R. M., Forster, T., Murga, R. Brown, E., Lucas, C., Carpenter, J. y Fields, B. 2005. *Legionella pneumophila* associated with the protozoan *Hartmannella*

*vermiformis* in a model multi-species biofilm has reduced susceptibility to disinfectants. *Biofouling*. **21**: 1-7.

Dupuy, M., Berne, F., Herbelin, P., Binet, M., Berthelot, N., Hélène, M., Soreau, S. y Hèchard, Y. 2014. Sensitivity of free-living amoeba trophozoites and cysts to water disinfectants. *Int. J. Hyg. Environ. Health*. **217**: 335-339.

Encyclopedia of Life (EOL). Paratetramitus, 1976. Recuperado el 16 de Marzo de 2016. Disponible en línea: <http://eol.org/pages/2910650/overview>

Ferrante, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite. Immunol.* **13**: 31-47

Fields, B. S., Benson, R. F. y Besser, R. E. 2002. *Legionella* and Legionnaire's Disease: 25 Years of Investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (3): 506-526.

Gallegos, N. E. 1997. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuerpos de agua de uso recreativo en el estado de San Luis Potosí. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 132 p.

García, G. L., Jiménez, C. M., Ramírez, L. L., Báez, S. R., Ferreyra, R. L., Ferreira, G. E., Cano, A. B., Téllez, V. N., Verduzco, R. L., Jaramillo, C. Y., Luna, T. E. y Ponce, R. S. 2010. Surveillance of nosocomial infections in a Mexican community hospital. How are we doing? *Salud Pública Mex.* **52** (6): 511-516.

García, Vera. 2011. Introducción a la Microbiología. 2da Ed. EUNED. 153 pp.

Gelman, B. B., Rauf S. J., Nader, R., Popov, V., Borkowski, J., Chaljub, G., Nauta, H. W. y Visvesvara, G. S. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA*. **285** (19): 2450–2455.

Gelman, B. B., Popov, V., Chaljub, G., Nader, R., Rauf, S. J. y Nauta, H. W. 2003. Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62** (10): 990-998.

Guzmán, F. E., De Jonckheere, F. J. y Lares, V. F. 2008. Identification of *Naegleria* species in recreational areas in Hornos, Sonora. *Rev. Mex. Biodiv.* **79**: 1-5.

Harf, C. 1994. Free-living amoeba: interactions with environmental pathogenic bacteria. *Endocytobiosis & Cell. Res.* **10**: 167-183.

Hay, J., Seal, D. V. y Kirkness, C. M. 1997. Non *Acanthamoeba* amoebic keratitis. *J. Infect.* **34**: 89-91.

Huws, A. S., Morley, J. R., Jones, V. M., Brown, R. M. y Smith W. A. 2008. Interactions of some common pathogenic bacteria with *Acanthamoeba polyphaga*. *FEMS Microbiol. Lett.* **208**: 258-265.

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). 2009. Manual de procedimientos del servicio quirófano. Recuperado el 14 de Enero de 2016. Disponible en línea: <http://www.iner.salud.gob.mx/media/85587/quiروفano.pdf>

Integrated Taxonomic Information System (ITIS). Recuperado el 16 de Marzo de 2016. Disponible en línea: <http://www.itis.gov/>

Kilvington, S., Beeching, R. J. y White, G. D. 1991. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *J. Clin. Microbiol.* **9** (2): 310-314.

Kinnear, F.B. 2003. Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Hartmannella*: quantitative & qualitative *in vitro* studies on keratocytes. *J. Infect.* **46**: 228-237.

Lares, J. y Lares, V. F., 2009. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales.* **5** (2): 161-167

Lasjerdi, Z., Niyayati, M., Haghghi, A., Shahabi, S., Tahvildar, F., Taghipour, N., Eftekhar, M. y Nazemalhosseini, E. 2011. Potentially pathogenic free-living

amoebae isolated from hospitals wards with immunodeficient patients in Tehran, Iran. *Parasitol. Res.* **109** (3): 575-580.

Laybourn, P. J. 1984. A functional biology of free-living protozoa. University California Press. Los Angeles, California. 218 pp.

Ledesma, R. R. 2009. Manual de procedimientos del servicio de quirófano. Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Secretaria de Salud. [Consulta 8 de Agosto de 2015] Disponible en línea: [www.iner.salud.gob.mx/media/85587/quirofano.pdf](http://www.iner.salud.gob.mx/media/85587/quirofano.pdf)

Marciano, C. F. y Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* **16** (2): 273–307.

Matin, A., Siddiqui, R., Jayasekera, S. y Ahmed, N. K. 2008. Increasing importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clin. Microbiol. Rev.* **21** (3): 435-448.

Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L. y Jongwutiwes, S. 2010. Identification of a Novel T17 Genotype of *Acanthamoeba* from Environmental Isolates and T10 Genotype Causing Keratitis in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* **48** (12): 4636-4640.

Omaña, M. M., González, R. A., Salazar, V. L., Cristóbal, R. A., González, L. M., Salinas, M. E., Méndez, C. R., Sánchez, C. M., De la Torre, G. E. y Martínez, P. A. 2010. *Acanthamoeba castellanii*: Morphological analysis of the interaction with human cornea. *Exp. Parasitol.* **126**: 73-78.

Ordoñez, M. 2000. El territorio de estado de Oaxaca: una revisión histórica. *Invest. Geog.* **42**: 67-86.

Ovrutski, A. R., Chan, E. D., Kartalija, M. M., Bai, X., Jackson, M., Gibbs, S., Falkinham, J. O., Iseman, M. D., Reynolds, P. R., McDonnell, G. y Thomas, Vincent. 2013. Concurrence of free-living amoebae and nontuberculous mycobacteria in hospital water networks, and preferential growth of *Mycobacterium avium* in *Acanthamoeba lenticulata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **79** (10): 3185-3192.

Page, F. C. 1969. *Platyamoeba stenopodia*. N. g., n. sp., a Freshwater Amoeba. *J. Protozool.* **16**: 437-441.

Page, F. C. 1974. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of new species and a key to genera. *Arch. Protistenk.* **114**: 404-420.

Page, F.C. 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. Freshwater Biological Association. Cumbria, England. 122 pp.

Pagnier, I., Valles, C., Raoult, D. y La Scola, B. 2015. Isolation of *Vermamoeba vermiformis* and associated bacteria in hospital water. *Microb. Pathog.* **80**: 14-20.

Pérez, M. L., Zurita, V. I., Pérez, R. N., Patiño, C. N., Calvimonte, O. 2010. Infecciones intrahospitalarias: agentes, manejo actual y prevención. *Rev. Cient. Cienc. Med.* **13** (2): 94-98.

Ponce, L. S., Rangel, F. S., Elías, J. I., Romero, O. C. y Huertas, J. M. 1999. Infecciones nosocomiales: tendencias seculares de un programa de control en México. *Salud Pública de México.* **41**: 5-11.

Retana, M. L., Abrahams, S. E., Cabello, V. A., Reyes, B. M., Valladares, B., Martínez, C. E., Piñero, J. E. y Lorenzo, M. J. 2014. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* and *Balamuthia mandrillaris* from combination shower units in Costa Rica. *Parasitol. Res.* **113** (11): 4117-4122.

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

Ruiz, M. M. 2011. Políticas Públicas en Salud. Tesis de Doctorado en Estudios Fiscales. Universidad Autónoma de Sinaloa. Facultad de Contaduría y Administración. 298 p.

Secretaría de Salud. "Salud ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización". Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. Diario Oficial de la Federación, 30 de Noviembre de 1995.

Secretaría de Salud. "Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales". Norma Oficial Mexicana NOM-045-SSA2-2005. Diario Oficial de la Federación, 8 de Diciembre de 2005.

Schaeffer, A. A. 1926. Taxonomy of the amebas. *Carnegie Inst. Wash. Publ.* **345**: 1-116.

Scheid, P. 2014. Relevance of free-living amoebae as hosts for phylogenetically diverse microorganisms. *Parasitol. Res.* **113**: 2407-2414.

Schuster, L. F. y Visvesvara, S. G. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* **34** (9): 1001–1027.

Sigala, R. I. 2008. *Registro Protozoológico en Cinco Biotopos de los Riscos Querétaro, México*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM. México. 110 p.

Silvia, M. A. y Rosa, J. A. 2003. Isolamento de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em poeira de hospitais. Isolation of potentially pathogenic free-living amoebae in hospital dust. *Rev. Saúde Pública* **37** (2): 242-6.

Smirnov V. A. 2002. Vertical distribution and abundance of gymnamoebae (Rhizopoda) in bottom sediments of the brackish-water Niva Bay (Baltic Sea, the Sound). *Protist.* **153**: 238-250.

Smirnov. V. A. y Brown, S. 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protist.* **3** (3): 148-190.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. y Costerton, J.W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**: 187-209.

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

Thomas, V., Loret, J. F., Jousset, M. y Greub, G. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environ. Microbiol.* **10**: 2728-2745.

Trabelsi, H., Dendana, F., Neji, S., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Makni, F. y Ayadi, A. 2015. Morphological and molecular identification of free living amoeba isolated from hospital water in Tunisia. *Parasitol. Res.* **115**: 431-435.

Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. y Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol. Biol.* **60** (6): 399-405.

Uribarren, B. 2015. *Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia*. Recuperado el 14 de Enero de 2016, del sitio web del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en línea: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html>

Vinuesa, M. A. (2004). Indicadores de calidad en limpieza e higiene hospitalaria. VI Jornadas nacionales sobre avances en medicina preventiva. Vileda Ibérica División Profesional. Madrid, España.

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

Walochnik, J., Wylezich, C. y Michel, R. 2010. The genus *Sappinia*: History, phylogeny and medical relevance. *Exp. Parasitol.* **126**: 4-13.

Wilson, C. W. 1916. On the life history of a soil amoebae. University of California publications in zoology. pp 292.

# XII. ANEXOS

- **Anexo I.- Nomenclatura de las muestras colectadas**

<b>Región</b>	<b>Hospital</b>	<b>Sitio de muestreo</b>	<b>Clave</b>
<b>1.Cañada</b>	A. Hospital General " Dr. Alberto Vargas Merino" de San Juan Bautista Cuicatlán	1.Agua de lavabo	<b>1AU1</b>
		2.Biopelícula de lavabo	<b>1AU2</b>
		3.Polvo de mesa de cirugía	<b>1AU3</b>
		4.Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>1AU4</b>
	B. Hospital Básico Comunitario de Doce Camas de Teotitlán de Flores Magón	1.Agua de lavabo	<b>1BU1</b>
		2.Biopelícula de lavabo	<b>1BU2</b>
		3.Polvo de mesa de cirugía	<b>1BU3</b>
		4.Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>1BU4</b>
<b>2.Costa</b>	A. Hospital General "Dr. Pedro Espinoza Rueda de Pinotepa, Santiago Pinotepa Nacional	1.Agua de lavabo	<b>2AU1</b>
		2.Biopelícula de lavabo	<b>2AU2</b>
		3.Polvo de mesa de cirugía	<b>2AU3</b>
		4.Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>2AU4</b>
	Hospital Básico Comunitario de Santa Catarina Juquila	1.Agua de lavabo	<b>2BU1</b>
		2.Biopelícula de lavabo	<b>2BU2</b>
		3.Polvo de mesa de cirugía	<b>2BU3</b>
		4.Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>2BU4</b>
<b>3.Istmo</b>	A. Hospital General con Especialidades de Salina Cruz	1.Agua de lavabo	<b>3AU1</b>
		2.Biopelícula de lavabo	<b>3AU2</b>
		3.Polvo de mesa de cirugía	<b>3AU3</b>
		4.Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>3AU4</b>
	B. Hospital Básico Comunitario de Santo Domingo Tehuantepec	1.Agua de lavabo	<b>3BU1</b>
		2.Biopelícula de lavabo	<b>3BU2</b>
		3.Polvo de mesa de cirugía	<b>3BU3</b>
		4.Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>3BU4</b>
<b>4.Mixteca</b>	A. Hospital General "E.S.P. Pilar Sánchez Villavicencio" de Huajuapán de León	1.Agua de lavabo	<b>4AU1</b>
		2.Biopelícula de lavabo	<b>4AU2</b>
		3.Polvo de mesa de cirugía	<b>4AU3</b>
		4.Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>4AU4</b>
	B. Hospital Básico Comunitario de Asunción Nochixtlán	1.Agua de lavabo	<b>4BU1</b>
		2.Biopelícula de lavabo	<b>4BU2</b>
		3.Polvo de mesa de cirugía	<b>4BU3</b>
		4.Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>4BU4</b>
<b>5.Papaloapan</b>	A. Hospital General de San Juan Bautista Tuxtepec	1.Agua de lavabo	<b>5AU1</b>
		2.Biopelícula de lavabo	<b>5AU2</b>
		3.Polvo de mesa de cirugía	<b>5AU3</b>
		4.Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>5AU4</b>

		instrumental quirúrgico	
	B. Hospital Básico Comunitario de Loma Bonita	1. Agua de lavabo	<b>5BU1</b>
		2. Biopelícula de lavabo	<b>5BU2</b>
		3. Polvo de mesa de cirugía	<b>5BU3</b>
		4. Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>5BU4</b>
<b>6. Sierra Norte</b>	A. Hospital General María Lombardo de Caso	1. Agua de lavabo	<b>6AU1</b>
		2. Biopelícula de lavabo	<b>6AU2</b>
		3. Polvo de mesa de cirugía	<b>6AU3</b>
		4. Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>6AU4</b>
	B. Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez	1. Agua de lavabo	<b>6BU1</b>
		2. Biopelícula de lavabo	<b>6BU2</b>
		3. Polvo de mesa de cirugía	<b>6BU3</b>
		4. Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>6BU4</b>
<b>7. Sierra Sur</b>	A. Hospital General de Putla de Guerrero	1. Agua de lavabo	<b>7AU1</b>
		2. Biopelícula de lavabo	<b>7AU2</b>
		3. Polvo de mesa de cirugía	<b>7AU3</b>
		4. Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>7AU4</b>
	Hospital Básico Comunitario de La Paz Teojomulco- Texmelucan	1. Agua de lavabo	<b>7BU1</b>
		2. Biopelícula de lavabo	<b>7BU2</b>
		3. Polvo de mesa de cirugía	<b>7BU3</b>
		4. Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>7BU4</b>
<b>8. Valles Centrales</b>	A. Hospital General "Dr. Aurelio Valdivieso"	1. Agua de lavabo	<b>8AU1</b>
		2. Biopelícula de lavabo	<b>8AU2</b>
		3. Polvo de mesa de cirugía	<b>8AU3</b>
		4. Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>8AU4</b>
	B. Hospital de la Niñez Oaxaqueña	1. Agua de lavabo	<b>8BU1</b>
		2. Biopelícula de lavabo	<b>8BU2</b>
		3. Polvo de mesa de cirugía	<b>8BU3</b>
		4. Polvo de mesa de instrumental quirúrgico	<b>8BU4</b>

- **Anexo II.- Medio NNE (agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes*)**

El medio NNE proporciona sales y principalmente una fuente de carbono que proviene de las bacterias, ambos elementos son necesarios para el crecimiento y desarrollo de las amibas (Calderón, 2008).

Reactivos:

- ❖ NaCl ----- 0.12g
- ❖ MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O ----- 0.004g
- ❖ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ----- 0.146g
- ❖ CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O ----- 0.004g
- ❖ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ----- 0.136g
- ❖ Bactoagar ----- 15g
- ❖ Agua destilada ----- 1000mL

Procedimiento:

Mezclar todos los componentes en seco y después agregar el agua destilada agitar hasta homogeneizar la solución y posteriormente calentar hasta ebullición, se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Verter en placas Petri un volumen aproximado de 15 a 20ml.

Dejar solidificar el agar y agregar una suspensión de bacterias *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor, la cual se distribuye homogéneamente por toda la superficie del medio con una varilla estéril.

Las placas se dejan reposar aproximadamente una hora y finalmente son guardadas de manera invertida en bolsas de plástico selladas y marcadas en el refrigerador hasta su posterior uso.

- **Anexo III. Inactivación de *Enterobacter aerogenes***

La cepa bacteriana inactivada funciona como fuente de carbono necesaria para el crecimiento de las AVL (Gallegos, 1997).

**Materiales**

- ❖ Agar nutritivo
- ❖ Cepa de *Enterobacter aerogenes*

**Material estéril**

- ❖ Asa de siembra
- ❖ Varilla de vidrio en L
- ❖ Tubos con tapón de rosca
- ❖ Agua destilada
- ❖ Aplicadores de madera
- ❖ Pipetas Pasteur con bulbo
- ❖ Placas Petri

**Procedimiento**

Mezclar 15 g de agar nutritivo con 1000 ml de agua destilada y dejar calentar hasta ebullición, posteriormente esterilizar a 121 °C durante 15 minutos y al finalizar verter en placas Petri estériles, cuando solidifique el agar, guardar en bolsas marcadas y conservar en refrigeración hasta su posterior uso.

En este medio de cultivo realizar una resiembra de una colonia de la cepa de *Enterobacter aerogenes* y conservar en incubación a 37 °C durante 24 horas, transcurridas las 24 horas mantener en refrigeración, esta resiembra es para la conservación de la cepa y deberá realizarse aproximadamente cada dos meses.

De la cepa original de *Enterobacter aerogenes* realizar una resiembra en el medio nutritivo con los aplicadores para distribuir de manera uniforme la bacteria por toda la placa (resembrar la cantidad que se considere necesaria de placas), esta se mantendrá en incubación durante 24 horas a 37 °C, transcurridas las 24 horas la bacteria será cosechada agregando dos pipetas con agua estéril y haciendo un barrido con una varilla de vidrio, colocar este concentrado con una pipeta Pasteur en un tubo con tapón de rosca (colocar el concentrado de 3 o 4 cajas aproximadamente por tubo). La bacteria contenida en los tubos se inactivará colocándolos en baño de agua a 70 °C durante 30 minutos, al finalizar esto se mantendrán en refrigeración hasta su posterior uso (Gallegos, 1997).

#### Anexo IV.- Valores fisicoquímicos por sitio de muestreo

Región	Hospital	Factor fisicoquímico	Parámetro
Cañada	A) Hospital General "Dr. Alberto Vargas Merino" de San Juan Bautista Cuicatlán	pH	7.6
		Cl	0.0
		Temp.	24°C
	B) Hospital Básico Comunitario de Doce Camas de Teotitlán de Flores Magón	pH	7.6
		Cl	0.0
		Temp.	22°C
Costa	A) Hospital General "Dr. Pedro Espinoza Rueda" de Pinotepa, Santiago Pinotepa Nacional	pH	7.2
		Cl	0.8
		Temp.	31.5°C
	B) Hospital Básico Comunitario de Santa Catarina Juquila	pH	7.2
		Cl	0.0
		Temp.	27°C
Istmo	A) Hospital General con Especialidades de Salina Cruz	pH	8.2
		Cl	0.0
		Temp.	27°C
	B) Hospital Básico Comunitario de Santo Domingo Tehuantepec	pH	7.6
		Cl	2.0 ppm
		Temp.	28°C
Mixteca	A) Hospital General "E.S.P. Pilar Sánchez Villavicencio" de Huajuapán de León	pH	7.4
		Cl	0.2 ppm
		Temp.	21°C
	B) Hospital Básico Comunitario de Asunción Nochixtlán	pH	7.6
		Cl	0.0
		Temp.	21°C
Papaloapan	A) Hospital General de San Juan Bautista Tuxtepec	pH	7.6
		Cl	0.0
		Temp.	26°C
	B) Hospital Básico Comunitario de Loma Bonita	pH	6.5
		Cl	0.0
		Temp.	25.5°C
Sierra Norte	A) Hospital General María Lombardo de Caso	pH	7.0
		Cl	0.0
		Temp.	24°C
	B) Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez	pH	7.6
		Cl	0.0
		Temp.	20°C
Sierra Sur	A) Hospital General Putla de Guerrero "Amigo Del Niño Y De La Madre"	pH	7.2
		Cl	0.0
		Temp.	24.5°C
	B) Hospital Básico Comunitario de La Paz	pH	8.2

	Teojomulco-Textmelucan	Cl	0.0
		Temp.	22°C
Valles Centrales	A) Hospital General "Dr. Aurelio Valdivieso"	pH	8.2
		Cl	0.0
		Temp.	22°C
	B) Hospital de la Niñez Oaxaqueña	pH	7.2
		Cl	0.0
		Temp.	24°C