

00381 Ri



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

AMIBAS DE VIDA LIBRE POTENCIALMENTE PATOGENAS EN
CUERPOS DE AGUA DE USO RECREATIVO EN EL ESTADO DE
SAN LUIS POTOSI

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGÍA)

P R E S E N T A :

ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA

DIRECTOR DE TESIS
CODIRECTORA DE TESIS

DR. JUAN PEDRO LACLETTE SAN ROMAN
DRA. MARIA ANTONIETA ALADRO LUBEL

MÉXICO, D.F.

1997.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedico este trabajo a la memoria del Dr. Fermín
Rivera Agüero, querido profesor y amigo,
motivación y ejemplo a seguir
a quien nunca olvidaré.

*"Deseo tener un corazón que lata al ritmo de la vida y
que sea mi esencia más pura la de ser pensante..."*

F. Rivera A.

Agradecimientos

Al Dr. Juan Pedro Laclette San Román Director de la Tesis por su valiosa ayuda y apoyo moral e intelectual durante la realización de este estudio.

A la Dra. María Antonieta Aladro Lubel Codirectora de Tesis por su amistad, valiosa dirección y constante apoyo para la terminación de este trabajo.

A mi querido profesor Dr. Teófilo Herrera Suárez pilar sólido de la Universidad con mi profundo agradecimiento.

A mis revisores de Tesis por sus acertadas sugerencias y observaciones acerca de este trabajo:

Dra. Irma Rosas Pérez

Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez

Dr. Zenón Cano Santana

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

A mi amado esposo, compañero de toda la vida, gracias por su apoyo y ayuda para terminar mi carrera.

A mis padres y familia por su amor, apoyo y estímulo para salir siempre adelante.

A la Q. F. B. Esperanza Robles Valderrama por su amistad y valiosa ayuda.

A la Dra. Gloria Vilaclara Fatjó por su amistad y desinteresada colaboración.

A todos mis amigos y colaboradores del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente de la UNAM Campus Iztacala por su cooperación y apoyo.

A mi querida Universidad Nacional Autónoma de México.

Con reconocimiento especial a la DGAPA que con su respaldo al Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente hizo posible la realización de esta Tesis.

Al Gobierno del Estado de San Luis Potosí, a la UASLP Unidad Zona Huasteca y al Hospital General de Ciudad Valles.

CONTENIDO

LISTADO DE ABREVIATURAS	i
I. RESUMEN	1
ABSTRACT	2
II. INTRODUCCIÓN	3
1. AMIBAS DE VIDA LIBRE	3
2. INFECCIONES AMIBIANAS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL HUMANO	4
3. INFECCIONES AMIBIANAS EN OTROS ORGANISMOS	6
4. MECANISMOS DE CITOPATOGENICIDAD	7
5. RESUMEN HISTÓRICO DE LAS INFECCIONES POR AMIBAS DE VIDA LIBRE	10
6. ECOLOGÍA DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE	12
7. CICLOS DE VIDA	13
a. <i>Naegleria</i>	13
b. <i>Acanthamoeba</i>	14
8. TAXONOMÍA DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS DE AMIBAS DE VIDA LIBRE	15
9. RESPUESTA INMUNE	17
10. DIAGNÓSTICO	18
11. TRATAMIENTO	20
a. Meningoencefalitis amibiana primaria	20
b. Encefalitis amibiana granulomatosa	21
12. PREVENCIÓN Y CONTROL	22
III. ANTECEDENTES EN MÉXICO	24
1. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA	24
2. JUSTIFICACIÓN	25

IV. OBJETIVOS	26
1. OBJETIVO GENERAL.....	26
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
V. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	27
1. EL ESTADO DE SAN LUIS POTOSÍ.....	27
2. LA HUASTECA POTOSINA.....	27
a. Localización e importancia.....	27
b. Clima.....	28
c. Vegetación.....	29
3. DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE ESTUDIO.....	29
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	33
1. RECOLECTA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS.....	33
a. Agua.....	33
b. Sedimento.....	33
2. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE AMIBAS DE VIDA LIBRE.....	34
a. Aislamiento de amibas de vida libre.....	34
b. Clonación.....	34
c. Identificación.....	34
d. Pruebas de transformación ameboflagelar.....	35
e. Axenización.....	35
f. Material biológico de referencia.....	35
g. Pruebas de isoenzimas.....	36
h. Pruebas de patogenicidad en ratones.....	37
i. Estimación cuantitativa de amibas.....	38
3. NIVELES DE INFESTACIÓN DEL AGUA.....	39
4. FACTORES AMBIENTALES.....	39
a. Determinaciones en el campo.....	39
b. Determinaciones en el laboratorio.....	40
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	40
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
1. AMIBAS DE VIDA LIBRE EN LAS MUESTRAS RECOLECTADAS.....	41
2. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE AMIBAS DE VIDA LIBRE.....	47

3. IDENTIFICACION DE AISLADOS	
POR ISOENZIMAS	49
Isoenzimas del género <i>Naegleria</i>	49
Isoenzimas del género <i>Hartmannella</i>	50
Isoenzimas del género <i>Acanthamoeba</i>	50
4. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD	
EN ANIMALES DE LABORATORIO	55
5. RELACIÓN DE LAS AMIBAS CON LOS	
FACTORES AMBIENTALES.....	59
a. Determinaciones en el campo	59
b. Determinaciones de laboratorio	63
c. Correlación entre las amibas de vida libre	
y los parámetros ambientales	65
d. Nivel de infestación del agua	68
6. ANÁLISIS DE CASOS POTENCIALES DE	
INFECCIONES AMIBIANAS EN EL	
HOSPITAL GENERAL DE CD. VALLES	70
VIII. CONCLUSIONES	73
IX. RECOMENDACIONES.....	75
X. LITERATURA CITADA	77
XI. ANEXOS.....	98
ANEXO 1. UBICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN	
DE LAS AVI. ENCONTRADAS EN LA	
HUASTECA POTOSINA	98
ANEXO 2. FACTORES AMBIENTALES (RESULTADOS).....	105
ANEXO 3. MEDIOS DE CULTIVO,	
SOLUCIONES Y TINCIONES.....	107
ANEXO 4. ISOENZIMAS (TÉCNICAS	
Y ZIMOGRAMAS)	115

LISTADO DE ABREVIATURAS

AlcDH	alcohol deshidrogenasa
ATCC	American Type Culture Collection
AVL	amibas de vida libre
C	cerebro
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa
CDC	Center for Disease Control
COT	carbono orgánico total
EAG	encefalitis amibiana granulomatosa
ELISA	ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima
FA	fosfatasa ácida
FGM	fosfoglucomutasa
GFI	glucosa fosfato isomerasa
IC	inoculación intracerebral
IEF	isoelectroenfoque
IN	inoculación intranasal
LAP	leucin aminopeptidasa
LCR	líquido cefalorraquídeo
MCAN	material citopatogénico de la amiba <i>Naegleria</i>
MDH	malato deshidrogenasa
MEAP	meningoencefalitis amibiana primaria
NIA	nivel de infestación del agua
NMP	número más probable
NNE	agar no nutritivo con <i>Escherichia coli</i>
N-PFP	<i>Naegleria</i> -proteína formadora de poros
OD	oxígeno disuelto
P	pulmón
PBSGM	medio con fosfatos, biotriptasa, suero y glucosa
PCR	reacción en cadena de polimerasa
PE	propionil esterasa
PE	propionil esterasa
SD	sólidos disueltos
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	sistema nervioso central
SS	sólidos suspendidos
ST	sólidos totales

I. RESUMEN

Se describe una investigación realizada en la Huasteca Potosina para la búsqueda de amibas de vida libre (AVL) con potencial patógeno hacia el humano, de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Vahlkampffia* y *Hartmannella*. Estos organismos viven en todo tipo de ambientes, pero preferentemente donde abunda el agua y la temperatura es elevada. Los muestreos se realizaron en los sistemas recreacionales más populares de la Huasteca Potosina, con características de temperatura elevada, ausencia de cloración y suficiente contenido de materia orgánica. Se obtuvieron 74 aislados de amibas a temperaturas de 42-45 °C para seleccionar las especies patógenas.

Los factores ambientales como la temperatura del agua, pH, carbono orgánico total, oxígeno disuelto y cloro libre tuvieron correlación con la presencia de las amibas en el agua. Otros parámetros como los sólidos, conductividad y la temperatura del ambiente no se correlacionaron con las AVL.

La identificación de los aislados amibianos se basó tanto en criterios morfológicos y de isoenzimas así como con pruebas de flagelación. Se aislaron amibas pertenecientes a tres ordenes, cuatro familias, seis géneros (*Hartmannella*, *Naegleria*, *Echinamoeba*, *Willacertia*, *Vahlkampffia* y *Acanthamoeba*) y 20 especies. Tres aislados no fueron identificados. El número de amibas y la variedad de especies aisladas fue mayor en las piscinas que en los cuerpos de agua naturales. Cinco aislados fueron identificados como *Naegleria fowleri* que es una amiba que se ha descrito extensamente en la literatura como altamente patógena. De los 74 aislados amibianos, 23 mataron a los ratones inocularlos hasta en un 100% en pruebas de patogenicidad. Los géneros patógenos en este estudio fueron *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Vahlkampffia* y *Echinamoeba*. El lapso promedio para la muerte de los ratones inocularlos fue de seis días y los órganos más afectados cerebro y pulmón, sin llegar a afectar severamente a hígado y riñones. Esto indica que la velocidad con que las amibas se desplazan destruyendo tejidos (infección fulminante), es un factor que puede explicar la rapidez con la que se ven afectados los pacientes.

Un estudio retrospectivo sobre expedientes de pacientes con meningoencefalitis del Hospital General de Ciudad Valles, entre el período de 1990 a 1993, mostro que se trata de una enfermedad frecuente. Se detectaron 100 casos de meningoencefalitis, 84 de ellos fueron diagnosticados como infecciones bacterianas por pruebas de laboratorio. En los otros 16 pacientes no se pudo identificar al agente causante de la enfermedad, aunque los síntomas y signos de estos pacientes coinciden con los descritos para infecciones causadas por *Naegleria fowleri*. Estas observaciones sugieren que algunas infecciones cerebrales causadas por amibas de vida libre no son diagnosticadas en esta región del Estado de San Luis Potosí.

ABSTRACT

A survey of free-living amoebae in the Huasteca Potosina, a tropical region in the Northeast of Mexico, is described. Free-living amoebae are ubiquitous organisms which are found in a wide range of aquatic, terrestrial and aerial habitats some genera, such as *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Vahlkampfia* and *Hartmannella*, contain species which are potentially pathogenic for humans. These forms have a predilection for thermal waters. Water samples were taken in several bathing resorts of tourist importance in the state of San Luis Potosí, to be analysed for free-living amoebae and for a range of physicochemical parameters including water and air temperature, chlorine content, pH, dissolved oxygen, conductivity, total organic carbon and solids.

Seventy-four amoebic isolates were obtained from the water samples. Physicochemical parameters such as pH, dissolved oxygen, total organic carbon, water temperature and chlorine appears to statistically correlate with the presence or absence of amoebae.

Three orders, four families, six genera (*Hartmannella*, *Naegleria*, *Echinamoeba*, *Willertia*, *Vahlkampfia*, and *Acanthamoeba*) and 20 different species were identified from the 74 isolates. Three isolates could not be identified. Five isolates were identified as *Naegleria fowleri*, a well known free-living species of amoebae with a high pathogenic potential for humans. Higher concentrations of trophozoites belonging to different species were recovered from artificial swimming pools than from natural ponds or rivers.

Twenty-three of the isolates were found to be highly pathogenic, killing 100% of animals during *in vivo* virulence assays carried out in mice, including intrathecal or intranasal inoculation. The average time required by these amoebae to kill mice was six days, and the most affected organs were the brain and the lungs. The trophozoites did not reach the liver and kidneys, possibly because the rapid death of mice.

A retrospective search for patients with meningoencephalitis was carried out at the General Hospital in Ciudad Valles, including files from 1990 to 1993. Meningoencephalitis of unknown etiology was found to be a frequent diagnosis; 84 out of 100 cases of meningoencephalitis were caused by bacterial infections according to results of laboratory tests. In the remaining 16, the causative agent could not be identified and the symptoms and signs were consistent with those described for *N. fowleri* infections. These observations suggest that brain infections by pathogenic, free-living amoebae, are underdiagnosed in that region of the State of San Luis Potosí.

II. INTRODUCCIÓN

1. AMIBAS DE VIDA LIBRE

Las amibas se encuentran en todo tipo de ambiente y su distribución es cosmopolita. Ocupan un lugar importante en la cadena alimentaria de las comunidades naturales donde hay agua, alimentándose de bacterias, hongos, algas y de otros protoctistas (Wellings *et al.*, 1979; Pelczar *et al.*, 1982).

Las amibas de vida libre (AVL) son un pequeño grupo de protoctistas de gran importancia médica y ecológica. Son organismos oportunistas capaces de producir infecciones en el sistema nervioso central (SNC) y los ojos del ser humano, entre otras. Para describir a las amibas capaces de sobrevivir en vida libre y como endoparásitas ha sido propuesto el término anfizóico (gr. *amphi*, que significa de ambos lados). Estos organismos, también conocidos como amibas "típicas", pertenecen a la subclase *Gymnamoebia* o amibas "desnudas", que carecen de testa o caparazón (Page, 1974, 1976).

Las amibas de vida libre son prácticamente cosmopolitas pues se les encuentra en toda la biosfera incluyendo los casquetes polares, el suelo, el agua y la atmósfera (Rivera *et al.*, 1987a). Viven principalmente donde hay agua, pudiéndoseles encontrar en estanques, ríos, arroyos, lagos, piscinas, sistemas de tratamiento de agua residual, corrientes subterráneas e incluso agua entubada y embotellada (Wellings *et al.*, 1977; Rivera *et al.*, 1979, 1981, 1986a, 1987b, 1988, 1994; Kadlec *et al.*, 1980; Sadaka *et al.*, 1994). Las temperaturas elevadas favorecen su proliferación por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales, naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales (De Jonckheere y Van de Voorde, 1977; De Jonckheere, 1981b; Červa *et al.*, 1982; Kasprzak *et al.*, 1982; Sykora *et al.*, 1983; Rivera *et al.*, 1984b).

El estudio de las amibas de vida libre ha demostrado que sólo un grupo muy restringido provoca infecciones humanas incluyendo a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Hartmannella* (John, 1993; Visvesvara *et al.*, 1993). Estos organismos son capaces de provocar meningoencefalitis fulminante que ocasiona la muerte en el lapso de tres a siete días, o encefalitis granulomatosa crónica que pueden ocasionar la muerte en períodos mayores. Las acantamebas también pueden provocar infecciones muy severas en otros órganos como son pulmón, piel, ojos y oídos (Kilvington *et al.*, 1991a).

A diferencia de *Entamoeba histolytica* que es un parásito obligado que se aloja en el intestino y que puede producir abscesos secundarios en hígado, cerebro y pulmón, las AVL producen invasión del sistema nervioso central pasando directamente de mucosa nasal (Wang y Feldman, 1967; Cerva *et al.*, 1973; Martínez y Amado-Ledo, 1979; Conde, 1990; John, 1993). Los casos registrados en todos los continentes evidencian la amplia distribución y se sospecha que muchos casos pasan inadvertidos al diagnóstico clínico y de laboratorio (Hanadto *et al.*, 1993).

2. INFECCIONES AMIBIANAS DEL SNC HUMANO

La meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) es producida por *Naegleria fowleri* e invariablemente ocasiona la muerte del enfermo (Carter, 1970). El periodo de incubación varía de dos días a tres semanas dependiendo del tamaño del inoculo y de la virulencia del organismo invasor. La aspiración de agua o aire que contiene amibas les permite alcanzar el epitelio olfatorio de la mucosa pituitaria y penetrar a la cavidad craneal a través del nervio olfatorio, constituyéndose así la ruta de diseminación de las amibas a otras partes del encéfalo. Dado que la invasión es muy rápida, hay destrucción del tejido nervioso (necrosis hemorrágica) de prácticamente todo el encéfalo (Carter, 1972). Esta enfermedad ha sido reportada en países como Bélgica, República Checa, Gran Bretaña, Australia, Estados Unidos, Venezuela, Panamá y México (Rivera *et al.*, 1984b; Rodríguez-Pérez, 1984; Valenzuela *et al.*, 1984; López-Corella *et al.*, 1989; Lares-Villa *et al.*, 1993; Loschiavo *et al.*, 1993).

El cuadro clínico es muy parecido a la meningitis bacteriana, sin embargo, en la infección por *Naegleria* la mayoría de los casos han tenido como antecedente la natación en época calurosa de personas sanas y jóvenes. La evolución clínica es muy rápida y termina con la instalación de coma y muerte, la cual ocurre dos ó siete días después de la aparición de los primeros síntomas. En el líquido cefalorraquídeo el exudado purulento es escaso ó está ausente y no pueden aislarse ni teñirse bacterias ni hongos. El diagnóstico se confirma con el aislamiento de las amibas del líquido cerebroespinal o del tejido de biopsia cerebral (Lalitha *et al.*, 1985).

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) o acantamibiosis tiene como agente etiológico a *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga* (Martínez, 1983; Martínez y Janitschke, 1985). El período de incubación es de varias semanas o meses para que la enfermedad se establezca. La entrada puede ser a través de la piel o mucosas, así como mediante la aspiración nasal de agua o aire contaminados con amibas o quistes viables de las mismas. Una vez en el organismo, se establece una lesión primaria desde la cual, por vía hematogena, las amibas alcanzan el sistema nervioso central. En este tipo de infección las lesiones se caracterizan por ser granulomatosas, encontrando en ellas tanto trofozoitos como quistes (Martínez y Janitschke, 1985; John, 1993).

TABLA 1. Factores de predisposición y enfermedades asociadas con infecciones por *Acanthamoeba*.

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

La EAG presenta un largo curso clínico con signos y síntomas neurológicos que dependen del sitio que se encuentre dañado por los trofozoitos. La EAG se presenta primordialmente en pacientes crónicamente debilitados por otro padecimiento, en pacientes bajo tratamiento inmunosupresivo, o que tienen comprometidos los mecanismos inmunológicos, incluyendo pacientes con SIDA (González *et al.*, 1986; Wiley *et al.*, 1987; Anzil *et al.*, 1991). *Acanthamoeba* puede formar parte de la fauna normal de individuos saludables y generalmente se comporta como un organismo oportunista, excepto en la queratitis ocular, en la que infecta a individuos sanos y la invasión es directa en la córnea después de un traumatismo, o en usuarios de lentes de contacto contaminados. En la Tabla 1 se mencionan algunos de los factores de predisposición y enfermedades asociadas a la infección por *Acanthamoeba* (Martínez, 1980; Donzis *et al.*, 1989; Berger *et al.*, 1990; Bottone, 1993).

Las amibas patógenas para el hombre del género *Naegleria* tradicionalmente han sido identificadas como *Naegleria fowleri* y aunque *N. australiensis* ha sido registrada como patógena en ratones no se ha demostrado hasta ahora su patogenicidad en el hombre (De Jonckheere, 1981a; De Jonckheere *et al.*, 1983). Otras infecciones amibianas se muestran en la Tabla 2.

TABLA 2. Infecciones humanas causadas por amibas de vida libre (Tomada de John, 1993).

Especies	Infección en el SNC	Infección en el Ojo	Otros tejidos
<i>Naegleria fowleri</i>	X		
<i>Acanthamoeba astronyxis</i>	X		Nódulos linfáticos adrenales, piel (ulceraciones), tiroides y senos nasales
<i>A. culbertsoni</i>	X	X	Pulmón (neumonía), próstata, hueso, músculo y piel
<i>A. culbertsoni</i>	X	X	Hígado, bazo, útero y piel
<i>A. hatchetti</i>		X	
<i>A. palestinensis</i>	X		
<i>A. polyphaga</i>		X	
<i>A. rhyssodes</i>	X	X	
<i>Hartmannella vermiformis</i>	X		Pulmón
<i>Balamuthia mandrillaris</i>	X		

3. INFECCIONES AMIBIANAS EN OTROS ORGANISMOS

Además de su potencial patógeno sobre humanos, las AVL son capaces de parasitar a organismos de casi todos los grupos zoológicos. En la Tabla 3 se nombran a los animales de los cuales se han recuperado e identificado trofozoitos de sus tejidos (John, 1993). Se desconoce si algunas de estas infecciones de animales funcionan como portadores o reservorios de las infecciones humanas.

De la Tabla mencionada las amibas del género *Acanthamoeba* parecen ser los organismos que producen con mayor frecuencia infecciones en animales en comparación con *Naegleria*.

Algunos otros animales como insectos acuáticos (larvas e insectos), anfibios y reptiles acuáticos necesitarían ser investigados como posibles reservorios o transportadores de amebas de vida libre en los sistemas naturales y artificiales.

TABLA 3. Infecciones amibianas en animales (Tomada de John , 1993).

Grupo Animal	Tejido	Amiba	País
MOLUSCOS			
Ostra	Visceras	<i>Hartmannella tahitiensis</i>	Tahiti
Caracol de jardín	Pie, manto, pared intestinal y tentáculos	<i>H. biparia</i> y <i>H. quadriparia</i>	Estados Unidos
CRUSTÁCEOS			
Langosta	Sangre y exoesqueleto	<i>Paramoeba pernicioso</i>	Estados Unidos
Cangrejo	Músculo cardíaco, hepatopáncreas, sangre y esqueleto	<i>Paramoeba pernicioso</i>	Estados Unidos
PECES			
Trucha y pez dorado	Riñones, hígado, meninges, agallas, vejiga, bazo y sangre	<i>Naegleria</i> sp., <i>Vahlkampfia</i> sp., <i>Acanthamoeba</i> sp. y <i>Hartmannella</i> sp.	Estados Unidos
REPTILES			
Boa	Cerebro	<i>Acanthamoeba</i> sp. y <i>Hartmannella</i> sp.	Alemania
AVES			
Pavo y pichones	Tráquea e intestino	<i>H. vermiformis</i> , <i>A. polyphaga</i> y <i>V. enterica</i>	Rep. Checa
MAMÍFEROS			
Mandrill	Cerebro	<i>Balamuthia mandrillaris</i>	Estados Unidos
Toro	Pulmón y prepucio	<i>A. polyphaga</i> y <i>Hartmannella</i> sp.	Rep. Checa
Castor	Riñones, hígado y músculo	<i>Hartmannella</i> sp.	Suiza
Vaca	Vagina	<i>A. polyphaga</i>	Rep. Checa
Perro	Corazón, hígado, pulmón, páncreas, bronquios, cerebro, riñón	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i> y <i>Hartmannella vermiformis</i>	Rep. Checa y Estados Unidos
Conejo	Hígado	<i>A. polyphaga</i>	Rep. Checa
Visón de agua	Pulmón	<i>Acanthamoeba</i> sp.	India

4. MECANISMOS DE CITOPATOGENICIDAD

Se llama virulencia a la capacidad que presentan las AVL para causar daño al organismo invadido (huésped). Esta capacidad está dada por una serie de características que son intrínsecas de las amibas y que forman la base de los mecanismos de patogenicidad, es decir, de producción de daño.

El primer paso para la producción de daño es la adhesión a la superficie de las células epiteliales y nerviosas del huésped. En el caso de la *Entamoeba histolytica* para la cual se dispone de una gran cantidad de información, la

adhesión se lleva a cabo a través de glicoproteínas de superficie que reconocen carbohidratos en la superficie de la célula blanco, por lo que han sido denominadas como lectinas (Ravdin, 1986; Petri *et al.*, 1987; Petri y Ravdin, 1990; Ravdin *et al.*, 1993). En el caso de las AVL parece tratarse de la misma familia de lectinas (Sharon y Lis, 1987).

Losseudópodos de las AVL también juegan un papel en la patogenicidad promoviendo la penetración e invasión de tejidos y mucosas por la notable dinámica que poseen estas estructuras. Los trofozoitos poseen la capacidad de devorar células del huésped por fagocitosis, por ejemplo *Naegleria* posee estructuras semejantes a una boca, llamadas amebostomas, que permiten arrancar pequeños pedazos o incluso devorar la célula entera (Marciano-Cabral *et al.*, 1982, 1990; John *et al.*, 1985).

La producción de enzimas y otras proteínas líticas es otro de los mecanismos que poseen las AVL para causar enfermedad. El efecto citopático de *N. fowleri* sobre cultivos celulares de mamíferos ha sido atribuido a sustancias secretadas al medio por las amibas. Se ha reportado que el sobrenadante del medio de cultivo celular de mamífero donde se cultivaba *N. fowleri* indujo degeneración celular cuando era agregado a cultivos celulares nuevos, sugiriendo que la amiba había secretado sustancias citolíticas o citotóxicas. Se concluyó que los efectos citopáticos de *N. fowleri* podrían ser atribuidos a enzimas fosfolipolíticas liberadas por la amiba durante su crecimiento (Chang, 1974, 1978).

Varias fosfolipasas (fosfolipasa A, lisofosfolipasa, esfingomielinasa, entre otras) han sido identificadas en medios de cultivo en los cuales ha crecido *N. fowleri* (Cursons y Brown, 1978; Hysmith y Franson, 1982 a, b). La actividad de las fosfolipasas de los cultivos de *Naegleria* patógena fueron mucho mayor que la de los cultivos de *Naegleria* no patógena. Las fosfolipasas también han sido reportadas en medios de cultivo donde crece *Acanthamoeba culbertsoni*. La cantidad de estas enzimas fueron mayores en cultivos de *A. culbertsoni* que en cultivos de *A. castellanii* (Cursons y Brown, 1978). *A. culbertsoni* no patógena contiene dos lisofosfolipasas, una soluble y otra que se adhiere a la membrana plasmática (Victoria y Korn, 1975).

Los fosfolípidos de mielina humana son degradados por medio de cultivo libre de células de *N. fowleri* (Hysmith y Franson, 1982b). Las neuramididas presentes en el medio de cultivo de *N. fowleri* hidrolizan mielina y mucina humana (Eisen y Franson, 1987). Las enzimas que son capaces de hidrolizar glicolípidos y fosfolípidos de la mielina en pruebas *in vitro* son también responsables de la desmielinización masiva que ocurre en la MEAP humana (Duma *et al.*, 1971) y experimental (Chang, 1979).

Otras enzimas, con algún posible papel en la patogenicidad, aparecen en extractos de *N. fowleri*. Existen varias hidrolasas incluyendo fosfatasa ácida, varias glicosidasas (Lowrey y McLaughlin, 1985; Olomu *et al.*, 1986; Das *et al.*, 1987; Marciano-Cabral y Cline, 1987) y elastasa (Ferrante y Bates, 1988).

Lisados de *N. fowleri* libres de células son capaces de matar células B103 de neuroblastomas de rata. Lisados de *N. fowleri* altamente virulentos son menos citotóxicos que los lisados de cepas débilmente virulentas (Fulford *et al.*, 1985; Fulford y Marciano-Cabral, 1986).

Se ha demostrado que lisados de amibas libres de células son citotóxicos para cultivos celulares, uno de esos componentes citotóxicos ha sido identificado como una citotoxina adherida a membrana que tiene una potente actividad hemolítica, indicando que esta citotoxina puede ser membranolítica. Esta actividad hemolítica termoresistente cuenta por el 70-90% de la cantidad total de citólisis mediada por lisados de amibas libres de células. Una proteína de *Naegleria* formadora de poros (N-PFP por sus siglas en inglés), ha sido aislada y reconstituida dentro de un modelo de membrana lipídica. La N-PFP lisa células nucleadas e induce una despolarización rápida de su potencial de membrana en reposo. Durante el contacto letal de las amibas con las células blanco, esta proteína juega un papel importante en la mediación de la citólisis (Young y Lowrey, 1989)

La resistencia de las AVL para ser digeridas por las células de defensa del huésped es un factor importante en la producción de las enfermedades que causan. Esta resistencia se debe a la presencia de proteínas y ácido siálico y otros carbohidratos en la membrana plasmática de la amiba (Reilly *et al.*, 1983; Toney y Marciano-Cabral, 1992, 1994).

En el caso del huésped, algunos factores parecen determinar la infección por AVL: temperatura corporal, dosis infectiva, virulencia de la amiba, respuesta inmune a nivel de mucosas, así como alguna deficiencia inmunológica (De Jonckheere, 1981a).

La revisión macroscópica de las lesiones en autopsias muestra una amplia destrucción con hemorragias que se extienden desde la base frontal del cerebro, edema intenso que produce una presión endocraneal muy elevada; las lesiones abarcan tanto la sustancia gris como la blanca, los nervios craneales están envainados por un exudado sanguinolento, hay leptomeningitis basal con exudado purulento escaso y daño a hipófisis y estructuras paraselares (Martinez, *et al.*, 1977). El estudio microscópico muestra abundante infiltrado con predominio de leucocitos polimorfonucleares algunos eosinófilos y mononucleares, puede haber focos de desmielinización, angitis necrotizante y necrosis fibrinoide y se encuentran amibas en la vecindad de vasos sanguíneos. Como se mencionó antes, únicamente se encuentran trofozoitos y no quistes, en las lesiones por *Naegleria*. Sin embargo, en el caso de las infecciones por *Acanthamoeba*, con un curso de invasión lento, se afectan preferentemente los ganglios basales y las lesiones se caracterizan por ser granulomatosas y al establecerse paulatinamente provocan una encefalomalacia encontrando en ellas tanto trofozoitos como quistes.

Naegleria fowleri es la AVL más virulenta (Fulford y Marciano-Cabral, 1986; Marciano-Cabral, 1988; Young, 1989). Otras neglerias como *N. lovaniensis* la

cual no se considera patógena ha sido encontrada, sin embargo, en líquido cefalorraquídeo (Rivera *et al.*, 1989c). Asimismo, cepas del mismo género han demostrado ser altamente virulentas en ratones sin reportes de infecciones demostradas en humanos. Este es el caso de *N. australiensis italica* (Scaglia *et al.*, 1983; De Jonckheere *et al.*, 1984; John y De Jonckheere, 1985). Otras amibas del género *Naegleria* son consideradas de interés, ya que se asocian al ambiente de *N. fowleri*, o bien porque pueden producir meningoencefalitis en ratones como *N. australiensis* (De Jonckheere *et al.*, 1983). La forma invasiva es el trofozoito que se alimenta con voracidad debido a su fácil locomoción, composición enzimática y producción de toxinas que favorecen la digestión y destrucción sobre todo del tejido nervioso. Los mecanismos de citopatogenicidad para *N. fowleri* incluyen fagocitosis, liberación de sustancias citotóxicas y la presencia de un componente biológico activo llamado material citopatogénico de la amiba *Naegleria* (MCAN; (John, 1993)).

5. RESUMEN HISTÓRICO DE LAS INFECCIONES POR AMIBAS DE VIDA LIBRE

Las AVL han sido estudiadas desde 1841, cuando Félix Dujardin en Francia describe por primera vez una amiba pequeña de vida libre y le da el nombre de *Amoeba limax* (Rivera *et al.*, 1991). No obstante, sólo se les considera como organismos que forman parte del ambiente y que llevan un papel modesto en la trama del ecosistema. Ciento diecisiete años después, se hace el primer reporte del efecto citopático de *Hartmannella* y *Acanthamoeba* en cultivos celulares de riñón de mono y se propone que las amibas de vida libre tienen un potencial patógeno (Culbertson *et al.*, 1958). Los primeros casos de infecciones humanas fueron registrados en Australia (Fowler y Carter, 1965). Un año después del primer reporte, tres infecciones fatales fueron descritas en Florida (Butt, 1968). La sintomatología de estos casos fue muy similar a la de los casos de Australia, aunque esto no era aparente en ese entonces, los siete casos sentaron las bases de las características clínicas y patológicas de la enfermedad.

Los primeros casos de meningoencefalitis en humanos debidamente comprobados provienen de hace apenas unas décadas (Carter, 1970). En ese entonces, se creía que todos los casos comprobados de MEAP se debían a *Naegleria fowleri*. Posteriormente, se reconocen casos de encefalitis causados por amibas del género *Acanthamoeba* (Jager y Stamm, 1972; Robert y Rorke 1973) con lo que las diferencias clínico-patológicas empezaron a emerger. A medida que la enfermedad se fue conociendo más, se encontró que algunas infecciones oculares y de la piel eran causadas por *Acanthamoeba* (Martinez, 1985) y se propuso el término encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) (Martinez y Amado-Lledo, 1979) para diferenciarla de la MEAP debida a *Naegleria fowleri*.

Hasta 1966 se redefinen los géneros *Hartmannella*, Alexieiff, 1912, y *Acanthamoeba*, Volkonsky, 1931, a los que se añaden ocho especies nuevas (Page, 1966, 1974).

El interés médico se ha venido incrementando al saberse que provocan la muerte (De Jonckheere *et al.*, 1984). Este hecho reviste mayor importancia si se considera que las AVL potencialmente patógenas pueden ser encontradas con facilidad en cuerpos de agua de uso recreativo e industrial (De Jonckheere, 1978, 1979a; Coronado-Gutiérrez y López-Ochoterena, 1980; Kasprzak *et al.*, 1982; Scaglia *et al.*, 1983; Rivera *et al.*, 1989a).

Los estudios de AVL en México fueron iniciados por Rivera y colaboradores (Rivera y Paz, 1978; Rivera *et al.*, 1984a, b), quienes reportaron amibas del género *Naegleria* en reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México. Posteriormente, Rivera y colaboradores en 1979 aislaron *N. gruberi*, *A. culbertsoni* y *A. astronyxis* en aguas de grifo de la Cd. de México. *N. gruberi* y *A. astronyxis* fueron aisladas también a partir de agua mineral embotellada (Rivera *et al.*, 1981). *Naegleria fowleri* y *A. culbertsoni* patógenas también se han recolectado de aguas de piscinas de la Cd. de México (Rivera *et al.*, 1983). En un seguimiento amebológico hecho a pacientes odontológicos de ambos sexos, se aislaron amibas patógenas del grupo *Naegleria-Acanthamoeba* provenientes de la región nasobucofaríngea (Rivera 1984, 1986b). Más recientemente, Rivera y colaboradores (1984, 1986b, 1987, 1988, 1992) recolectaron 104 aislados de AVL, especialmente del género *Acanthamoeba*, de la atmósfera de la Cd. de México y su área metropolitana.

Hasta ahora, se han diagnosticado en México 10 casos de MEAP *post mortem* (Valenzuela *et al.*, 1984; López-Corella *et al.*, 1989; Lares-Villa *et al.*, 1993) y dos más mientras los pacientes se hallaban vivos (Rodríguez-Pérez, 1984; Centeno *et al.*, 1996). Un caso sobrevivió gracias al oportuno diagnóstico y tratamiento (Rodríguez-Pérez, 1984).

Recientemente se aisló una amiba leptomixida del cerebro de un mandril de zoológico que murió de meningoencefalitis (Visvesvara *et al.*, 1993). Los estudios de microscopía electrónica, las pruebas de patogenicidad en animales y los patrones de inmunofluorescencia sugirieron que se trata de una nueva especie de AVL diferente de *Leptomyxa* y *Gephyramoeba* del mismo orden. El número de caracteres divergentes llevó a la propuesta de un nuevo género, *Balanuthia* con una sola especie *B. mandrillaris*. Tiene una fase trófica y una quística en su ciclo de vida, es uninucleada con un gran núcleo vesicular y un nucleolo central. Los quistes maduros tienen una pared tripartita que consta de un exoquiste, un endoquiste y un mesoquiste. A diferencia de *Acanthamoeba* y *Naegleria*, no crece en placas de agar sembradas con bacterias entéricas. Sin embargo, *B. mandrillaris* crece en una gran variedad de cultivos celulares de mamíferos y mata a los ratones después de una inoculación intranasal o intraperitoneal, en un período de 8 a 10 días. Esta especie ha sido identificada

por pruebas de inmunofluorescencia en 35 casos *post mortem* de encefalitis amibiana en humanos y tres en otros animales (Visvesvara *et al.*, 1993).

6. ECOLOGÍA DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE

Las AVL pueden llegar a los cuerpos de agua, a los alimentos y a las heridas superficiales en forma de quiste. Pueden desprenderse de los cuerpos de agua en forma de aerosoles. Dentro de los cuerpos de agua las amibas viven sobre la superficie, adheridas a partículas flotantes, en la columna de agua, o en los sedimentos. Puesto que las AVL son habitantes comunes del suelo, juegan un papel dentro del ciclo de los nutrientes, porque estimulan el incremento en la tasa de transformación bacteriana del fósforo y del nitrógeno a formas aprovechables para las plantas, lo que produce una mayor producción de biomasa vegetal (Fenchel, 1987; Tyndall *et al.*, 1989).

El enquistamiento es la manera como las amibas responden a variaciones ambientales que amenacen su existencia. Los quistes pueden sobrevivir a las sequías, cambios de pH y falta casi total de oxígeno. En su forma de quiste, las AVL pueden ser acarreadas hacia la atmósfera mediante corrientes de convección, sistemas frontales, turbulencias o burbujas de aire (Rivera *et al.*, 1987a, 1994; Rodríguez *et al.*, 1993). El tiempo y la distancia a la que pueden transportarse en la atmósfera depende de la altura y del tamaño que posean. En general, las partículas de un diámetro mayor de 20 μm sedimentan casi de inmediato y su área de distribución es aproximadamente de 100 μm , mientras que las partículas de 10-20 μm pueden permanecer por un tiempo mayor y dispersarse más ampliamente. Lo anterior tiene importancia porque la mayoría de las especies de AVL tienen tamaño pequeño (6 a 15 μm) y pueden ser acarreadas por el viento a través de grandes distancias incluso entre continentes (Rondanelli, 1987).

Las temperaturas extremas a las cuales las AVL son capaces de sobrevivir están por debajo de los 4 °C y algunas pueden sobrevivir a temperaturas mayores de 45 °C (De Jonckheere, 1981b). Por lo general, las especies patógenas son termotolerantes (Rivera *et al.*, 1983). 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 (Kyle y Noblet, 1986, 1987). Aunque las AVL patógenas tienen velocidades de crecimiento inferiores a las no patógenas, las primeras pueden crecer e incrementar paulatinamente su número hasta llegar a niveles infectivos. Así, los cuerpos de agua contaminada térmicamente ofrecen un lugar abundante en materia orgánica y libre de competencia y un nicho "vacío" de ameboflagelados, con escasa o nula depredación. Puede hacerse un símil con el cerebro de los vertebrados, en donde las amibas encuentran un ambiente con temperatura estable, con abundante

alimento, sin competencia y con una escasa presión depredadora por parte de los mecanismos de defensa (Griffin,1983).

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 de las aguas cuando están en su forma trófica y el quiste es resistente al ataque del cloro hasta niveles de 2 ppm. Esta puede ser una de las razones que las convierten en infectantes oportunistas. En contraste, en la mayoría de las áreas geográficas donde se ha aislado a *N. fowleri* en el ambiente se ha detectado una fuerte influencia de los ciclos estacionales, con números altos de amibas en el verano y el otoño y bajos en el invierno y la primavera (De Jonckheere, 1987b).

7. CICLOS DE VIDA

Los ciclos de vida de las AVL incluyen un estadio de trofozoito que se alimenta y reproduce y una fase quística, como forma de resistencia. En el caso de *Naegleria* se presenta un estadio flagelar temporal. A continuación se describen los dos ciclos de vida más característicos:

a. *Naegleria*

El término ameboflagelado es utilizado para describir las amibas que pueden presentar formas flageladas. Cuando los trofozoitos del género *Naegleria* son puestos en un medio no nutritivo como agua destilada o soluciones amortiguadoras, se diferencian a una fase transitoria, flagelada, que no se alimenta ni se divide. En condiciones más adversas los trofozoitos se enquistan y pueden sobrevivir hasta por meses.

La fase invasiva de *N. fowleri* es el trofozoito y la infección se adquiere por la aspiración nasal (instilación) de aguas contaminadas. Los trofozoitos invaden la mucosa nasal, la placa cribosa y los bulbos olfatorios del cerebro.

Se piensa que las formas flageladas o los quistes de *N. fowleri* podrían entrar a la nariz de un nadador tan fácilmente como los trofozoitos. En la mucosa nasal, los quistes y las formas flageladas pueden revertirse rápidamente a trofozoitos, para iniciar la invasión (Fig. 1). Los flagelados o quistes de *N. fowleri* nunca se encuentran en los tejidos o fluido cerebroespinal del huésped (John, 1993).

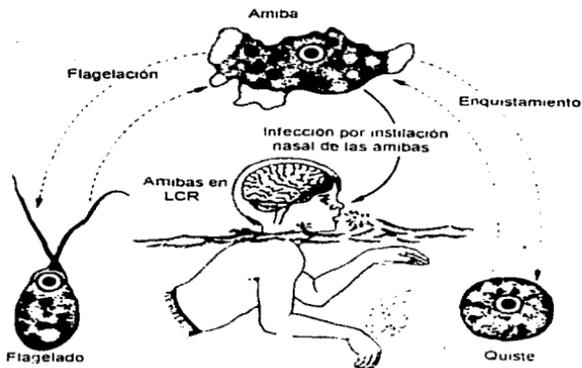


Figura 1. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri* e infección humana (Tomada de John, 1993).

b. *Acanthamoeba*

Las dos formas del ciclo de vida (trofozoito y quiste) de *Acanthamoeba* se pueden encontrar en los tejidos del huésped humano y parece ser verdaderamente anfizóica. La infección humana por *Acanthamoeba* también afecta el sistema nervioso central (SNC), el ojo y otros órganos (Fig. 2) y se piensa que su vía de acceso puede ser por instilación, ya que los trofozoitos de *Acanthamoeba* son capaces de invadir la mucosa nasal y causar enfermedad fatal en el SNC de animales de experimentación (Culbertson *et al.*, 1958; Martínez *et al.*, 1977). Sin embargo, la invasión del SNC parece requerir el establecimiento de un foco primario en algún otro lugar del cuerpo como el tracto respiratorio, piel o mucosas. La EAG por *Acanthamoeba* tiende a ocurrir en personas debilitadas, crónicamente enfermas o inmunocomprometidas, mientras que la queratitis ocurre usualmente en individuos sanos por invasión directa de la córnea a través de un trauma del ojo o por el uso de lentes de contacto contaminados (Tablas 1 y 2).

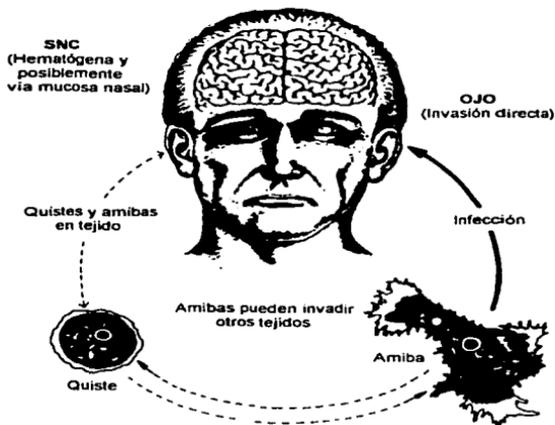


Figura 2. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. e infección humana (Tomada de John, 1993).

8. TAXONOMÍA DE LOS PRINCIPALES GÉNEROS DE AMIBAS DE VIDA LIBRE

Se han propuesto varias clasificaciones, basadas principalmente en aspectos morfológicos del trofozoito y del quiste. Sin embargo, debido a que las características morfológicas son comunes para muchas amibas, en algunos casos se presentan dificultades de identificación. En ocasiones es necesario tomar en cuenta otros criterios tales como ultraestructura, pruebas de transformación o de virulencia, movilidad, requerimientos nutricionales, patrón de división nuclear, tolerancia a la temperatura, forma de crecimiento en cultivo. Recientemente se han adoptado nuevas metodologías diagnósticas como las pruebas inmunológicas, los patrones de zimodemos de extractos crudos y sondas de DNA (De Jonckheere, 1984, 1987c; Ferrante, 1991; Kilvington 1995).

TABLA 4. Ubicación taxonómica de las principales amibas de vida libre patógenas (Tomada de Lee *et al.*, 1985).

Reino:	Protista Haeckel, 1866
Subreino:	Protozoa Goldfuss, 1818; emend. von Siebold, 1846
Phylum:	Sarcomastigophora Honigberg y Balamuth, 1963
Subphylum:	Sarcodina Schmarda, 1871
Superclase:	Rhizopodea von Siebold, 1845
Clase:	Lobosea Carpenter, 1861
Subclase:	Gymnamoebia Haeckel, 1862
Orden:	Amoebida Kent, 1880
Suborden:	Tubulina Bovee y Jahn, 1966
Familia:	Hartmannellidae Volkonsky, 1931; emend. Page, 1974
Género:	<i>Hartmannella</i> Alexeieff, 1912; emend. Page, 1974
Suborden:	Acanthapodina Page, 1976
Familia:	Acanthamoebidae Sawyer y Griffin, 1975
Género:	<i>Acanthamoeba</i> Volkonsky, 1931; emend. Page, 1967
Orden:	Schizopyrenida Singh, 1952
Familia:	Vahlkampfiidae Jollos, 1917; Zulueta, 1917
Género:	<i>Naegleria</i> Alexeieff, 1912; emend. Calkins, 1913
Clase:	Acarpomyxea Page, 1976
Orden:	Leptomyxida Pussard, 1975
Familia:	Leptomyxidae Goodey, 1915
Género:	<i>Balamuthia</i> Visvesvara, 1993

Los patrones de mitosis denominados como mesomitosis permiten distinguir entre *Acanthamoeba* y *Hartmannella* (Singh y Hanumaiah, 1979). También se ha propuesto una clasificación basada en la forma de locomoción, características citológicas, estructuras nucleares, patrón de división durante la mitosis, ultraestructura, nutrición y características inmunológicas (Page, 1966). La clasificación de amibas de vida libre de Chang (1971) es una combinación de las dos anteriores basada supuestamente en principios filogenéticos. Otra propuesta no considera la patogenicidad como un carácter distintivo para separar el género *Acanthamoeba* del género *Hartmannella*; en cambio propone su separación por diferencias de locomoción, formación de acantópodos y morfología del quiste (Page, 1988). Sin embargo, el sistema taxonómico más aceptado y que describe con precisión el lugar que ocupan las amibas en el grupo de los protozoos corresponde a Lee y colaboradores (1985) que es además la aceptada por la International Society of Protozoologist (Tabla 4). De acuerdo a este sistema, el género *Naegleria* está colocado dentro de la familia Vahlkampfiidae, caracterizada por la división promitótica del núcleo (De Jonckheere, 1987a), por la formación temporal de un estado de flagelación en el

cual se forman generalmente dos flagelos, por la morfología de los amebostomas (estructuras por donde atrapan su alimento) y por el patrón de distribución de los poros en los quistes.

Existen seis especies de *Naegleria*: *N. fowleri* Carter, 1970; *N. australiensis* De Jonckheere, 1981a; *N. lovaniensis* Stevens, De Jonckheere y Willaert, 1980; *N. gruberi* Scharfingher, 1899 y *N. jadimi* Willaert y Le Ray, 1973. Cada especie puede ser distinguida por características ultraestructurales del quiste (Marciano-Cabral, 1988). Se han propuesto las subespecies *N. australiensis italica* (Scaglia *et al.*, 1983; De Jonckheere *et al.*, 1984) y *N. lovaniensis tarasca* (Rivera *et al.*, 1990).

Además del género *Naegleria*, siete especies de amibas del género *Acanthamoeba* han sido descritas como organismos causantes de infecciones en humanos. Ellas son: *A. astronyxis* Ray y Hayes, 1954; *A. castellanii* Douglas, 1930; *A. culbertsoni* Singh y Das, 1970; *A. hutchetti* Sawyer, Visvesvara y Harke, 1977; *A. palestinensis* Reich, 1933; *A. polypluga* Puschkarew, 1913 y *A. rhysodes* Singh, 1952 (John, 1993).

9. RESPUESTA INMUNE

Existen dos tipos de inmunidad, la natural y la adquirida que se da por el contacto del huésped con los agentes externos. En el caso de las AVL, se ha observado inmunidad natural hacia *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Balamuthia* basada en la activación del complemento por vía alterna, que induce la destrucción amibiana. La propiedad de invasión de las AVL, tiene implicaciones en el desenlace de la enfermedad, ya que la generación de mediadores de inflamación (C5a, C3a, etc.), que resultan de la activación del complemento, promueven daño en las paredes de los vasos sanguíneos. La inmunidad natural también puede ser mediada por leucocitos, debido a que los factores complementarios que se adhieren a la superficie de las amibas las tornan más fácilmente englobables por células fagocíticas (Marciano-Cabral y Fulford, 1986).

La presencia de las AVL en los tejidos del huésped induce la formación de una respuesta inmune. Se han detectado anticuerpos contra *Acanthamoeba* y *Naegleria*, que opsonifican los trofozoítos y aumentan el efecto tóxico de los macrófagos y neutrófilos en contra de las amibas. Cuando las amibas se asientan en sitios primarios como la piel, el neuroepitelio u otras superficies respiratorias, sólo una pequeña porción de ellas sobrevive. Una infección exitosa de *N. fowleri* puede ser, por lo tanto, la consecuencia de una elevada dosis de amibas, asociadas con bajos niveles de respuesta antiamibiana, como podría ocurrir en los niños. Por otra parte, estudios seroepidemiológicos han confirmado que los seres humanos están periódicamente expuestos a *Naegleria* (Cursons *et al.*, 1980; Reilly *et al.*, 1983a, b; Marciano-Cabral *et al.*, 1987a).

Al respecto de la respuesta celular, se ha propuesto que en la infección por *Naegleria* los neutrófilos juegan el papel más importante en la destrucción de las

amibas (Ferrante *et al.*, 1989). El factor de necrosis tumoral (Ferrante, 1991) es una sustancia sintetizada y liberada por los macrófagos en respuesta a una variedad de estímulos. Este factor incrementa la respuesta de los neutrófilos humanos contra *Naegleria* y *Acanthamoeba*, aumentando su capacidad para destruir trofozoítos. El factor de necrosis tumoral también estimula la adhesión de los neutrófilos a las células amibianas en ausencia de anticuerpos en el suero. Los macrófagos deben estar activados para actuar como células de defensa eficientes (Michelson *et al.*, 1990).

10. DIAGNÓSTICO

En el caso de las infecciones por *Naegleria*, el curso clínico es dramático, una vez que la amiba penetra la mucosa nasal y la placa cribiforme, viaja a través de los nervios olfatorios hasta el cerebro. Las amibas invaden primero los bulbos olfatorios y luego se dispersan a las regiones más posteriores del cerebro. Dentro del cerebro provocan inflamación y causan destrucción masiva del tejido (Carter, 1970; Martínez, 1985).

Los síntomas comienzan con un severo dolor frontal de cabeza, fiebre (39-40 °C), y anorexia. Esto es seguido por náusea, vómito y signos de irritación meníngeos, frecuentemente evidenciados por un signo positivo de Kerning. El daño de los lóbulos olfatorios puede causar trastornos en el sentido del gusto y pueden ser aparentes en el inicio de la enfermedad. Pueden ocurrir trastornos visuales. El paciente puede experimentar confusión, irritabilidad y se puede tornar irracional durante un lapso antes de entrar en un estado de coma. En orden de frecuencia de aparición, los síntomas más importantes incluyen dolor de cabeza, anorexia, náusea, vómito, fiebre y rigidez de cuello (Carter, 1970; Martínez, 1985).

Las infecciones por *Acanthamoeba* tienen un largo curso con parestesias o crisis convulsivas dependiendo del sitio que se encuentre irritado o dañado. Los principales signos y síntomas son: confusión mental de diverso grado, cefalea, fiebre de menor intensidad que en la naegleriambiosis, irritación meníngea, náusea y vómito. Una vez instalado el síndrome de hipertensión endocraneal, se desarrolla fotofobia, diplopia, alteraciones auditivas y trastornos del ritmo sueño-vigilia, finalizando en coma. El cuadro clínico puede confundirse con tuberculosis cerebral, afecciones virales y absceso cerebral. Sin embargo, un interrogatorio de los antecedentes del paciente, así como un cuadro respiratorio bajo y la rebeldía al tratamiento del proceso, sugiere acantambiosis, un dato importante para el diagnóstico, es la presencia de nódulos cutáneos.

La tomografía computarizada permite observar múltiples zonas con densidad disminuida tanto en corteza como en parénquima que corresponden a infartos cerebrales y embolias sépticas. Sin embargo, debido a que la MEAP y la EAG se confunden clínicamente con las meningitis bacterianas, la etiología

amibiana se determina en la mayoría de los casos después del examen microscópico del líquido cefalorraquídeo en frotis y *post mortem*, en muestras de tejido cerebral. En las secciones de tejido bien fijadas y teñidas, las amibas pueden ser fácilmente identificadas por su característica morfología nuclear. Los quistes nunca se encuentran en el tejido cerebral de los pacientes con meningoencefalitis amibiana primaria, a diferencia del tejido cerebral de pacientes con encefalitis amibiana granulomatosa donde son vistos ocasionalmente (Cerva y Novak, 1968; Martinez, 1985).

La identificación precisa de las AVL en el ambiente o en muestras clínicas se realiza por personal especializado. Determinar la especie a la que pertenece es aún más difícil, sobre todo si se dispone de unos cuantos trofozoítos o quistes. El diagnóstico de *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella* requiere que los trofozoítos sean aislados, clonados y cultivados en cantidades masivas para su identificación. Este proceso puede hacerse en un periodo de dos a cuatro días para llegar a la identificación hasta género. Se requiere conocer al menos que género de AVL esta infectando al paciente para poder llegar a un tratamiento terapéutico diferencial debido a que para cada genero se emplean diferentes drogas. La determinación del organismo hasta especie puede tardar más tiempo y requiere de gran experiencia del personal que desarrolla la identificación (Skocil *et al.*, 1970, 1972).

Se empiezan a utilizar algunas pruebas de más fácil realización para *Acanthamoeba* tales como los patrones de bandeado del DNA mitocondrial con enzimas de restricción (Yaguita y Endo, 1990; Kilvington *et al.*, 1991a). Estas técnicas facilitan y aumentan el número de muestras que se pueden procesar simultáneamente y reducen el tiempo para lograr la identificación hasta género, ya que requieren alrededor de 4 horas. El factor tiempo puede ser vital para determinar el éxito en el tratamiento de un paciente. Asimismo, la técnica evita imprecisiones en el diagnóstico por interpretaciones de la morfología de las cambiantes amibas. La reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) también ha comenzado a utilizarse para detectar e identificar AVL en el ambiente y en tejidos como córnea, cerebro y líquido cefalorraquídeo (Byers *et al.*, 1990; Embley, 1991; Paule *et al.*, 1991; Vodkin *et al.*, 1992; John, 1993).

Las técnicas inmunológicas como la inmunofluorescencia indirecta se basan en la técnica descrita por De Jonckheere (1984), usando antisueros obtenidos a partir de cepas de referencia. La técnica de ELISA (ensayo de inmunoadsorción ligado a una enzima) se realiza usando microplacas de 96 pozos que permiten procesar un gran número de muestras (Marciano-Cabral *et al.*, 1987a). En algunos casos, las técnicas inmunohistoquímicas como la inmunofluorescencia indirecta y la de inmunoperoxidasa pueden ser útiles para determinar la especie de AVL. Los antisueros contra una especie de amiba son normalmente producidos en conejos. Un antisuero de buena especificidad puede ser obtenido por inmunización del conejo con un número pequeño de amibas de una especie sin utilizar adyuvante. Algunas veces puede ser necesario someter

al antisuero a adsorciones para remover anticuerpos inespecíficos (Rondanelli, 1987).

11. TRATAMIENTO

Puesto que la progresión de las infecciones por *Acanthamoeba* y por *Naegleria* es radicalmente distinta, la urgencia para iniciar el tratamiento médico es también diferente. En el caso de *Naegleria*, si no se aplica el tratamiento médico intratecal o intraventricular, la infección termina con la muerte del paciente en un máximo de seis días. Desafortunadamente, en las infecciones por *Acanthamoeba* con un curso más prolongado, aún con la aplicación del tratamiento, las probabilidades de sobrevivencia son bajas (Wang *et al.*, 1993).

Entre las drogas usadas para combatir infecciones amebianas se incluyen bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas y desinfectantes. La resistencia de los trofozoitos a las diferentes drogas es muy variable y parecen tener efectos diferentes en pacientes distintos (Martínez, 1985).

Puesto que *Naegleria* y *Acanthamoeba* son las principales AVL capaces de producir infecciones de desenlace fatal en humanos, los comentarios acerca del efecto de los fármacos se dividen en estos dos grupos. La información disponible para el tratamiento de otros géneros de amibas como *Vahlkampffia* y *Hartmannella* es todavía más limitada (Martínez y Amado-Ledo, 1979; Jaramillo *et al.*, 1989; Visvesvara *et al.*, 1990, 1993; Taratuto *et al.*, 1991) y prácticamente no se han hecho ensayos terapéuticos.

a. Meningoencefalitis amebiana primaria

No existe un tratamiento satisfactorio para la MEAP puesto que frecuentemente el diagnóstico se realiza *post mortem*, las oportunidades para evaluación de los esquemas medicamentosos son escasas. En los primeros estudios para probar la eficacia de fármacos, los ratones infectados con *Naegleria fowleri* recibieron dosis de sulfadiazina, emetina y anfotericina B, obteniéndose la mejor protección con la combinación de anfotericina B/sulfadiazina. En el caso de *Naegleria fowleri* la anfotericina B ha resultado ser la mejor droga amebicida en experimentos *in vitro* (Martínez *et al.*, 1977).

La anfotericina B incide directamente en el movimiento de las amibas e inhibe su crecimiento. Observaciones al microscopio muestran que los trofozoitos tratados con esta droga se inmovilizan por completo presentando retracción de los pseudópodos y adquiriendo una forma redondeada. Posteriormente las vacuolas digestivas, los organelos y demás estructuras celulares van desapareciendo hasta que finalmente la célula pierde sus características y el trofozoito muere (Rondanelli, 1987).

Se sabe de cinco sobrevivientes de MEAP que fueron tratados con anfotericina B aplicada por vía intravenosa e intratecal. Cuatro sobrevivientes

fueron niños de Australia (Anderson y Jamieson, 1972), Gran Bretaña (Apley *et al.*, 1970), India (Pan y Ghosh, 1971), Estados Unidos (Seidel *et al.*, 1982) y México (Rodríguez-Pérez, 1984). El paciente de los Estados Unidos además de anfotericina B, recibió miconazol por vía parenteral y rifampicina por vía oral (Seidel *et al.*, 1982).

A pesar del limitado número de pacientes tratados, la anfotericina B se ha establecido como la droga de elección en infecciones por *Naegleria*. Se ha propuesto que la anfotericina es efectiva aún cuando se aplica con un retardo de 48-72 h después del inicio de la infección. Cabe hacer notar que la anfotericina B es considerablemente tóxica, especialmente a las elevadas dosis del tratamiento amebicida (1-1.5 mg/kg de peso; vía intravenosa o intratecal). En un intento por disminuir su toxicidad, se han preparado derivados de la anfotericina B; uno de ellos con un grupo metil-éster es efectivamente mucho menos tóxico aunque su potencia amebicida es también menor.

Como se mencionó anteriormente, el diagnóstico temprano de las meningitis provocadas por AVL patógenas es crucial y puede ayudar a disminuir el número de muertes. A pesar de lo limitado de la experiencia en humanos, el tratamiento oportuno (dentro de los tres primeros días de evolución del padecimiento) consiste en la aplicación de anfotericina B, sola o combinada con rifampicina, miconazol o tetraciclina (Thong y Ferrante, 1987).

b. Encefalitis amibiana granulomatosa

Los primeros intentos para combatir infecciones por *Acanthamoeba* spp. provienen de la década de los cincuenta, desde el momento en que se aislaron estos microorganismos de muestras de pacientes (Culbertson *et al.*, 1958). Tal como sucede con las infecciones por *Naegleria fowleri*, no existe un tratamiento satisfactorio para la Σ AG, en parte porque la mayoría de los casos han sido diagnosticados *post mortem* y no ha habido una oportunidad adecuada para evaluar los regímenes terapéuticos. Sin embargo, existen tres reportes de personas que se han recuperado de infección del SNC por *Acanthamoeba*.

Una niña de siete años de edad con un tumor cerebral granulomatoso inducido por *Acanthamoeba* se recuperó después de la total escisión de la masa y del tratamiento con ketoconazol. *Acanthamoeba palestinensis* fue aislada a partir de una biopsia de su cerebro (Ofori-Kwakye *et al.*, 1986). El segundo reporte involucra a un hombre de 40 años con una meningitis por *Acanthamoeba* que se recuperó después de un tratamiento con penicilina y cloranfenicol. *Acanthamoeba culbertsoni* fue aislada repetidamente a partir del líquido cefalorraquídeo (LCR) del paciente (Lalitha *et al.*, 1985). El tercer caso corresponde a un hombre de 30 años con una encefalitis crónica que fue tratado con sulfametazina y de cuyo LCR se aisló *A. rhysodes* (Cleland *et al.*, 1982).

Inicialmente, se probó la actividad terapéutica de la sulfadiazina, sulfamerazina y sulfapiridina en un modelo de amibas en ratones, resultando la sulfadiazina la más efectiva. Ensayos más cuidadosos realizados también en

animales de laboratorio mostraron que la sulfadiazina es efectiva cuando se aplica hasta 20 h después de iniciada la infección en dosis de 200 mg kg⁻¹ día⁻¹ (Ferrante *et al.*, 1984). Si el tratamiento es iniciado dos o tres días después, la eficacia de la sulfadiazina desciende notablemente y después del cuarto día se pierde por completo. Otros antibióticos probados en contra de acantamebas aisladas de casos clínicos son: oxitetraciclina, bencil penicilina, estreptomina, neomicina, kanamicina, nistatina, trimetoprim, acetarsol y furoato de diloxamida. Desafortunadamente, ninguno de ellos tiene una significativa efectividad (Schuster y Mandel, 1984).

Estudios *in vitro* muestran que la polimixina B, la cloroquina, el metronidazol y siete sulfonamidas análogas sólo tienen un efecto moderado. Se observó, sin embargo, un sinergismo en las combinaciones de trimetoprim/sulfametoxazol, trimetoprim/polimixina B y sobre todo anfotericina B/paramomicina incluso en concentraciones tan bajas como 10 µg/ml. Otros ensayos *in vitro* sugieren que la polimixina E, la sulfadiazina, la polimixina B y el trimetoprim/sulfametoxazol son drogas altamente activas contra *Acanthamoeba* (Duma y Finley, 1976).

12. PREVENCIÓN Y CONTROL

Existen factores que favorecen la presencia de las AVL en áreas de natación. Estas condiciones incluyen temperaturas cálidas tanto ambientales como del agua, fuentes de alimento para los trofozoítos, insuficiente cloración y limpieza, pH's cercanos al neutro, buena oxigenación y ausencia de competencia y depredación con otros organismos.

Las medidas recomendadas para prevenir las infecciones por AVL son: educación al público usuario advirtiéndole que debe evitar en lo posible aspirar agua de las piscinas por el uso de narigueras, monitoreo continuo, cloración de las piscinas (no aplicable en sistemas recreacionales de agua corriente), información acerca de estas infecciones entre el personal médico y de laboratorio en zonas de riesgo. La cloración requiere de niveles continuos de cloro libre residual de 1.5 mg/l (Derreumaux *et al.*, 1974). Estos niveles de cloración han demostrado ser efectivos para eliminar a *N. fowleri* en piscinas públicas en Australia (Dorsch *et al.*, 1983). Alternativas a la cloración convencional incluyen la adición de un desinfectante llamado Baquacil (Dawson *et al.*, 1983), cianuros clorinados (Engel *et al.*, 1983) y bióxido de cloro (Dawson y Brown, 1987). Sin duda, la cloración es el sistema desinfectante más sencillo y efectivo para controlar a las AVL en piscinas públicas.

Otra alternativa que se ha propuesto es el control biológico de las AVL. Al respecto, se cree que *Legionella pneumophila* y otras bacterias sirven como controles biológicos naturales para *N. fowleri* (John, 1993). *Legionella pneumophila*, es una bacteria causante de la llamada legionelosis o enfermedad de los

legionarios, capaz de infectar a *Naegleria*, *Hartmannella* y *Acanthamoeba*, multiplicarse dentro de los trofozoitos e incluso matar a la amiba (Rowbotham, 1980, 1983; Wadowsky *et al.*, 1991). El desarrollo de *Legionella* dentro de la amiba es muy similar al que ocurre en los monocitos humanos (Newsome y Arnold, 1985). Se ha propuesto que *Acanthamoeba* y *Naegleria* pueden ser huéspedes naturales de *Legionella* y que la legionelosis es adquirida no por la inhalación de las bacterias sino de amibas vivas o muertas infectadas con 50-1000 bacterias por trofozoito (Rowbotham, 1980).

III. ANTECEDENTES EN MEXICO

1. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

En todo el mundo se han registrado más de 200 casos de infecciones producidas por *N. fowleri*. Los países con mayor incidencia han sido Estados Unidos, República Checa, Bélgica y Australia.

En México existen las condiciones adecuadas para el desarrollo de amibas del género *Naegleria* y los casos de MEAP registrados pueden representar sólo la punta del "iceberg". Es decir, seguramente se reporta un número menor de casos de los que existen realmente; es posible que los casos de MEAP sean comúnmente atribuidos a infecciones bacterianas o virales.

El problema central es la dificultad que existe para la identificación de las amibas ya sea por observación directa de los trofozoítos en el líquido cefalorraquídeo, o bien a partir de cultivos en medios de agar especiales. Para una persona no adiestrada las amibas pueden pasar desapercibidas como simples artefactos, leucocitos o partículas de sedimento del mismo fluido o medio de cultivo (Tamayo *et al.*, 1980). Más aún, la identificación morfológica de los trofozoítos solo es confiable hasta el nivel de género (Culbertson, 1975). Finalmente, hay una escasa difusión de las nuevas metodologías (zimodemos y pruebas inmunológicas), que complementan a los criterios morfológicos y que permiten un diagnóstico más seguro hasta especie, una vez que se ha detectado un caso de MEAP.

Solo se conocen 11 casos comprobados de MEAP y se han publicado solo tres. El primero de ellos, un adolescente varón de 16 años se reportó en Mexicali B. C., la historia clínica señaló que su ingreso al hospital fue debido a un intenso dolor de cabeza, y que siete días antes el paciente había nadado en un canal de riego de poca profundidad (Valenzuela *et al.*, 1984). El paciente murió tres días después de haber sido hospitalizado. La observación del líquido cefalorraquídeo mostró formas amibianas en movimiento activo. El análisis *post mortem* reveló un meningoencefalitis con hemorragia severa y amplia destrucción de la fosa posterior del cerebro. La tinción con inmunoperoxidasas para las amibas aisladas del tejido cerebral, fue positiva para *N. fowleri*.

El segundo caso, fue una niña de seis años que jugó con agua de un tinaco infectado, identificado en Monterrey, N. L. (Rodríguez-Pérez, 1984). El diagnóstico en este caso se hizo a partir de muestras de líquido cefalorraquídeo y la observación directa de las muestras así como las preparaciones con la técnica de coloración de Gómori (ver Anexo 3), revelaron que el proceso infeccioso fue provocado por *N. fowleri*. Un hecho notable en este caso es que el paciente sobrevivió después del tratamiento con anfotericina B.

El tercer caso descrito en México, ocurrió en la población de Huetamo, Mich. (López-Corella *et al.*, 1989) a un joven de 13 años que presentó MEAP con

destrucción del cerebelo. Las muestras tomadas de las lesiones del tejido nervioso mostraron numerosos trofozoitos de amibas, los cuales fueron posteriormente identificados por inmunohistoquímica como *N. fowleri*. En este caso quedó sin precisar el origen de la infección pero se presume que pudo haberse adquirido en una poza de cría de peces ya que el paciente nadaba en ese lugar con frecuencia.

La aseveración de que México presenta condiciones adecuadas para amibas patógenas del género *Naegleria* se basa en los estudios sobre ecología de las AVL (De Jonckheere *et al.*, 1984; Rivera *et al.*, 1989a). Sin embargo, a pesar del clima y la abundancia de cuerpos de agua con características adecuadas, hasta la fecha no se ha registrado el aislamiento de *N. fowleri* en cuerpos de agua excepto en piscinas (Rivera *et al.*, 1983).

2. JUSTIFICACIÓN

Ante la inquietud generada por la información sobre las AVL potencialmente patógenas para el ser humano (De Jonckheere, 1979a, 1981a, 1987b; Fernández-Galiano, 1979; Martínez y Amado-Ledo, 1979; Rivera *et al.*, 1979, 1981, 1983, 1984b, 1987a, 1989c; Kasprzak *et al.*, 1982; John y De Jonckheere, 1985; Martínez, 1985; Rondanelli, 1987; John, 1993) y debido al gran número de casos sugerentes de MEAP y EAG en expedientes de hospitales del Edo. de San Luis Potosí, con antecedentes de haber nadado en cuerpos de agua termal, el Gobierno del Estado, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) y el Hospital Regional de Cd. Valles, solicitaron la evaluación biológica de diversos cuerpos de agua de uso recreativo como fuentes potenciales de infecciones.

La solicitud se deriva de la importancia que estos sistemas recreacionales tienen para el estado aunado a los reportes de meningoencefalitis de etiología desconocida, es decir, en donde no se ha detectado la presencia de bacterias, hongos o de virus como precursores de esta enfermedad, que el Sector Salud de San Luis Potosí ha reportado. Además, en los expedientes médicos de los casos no se reportaron signos de daño hepático o pulmonar ni de disentería ambiana que pudieran haber sido causados por *Entamoeba histolytica*. El personal médico de los hospitales de la Huasteca Potosina ha hecho hincapié en que *E. histolytica* es una amiba con una alta incidencia en esta región y por ello están familiarizados con los signos y síntomas que produce.

El proyecto ha sido financiado por el Gobierno del Estado, aportando recursos materiales y humanos en espera de las recomendaciones que surjan del presente estudio.

IV. OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar amibas de vida libre potencialmente patógenas para el ser humano en cuerpos de agua recreativos del Estado de San Luis Potosí.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar y ubicar taxonómicamente a las amibas aisladas hasta nivel de especie por criterios morfológicos y bioquímicos.
- b) Determinar la patogenicidad de los aislados mediante pruebas en animales de laboratorio.
- c) Conocer la relación entre la presencia de amibas de vida libre potencialmente patógenas y los siguientes parámetros fisicoquímicos del agua: oxígeno disuelto, pH, temperatura, cloro libre residual, conductividad, carbono orgánico total y sólidos.
- d) Determinar la abundancia de estas amibas.

V. DESCRIPCIÓN DEL AREA DE ESTUDIO

1. EL ESTADO DE SAN LUIS POTOSI

Los sitios de estudio se localizan en el estado de San Luis Potosí situado en la parte central de México. Se encuentra ubicado en la parte central de la República Mexicana, con una superficie de 68,068 Km². Por sus características geográficas el estado se divide en tres regiones: La Planicie Huasteca, La Zona Media y el Altiplano, está última es la más extensa, pues abarca las dos terceras partes de la superficie de la entidad.

El trópico de Cáncer lo atraviesa en la zona Norte, los municipios al norte de esta línea quedan dentro de la zona templada y los que están al sur en la zona intertropical. La temperatura del estado cambia principalmente a causa de la forma de su relieve, la vegetación y la altura sobre el nivel del mar. La temperatura media anual en el Altiplano Potosino es de 17.9 °C y en la Huasteca Potosina es de 24.6 °C. Los vientos alisios cálidos y húmedos, vienen del norte del golfo de México, entran a nuestro país por la planicie costera, después se encuentran la Sierra Madre Oriental con la que chocan, por ello se producen abundantes lluvias, después de pasar la Sierra Madre Oriental se vuelven secos. El beneficio de los alisios sólo lo recibe la Huasteca Potosina (De la Maza y White, 1990).

El estado de San Luis Potosí se divide en tres grandes zonas climáticas; la primera al oriente, está en la planicie costera y parte de la Sierra Madre Oriental donde predomina el clima tropical con lluvias en verano. Aquí el promedio mensual de temperatura es superior a los 20 °C con precipitaciones por arriba de los 800 mm anuales. La zona media del estado tiene temperatura variable durante las 24 horas del día, oscilando entre los 10 y 20 °C, la cantidad de lluvia es menor a los 700 mm anuales. El verano es la época lluviosa. Por último hay una región Potosina donde las condiciones de aridez son extremas y dan origen a un clima seco desértico como la región del Salado que tiene lluvias muy escasas, cercanas a los 200 mm anuales, debido a esto el estado de San Luis Potosí es de gran importancia para estudios de diversidad biológica (Bassols *et al.*, 1977; De la Maza y White, 1990).

2. LA HUASTECA POTOSINA

a. Localización e importancia

Se conoce como "Huasteca" a una amplia región fértil del noreste de nuestro país que comprende porciones de importantes entidades federativas como son: Tamaulipas, Veracruz, Hidalgo y San Luis Potosí, todas incluidas en la

porción limitada por la costa del Golfo de México al este y las coordenadas 24° al Norte, 101° al Oeste y 20° al Sur.

La Huasteca Potosina se encuentra entre los paralelos 21° 10' y 22° 30' Norte y los meridianos 98° 30' y 99° 20' Oeste. Destacan las sierras de San Martín, Tamazunchale, Xilitla, Tampache, Nicolás Pérez y Tanchipa. Pertenecen enteramente a la zona de drenaje del río Pánuco y sus afluentes. En esta zona encontramos tanto ríos caudalosos, como arroyos permanentes y manantiales. Numerosas lagunas se forman en los municipios de Tamuín, Tancuayalab y Tanquián.

El nombre de la "Huasteca" deriva de los habitantes de esta zona en la época prehispánica que fueron los huastecos. La Huasteca Potosina tiene gran importancia nacional desde varios puntos de vista: históricos, políticos, económicos y en cuanto a recursos naturales especialmente agropecuarios, pesqueros y turísticos por su gran variedad y riqueza (Bassols *et al.*, 1977).

En la parte norte de la Huasteca se ubica parte del proyecto del sistema de riego Pujal-Coy, uno de los más grandes de Iberoamérica. Sin embargo, a pesar de la importancia de la región, los estudios ecológicos sobre la misma no son tan abundantes y los enfoques multidisciplinarios faltan.

Desde el punto de vista biológico, la región destaca porque establece el límite norte de la zona cálido-húmeda en el continente americano. Un extenso grupo de plantas, animales y microorganismos de estas afinidades ecológicas encuentran aquí el margen de las posibilidades de existencia. La variada topografía de la región de la Huasteca es la causa de la existencia de una amplia gama de condiciones climáticas (De la Maza, 1990).

b. Clima

En la Huasteca Potosina se presentan notables contrastes, por una parte una planicie tropical cálida y baja, con invierno seco y lluvias en verano, por otra una sierra alta y de clima templado, con lluvias todo el año.

De acuerdo con la carta estatal de climas de la SPP (1983), el clima varía de la siguiente forma: Los climas cálidos, tipo A de Köppen, se encuentran en el plano costero, con aumento de la humedad en la medida que se acerca la Sierra Madre. La zona más seca, Awo, se encuentra al este de Tamuín. Existe un área más húmeda, Aw1, entre la localidad citada y Cd. Valles.

Los climas semicálidos se encuentran, al pie de las laderas inferiores de la Sierra Madre, desde entonces empieza a acentuarse la humedad. El clima (A) Cmw forma una amplia franja, que corre de NO a SE, ocupando la mayor parte de las serranías entre el Salto y Tamazunchale. Existe además un área semicálida de alta precipitación, (A) C (tm), que se localiza al sur, cerca de los límites con Querétaro e Hidalgo entre Xilitla y Tamazunchale, la zona semicálida menos húmeda, (A) C w1, corresponde a la parte más baja de la Sierra Madre Oriental y se localiza, a lo largo de esta cadena montañosa, al norte de Santa Catarina. En algunas zonas de sombra orográfica de la Sierra, se pueden encontrar manchones

aislados de (A)C wo w. Los climas templados se encuentran en las cimas y laderas superiores de la sierra madre, existiendo islas de clima C (m) (w) y C (w2) (w) (García, 1988).

c. Vegetación

La vegetación es de bosque tropical con mayor exuberancia en la sierra y más escaso en la llanura costera donde predomina el bosque tropical espinoso. La vegetación de sabana se alterna con bosques imponentes formados por árboles corpulentos, arbustos y lianas (Puig, 1976).

3. DESCRIPCIÓN DE LOS SITIOS DE ESTUDIO

A continuación se describen los lugares donde se localizan los sistemas recreacionales muestreados en este estudio (Fig. 3); (Dirección Estatal de Turismo del Estado de San Luis Potosí, 1984, 1993).

Ciudad Valles

Ciudad Valles está en plena Huasteca Potosina, a 87 msnm con clima cálido y vegetación exuberante, a 133 km de Río Verde y 265 de la Cd. de San Luis Potosí. Es la segunda ciudad de importancia en el estado, fue fundada el 25 de julio de 1533 por Nuño de Guzmán con el nombre de Villa de Santiago de los Valles de Oxitipa y es un importante centro comercial, agrícola y ganadero. Entre sus actividades industriales está la producción de azúcar, alcohol, fibra y otras. El municipio es regado por los ríos Valles y Tamaoñ; cuenta con numerosos manantiales, como "El Bañito", situado a 12 km sobre la carretera a Tamazunchale. En esta ciudad se localizan las piscinas de El Bañito, Instituto Mexicano del Seguro Social, Hotel Valles y Club Campestre.

Taninul

El Municipio de Tamuín se encuentra a 15 km de Cd. Valles por la carretera 70 a Tampico y 2 km más de desviación pavimentada, donde se encuentra el Hotel Balneario de Taninul, con un manantial de aguas sulfurosas y alcalinas, a 42 °C; estas aguas son recomendables para el tratamiento del reumatismo, neuralgia y otras enfermedades de la piel. En una alberca circula el agua del manantial, que constantemente está brotando.

Xilitla

Pueblo y cabecera municipal Xilitla está asentado en lo más abrupto de la sierra del mismo nombre, a 1 055 msnm, su clima es templado y lluvioso todo el año, se encuentra a 41 km de Tancanhuitz. Su nombre significa en náhuatl "lugar de cozole", esta última palabra designa una variedad de cangrejo que abunda en esta zona. Está situado en la sierra, a media ladera de altas montañas

y con una vista hacia la profunda cañada por donde escurre el río Tancuilín. Por su altitud esta zona se cubre de bruma, lo que vuelve a los cerros de la Silleta y de la Ventana con su hueco, un espectáculo muy especial.

Luego de andar por un camino de terracería se llega a “Las Pozas”, una de las más espectaculares y extrañas arquitecturas surrealistas del mundo a lo que se le llamó arquitectura integrada a la naturaleza”.

El terreno que adquirió abarca un cerro y un valle bajo, lleno de vegetación y cascadas naturales donde se encuentran un conjunto de pozas creadas *ex profeso* para que en ellas se nadara y que desembocan en una inmensa cascada.

La diversidad de ecosistemas del estado de San Luis Potosí incluye una pequeña porción de bosque mesófilo de montaña “de niebla”, ubicado en Xilitla. Esta formación vegetal es de suma importancia para nuestro país, pues ocupa menos del 1% de la superficie total de la República Mexicana.

La zona media del estado tiene un clima más seco, con temperatura media anual superior a los 18 °C y lluvias en verano. En esta zona del Altiplano Potosino se ubicó un lugar de muestreo:

Gogorrón

El municipio Villa de Reyes fue fundado en 1570 con el nombre de Valle de San Francisco, hoy debe su nombre a Julián de los Reyes, ex gobernador del estado. El pueblo se extiende en un fértil valle.

A 9 km de Villa de Reyes está el Centro Vacacional Gogorrón, cuenta con aguas termales de hasta 42°C; sus cualidades para el tratamiento de padecimientos reumáticos y artríticos son reconocidos internacionalmente, además posee cabañas, baños romanos, piscinas, chapoteaderos y jardines.

Tambaque

Para llegar a el Municipio de Aquismón se toma como punto de partida Cd. Valles, y la carretera 85 a Tamazunchale. Aquismón (en huasteco Tamaquichimón “lugar del aquiche (nombre del árbol *Guazuma ulmifolia* Lam.) cercano al pozo”); pueblo a las faldas de la siempre verde Madre Oriental. De Aquismón, por terracería nace el arroyo Tambaque (lugar llamado “el Nacimiento”), lugar donde se recolectaron las muestras.

Tancanhuitz

A 65 km de Cd. Valles, o a 13 de Aquismón por la carretera 85, se encuentra el municipio de Tancanhuitz de Santos y su nombre significa en huasteco “lugar de la flor del amor”. Aquí está el Arroyo de la Sierra de Tancanhuitz, frontera natural que divide a los huastecos al sur y a los nahuas al norte. El arroyo de Huehuetlán baña la parte sur del pueblo.

La separación de los sistemas recreacionales en naturales y artificiales es relevante puesto que las poblaciones microbianas, incluyendo a las AVL, se ven afectadas en los cuerpos acuáticos artificiales. La mano del hombre los manipula al secarlos para su limpieza, ponerles detergentes y desinfectantes, o simplemente al no ejercer acción sobre ellos permitiendo que ocurran los fenómenos naturales de colonización, maduración y sucesión (Chang, 1978; Daggett *et al.*, 1982; Martínez, 1985). Las acciones humanas también influyen a las poblaciones ambianas al cambiar su comportamiento natural, promoviendo que especies nativas sean desplazadas por otras más resistentes. El continuo manipuleo de los cuerpos de agua artificiales también afecta el comportamiento de los depredadores que normalmente controlan las poblaciones ambianas (Griffin, 1972, 1983; De Jonckheere, 1979b; Kyle y Pittman, 1985; Deterline y Wilhelm, 1991; Rivera *et al.*, 1993).

Puesto que se conocen las características ambientales que favorecen la sobrevivencia de las AVL (Cerva, 1971; De Jonckheere *et al.*, 1975; De Jonckheere y Van de Voorde, 1977; Chang, 1978; De Jonckheere, 1981b; Delattre y Oger, 1981; Cerva *et al.*, 1982; Brown *et al.*, 1983; Kyle y Noblet, 1987; Kilvington *et al.*, 1991b), se seleccionaron un total de 10 sitios de interés turístico en el Estado de San Luis Potosí como se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 3.

TABLA 5. Sitios de muestreo en el Estado de San Luis Potosí.

Sistemas recreacionales artificiales	Municipio	Tipo	Abreviatura
1. El Bañito	Ciudad Valles	piscinas termales	B
2. Piscina del IMSS	Ciudad Valles	piscinas no termales	IMSS
3. Hotel Valles	Ciudad Valles	piscinas termales	V
4. Club Campestre	Ciudad Valles	piscinas no termales	CC
5. Taninul	Tamuín	piscinas termales	Tn
6. Xilitla	Xilitla	pozas no termales	X
7. Gogorrón	Villa de Reyes	piscinas termales	G
Sistemas recreacionales naturales			
8. Estanque de Taninul	Tamuín	estanque no termal	Ch
9. Tambaque	Aquismón	rio no termal	Tq
10. Tancanhuitz	Tancanhuitz	arroyo no termal	Tz

Aunque no existen estadísticas precisas del número de usuarios que visitan anualmente estos sistemas recreacionales en el Estado de San Luis Potosí, la información oficial menciona que concentran más del 75% de los bañistas que concurren a los sitios de recreo de la zona de la Huasteca Potosina y de la Cd. de San Luis Potosí (Dirección Estatal de Turismo del Estado de San Luis Potosí, 1984, 1993).

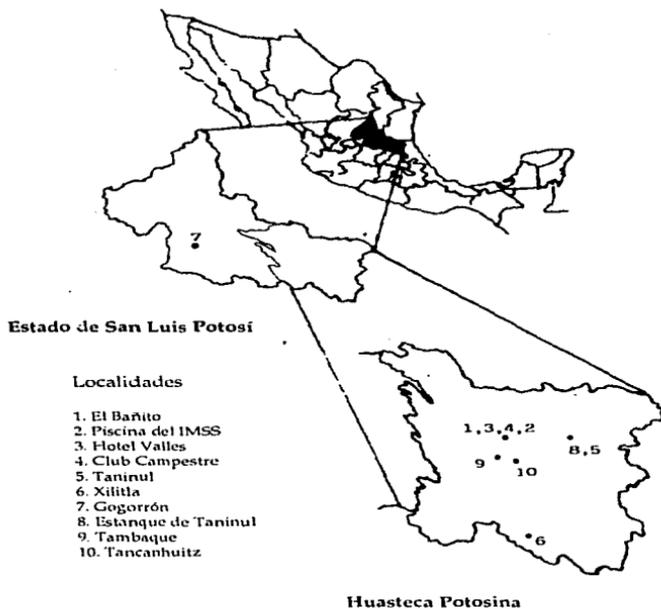


Figura 3. Localización de los sitios de muestreo en el Estado de San Luis Potosí. Los puntos indican el municipio y los números los sistemas recreacionales.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

En este trabajo de investigación se hicieron cuatro muestreos en el Estado de San Luis Potosí, considerando cuerpos de agua naturales y artificiales en la Huasteca y en el Altiplano Potosino. Los muestreos se hicieron en los meses de septiembre de 1993, marzo de 1994, diciembre de 1995 y marzo de 1996.

Se dio especial cuidado a la selección de los sitios de muestreo para abarcar la mayor extensión del estado. Cabe mencionar que estos lugares son los más populares del estado además de su belleza, por la facilidad de acceso a través de carreteras o caminos transitables todo el año (Tabla 5 y Fig. 3).

1. RECOLECTA Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS

a. Agua

Las muestras de agua se recolectaron en frascos esterilizados de 1 l, color ámbar a 10 cm de profundidad del agua. La toma de muestras de agua y sedimento (ver abajo) se hizo en las zonas del cuerpo de agua en donde las personas prefieren nadar. Las muestras se transportaron a temperatura ambiente (las AVL son sensibles a los cambios de temperatura inmediatamente) al laboratorio de microbiología de la Universidad de San Luis Potosí, Unidad Valles, para ser procesadas.

Las muestras para determinación de carbón orgánico total fueron recolectadas en frascos de 50 ml; las muestras para determinación de sólidos suspendidos, sedimentables y totales en frascos de 300 ml. Ambas muestras se congelaron y se transportaron inmediatamente al laboratorio para ser procesadas.

b. Sedimento

Se recolectaron muestras de sedimento con la técnica de recolecta de piezas de sustrato con perifiton (Edmondson y Winberg, 1971). La colección de sedimento aumenta la probabilidad de aislar AVL puesto que los trofozoitos viven, se alimentan y desplazan sobre partículas. Además, la riqueza de materia orgánica y bacterias (alimento principal de las amibas) suele ser mayor en el sedimento (Kyle y Pittman, 1985; Kyle y Noblet, 1986, 1987; Marciano-Cabral y Cline, 1987; Torsvik, 1995).

2. DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE AVL

a. Aislamiento de AVL

Las muestras se procesaron según el método descrito por De Jonckheere (1984) para aislar AVL, se tomaron duplicados de 50 ml de cada muestra de 1 l recolectada (ver Sección VI.1.a) y se concentraron por centrifugación a 2,500 rpm durante 10 min (centrífuga Beckman TJ-6). Se desechó el sobrenadante y la pastilla fue sembrada por duplicado sobre placas con medio de agar no nutritivo (NNE), con *Escherichia coli* muerta por calor (65-70 °C durante 30 min ver Anexo 3). La capa bacteriana sirve de fuente proteica para que las amibas se desarrollen (Rivera *et al.*, 1981; De Jonckheere, 1987a; Kalinina y Page, 1992). Las placas sembradas se incubaron a 45 °C, en posición invertida, dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación (Delattre y Oger, 1981; Martínez, 1985; Rivera *et al.*, 1992, 1994). Asimismo, se inocularon placas de NNE con 1g de las muestras de sedimento recolectadas y se mantuvieron en iguales condiciones.

A las 24 h de incubación se realizó la primera observación de las placas en un microscopio invertido (Zeiss, Mod. D). Cuando se detectó crecimiento de amibas en las placas, se marcó la zona de mayor abundancia y se cortó un trozo de agar (aproximadamente de 5 mm²) en condiciones de esterilidad, para sembrar en una placa nueva (incubando a 42 y 45 °C) (De Jonckheere, 1984). Transcurridas otras 24 h se revisaron las placas procurando identificar trofozoitos de morfología diferente para sembrarlos por separado en placas nuevas del mismo medio, incubadas a 45 °C por 24 h más. Finalmente, los aislados positivos fueron transportados en incubadora al Laboratorio de Microbiología Ambiental del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala de la UNAM.

b. Clonación

Transcurridas 24 h de cultivo, se separaron trofozoitos individuales con la ayuda de una micropipeta y del microscopio invertido para ser sembradas individualmente en placas nuevas incubadas a 45 °C por otras 24 h. Todo el manejo de las muestras se llevó a cabo con material estéril en campanas de flujo laminar con un nivel de bioseguridad II.

c. Identificación

La identificación de las AVL se llevó a cabo por diversos métodos basados en características morfológicas, bioquímicas, fisiológicas y de patogenicidad de estos organismos (Rondanelli, 1987). El primer paso para la identificación fue la observación de los trofozoitos y quistes en un microscopio de contraste de fases, basándose en las claves taxonómicas de Page (1966, 1975, 1976, 1988) y de Pussard y Pons (1977). La identificación establecida por morfometría de las amibas aisladas se confirmó por técnicas de isoenzimas (Sección VI. 2. g y Anexo 4). Las tinciones empleadas pueden consultarse en el Anexo 3.

d. Pruebas de transformación ameboflagelar

Todos los aislados se analizaron para determinar si tienen capacidad de transformación ameboflagelar. La prueba consistió en colocar unas gotas de agua destilada sobre la superficie de una placa de NNE en la que se hizo crecer una clona de amibas que se sospecho pertenecía a la familia Vahlkampfiidae y se incubo a 37 °C durante 2 h. La placa se observó a intervalos de 30 min en el microscopio invertido para determinar si aparecían formas flageladas. Cuando esta prueba era positiva, las amibas se adjudicaban a la familia anterior con posibilidades de tratarse de *Naegleria fowleri* (Rivera y Paz, 1978; Rivera *et al.*, 1978a, b; De Jonckheere, 1981a; Cable y John, 1986; Mascaró *et al.*, 1986; Robinson *et al.*, 1989, 1992). La confirmación del género se realizó posteriormente por morfometría e isoenzimas.

e. Axenización

Una vez identificado y clonado el aislado de AVL se transfirió a tubos con medio líquido para cultivo axénico PBSGM (Anexo 3) y se hicieron crecer los trofozoitos libres de bacterias que serían usados en las pruebas de patogenicidad en ratones y en los análisis de isoenzimas. Los trofozoitos fueron transferidos al medio líquido cortando pequeños trozos del agar en donde se observó el mejor crecimiento ambiano, y se introdujeron en el medio y se incubaron a 45 °C, manteniendo inclinados los tubos y sin agitación (De Jonckheere, 1977; Rivera *et al.*, 1988, 1989a). Para mantener el aislado por períodos prolongados se hicieron resiembras en tubos con el mismo medio PBSGM. En algunos casos no fue posible crecer las amibas en forma axénica lo que obligó a introducir controles de bacterias solas en las pruebas anteriores.

Los medios axénicos contenían sales y alguna fuente de carbono como aminoácidos y glucosa, además de suero fetal de bovino. En ocasiones fue necesario agregar vitaminas y ácidos nucleicos para favorecer el crecimiento de las amibas. Con el fin de evitar contaminaciones bacterianas externas en los cultivos axénicos, se agregó penicilina G sal sódica, estreptomicina y kanamicina en concentraciones de 200 µg/ml (De Jonckheere, 1977).

f. Material biológico de referencia

Se utilizaron cepas tipo del American Type Culture Collection (Nerad, 1993) de los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Hartmannella vermiformis* del Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) y del Catálogo de Colección del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) de la ENEP Izacala UNAM, las cuales se muestran en la Tabla 6.

TABLA 6. Cepas de referencia de la Colección del Proyecto CyMA.

Cepa amibiana	Clave de catálogo
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	A-1
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	A-C
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	Neff
<i>Acanthamoeba divionensis</i>	AA-1
<i>Acanthamoeba griffini</i>	S-7
<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	BH2
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	b
<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	PD2
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	Garcia
<i>Acanthamoeba lugdunensis</i>	SH-565
<i>Acanthamoeba mauritaniensis</i>	1652
<i>Acanthamoeba mauritaniensis</i>	SH-197
<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	2802
<i>Acanthamoeba palestinensis</i>	REICH
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	P-23
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Polyphaga
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Queratitis
<i>Acanthamoeba quina</i>	L1-a
<i>Acanthamoeba rhyssodes</i>	R4C
<i>Hartmannella vermiformis</i>	1534/12
<i>Hartmannella vermiformis</i>	1534/7A
<i>Hartmannella vermiformis</i>	1534/7B
<i>Hartmannella vermiformis</i>	PT-1
<i>Naegleria australiensis</i>	PP 397
<i>Naegleria australiensis italica</i>	Italica
<i>Naegleria fowleri</i>	30808
<i>Naegleria gruberi</i>	1-E
<i>Naegleria lovaniensis</i>	N. lov.

g. Pruebas de isoenzimas

Las pruebas de isoenzimas corroboraron la identificación de las amibas aisladas y se basaron en la comparación de patrones enzimáticos de aislados problema con cepas de referencia tipo obtenidas del ATCC (Nerad, 1993) y de la CCAP de Gran Bretaña, además del Catálogo de Colección del Proyecto CyMA de la UNAM, el más completo de México para AVL. Esta prueba ha sido aplicada con éxito a extractos crudos de aislados de AVL (De Jonckheere, 1982; Woodworth *et al.*, 1982; Daggett y Nerad, 1983; Visvesvara *et al.*, 1983; Pernin *et al.*, 1985; Richardson *et al.*, 1986; Andrews *et al.*, 1989). Las pruebas consisten en

el corrimiento inicial de los extractos crudos de amibas de referencia y clonas problema, en un sistema de electroforesis por isoelectroenfoque en geles de agarosa (De Jonckheere, 1984). Se determinó la actividad de tres enzimas: fosfatasa ácida (FA), propionil esterasa (PE) y malato deshidrogenasa (MDH). Estudios previos muestran que la determinación de las tres enzimas es suficiente para permitir la diferenciación de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella*, aunque en ocasiones para *Hartmannella* es necesario incluir el análisis de la alcohol deshidrogenasa (AlcDH) y de otras (Nerad y Daggett, 1979; De Jonckheere, 1981a; Robinson *et al.*, 1992).

No todos los cultivos de amibas pudieron ser axenizados, es decir, en cultivos puros. Muchos de ellos se continúan cultivando en medios monoxénicos y se omite la representación de la muestra control de bacteria, porque en las pruebas no apareció ninguna banda. El isoelectroenfoque consiste en separar los diferentes componentes de una enzima sobre un sustrato de agarosa con un anfólito. Al hacer pasar una corriente eléctrica de alto voltaje sobre ese sustrato y una muestra de amiba, por las propiedades del anfólito se genera un gradiente de pH sobre la agarosa y las proteínas de las amibas emigran en este pH hasta alcanzar su punto isoelectrónico. Con un revelador enzimático adecuado se pueden hacer visibles las bandas de las enzimas que responden a un sustrato específico, es decir, podemos hacer visibles aquellas enzimas que sean útiles para la identificación amibiana (Pernin *et al.*, 1985; Robinson *et al.*, 1992). Las enzimas de cada aislado fueron analógadas con una huella digital de una especie de referencia. Si un aislado mostró un patrón enzimático semejante a otra amiba de referencia, existió una gran probabilidad de que ambos organismos pertenecieran a la misma especie (Anexo 4).

h. Pruebas de patogenicidad en ratones

La patogenicidad de los trofozoítos aislados se determinó en ratones inmediatamente después de la axenización para evitar la disminución de la virulencia de las amibas (Wong *et al.*, 1975; De Jonckheere *et al.*, 1983, 1984; Reilly *et al.*, 1983, a, b). La inoculación de los ratones fue probada por dos vías; por inoculación intracerebral y por instilación nasal. La inoculación intracerebral se hizo concentrando por centrifugación los trofozoítos del cultivo axénico, en etapa de crecimiento exponencial, hasta una densidad de 1×10^6 /ml. Las amibas fueron inyectadas en un volumen de 20 μ l con una jeringa para insulina; la aplicación fue intracerebral a través de los huesos parietales o de la articulación interparietal, hacia la línea media del cráneo o a la altura de las orejas (Wong *et al.*, 1977; Batista *et al.*, 1982; De Jonckheere *et al.*, 1983; Ferrante, 1991; Pidherney *et al.*, 1993).

Para la inoculación por instilación nasal, la misma dosis de amibas se introdujo con una jeringa de 1 ml a través de los orificios nasales del ratón. Ambas pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo en grupos de cinco ratones machos de la cepa CD-1, de tres semanas de edad.

Los ratones inoculados de las dos maneras se vigilaron diariamente para determinar la mortalidad de los mismos. Los ratones inoculados con amibas que sobrevivieron 21 días, fueron sacrificados y disectados para sembrar trozos de algunos órganos (cerebro, hígado, pulmón y riñones) en placas de NNE, que se mantuvieron a 45 °C por 24 h. A los ratones muertos antes de los 21 días, también se les extrajeron los órganos y se sembraron de la misma manera. Una cepa amibiana se considera patógena cuando la mortalidad de ratones alcanza el 60% por cualquiera de las dos vías utilizadas (Wong *et al.*, 1977)

i. Estimación cuantitativa de amibas

Originalmente la estimación cuantitativa de AVL en los cuerpos de agua no estaba contemplada en los objetivos de este trabajo, por esta razón no se obtuvieron resultados del número más probable (NMP) en los muestreos I y II. Para estimar el riesgo de infección se determinó la concentración de amibas en agua y sedimentos en el III y IV muestreos.

En todos los sistemas recreacionales se tomaron muestras del agua para realizar la prueba del NMP. Las muestras de sedimento corresponden a los sistemas recreacionales naturales de Tambaque, Tancanhuitz, Taninul y Xilitla ya que la mayoría de los sistemas recreacionales artificiales no permiten la acumulación de sedimentos. Las amibas normalmente se adhieren a superficies inertes, a partículas de materia orgánica y plantas sumergidas. Sin embargo, una corriente suficientemente fuerte las arrastra junto con la materia particulada hacia la columna de agua. La excepción en este estudio es el sistema recreacional de Taninul que posee una piscina artificial que se alimenta de un manantial de agua termal. Originalmente la estimación cuantitativa de AVL en los cuerpos de agua no estaba contemplada en los objetivos de este trabajo, por esta razón no se obtuvieron resultados del número más probable (NMP) en los muestreos I y II. No obstante, en un intento para estimar el riesgo de infección, se determinó la concentración de amibas en agua y sedimentos a partir del tercer muestreo.

Se determinó el número aproximado de amibas en la muestra de agua, permitiendo establecer criterios como riesgo de infección o efectividad de técnicas de desinfección; la estimación del número de amibas tuvo un propósito más general en el estudios ecológico de las amibas en relación con las variables ambientales. En este estudio utilizamos el método de número más probable para estimar la densidad de las amibas en el agua. El principio del método es el de utilizar la distribución de los organismos en varias réplicas de diluciones para estimar el número de amibas por unidad de volumen en la muestra. La densidad estimada se puede obtener directamente y tiene un intervalo de confianza relativamente bueno; los resultados se expresan en la forma del Número Más Probable (NMP) (Robinson *et al.*, 1992).

En el presente estudio se siguió el método modificado por Darbyshire y colaboradores (1974), de las diluciones para la estimación cuantitativa de gimnamebas (Singh, 1985).

Se preparó una suspensión inicial 1:10 de sedimento usando solución de Page como diluyente (1 g/100 ml) o 100 ml de agua. Se hicieron series de diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000) y se tomó una alícuota de 0.05 ml de cada dilución en cada uno de tres pozos de una placa de ELISA de 96-pozos. La aparición de trofozoítos de AVL fue examinada a intervalos de cuatro días. Después de una semana, se agregó una suspensión de *Escherichia coli*, para inducir que los quistes de amibas se desenquistaran. Se contó el número de pozos positivos y negativos y se consultaron las tablas apropiadas referidas en Singh (1985) y en Greenberg y colaboradores (1988), además se hizo el estimado utilizando la fórmula de Parnow (1992) en un programa de computo usado en el Museo de Historia Natural de Londres (Warren, com. pers.).

3. NIVELES DE INFESTACIÓN DEL AGUA (NIA)

La relación entre el número de amibas patógenas y el número de aislamientos totales se determinó por la fórmula:

$$NIA = AVL \text{ patógenas} \times 100 / \text{No. total de muestras de agua colectadas}$$

El resultado se expresó en porcentaje. Este valor nos permitió estimar el índice de infestación, y por lo tanto de peligrosidad, de cada uno de los sitios de muestreo (Cano-Santana, com. pers.).

4. FACTORES AMBIENTALES

a. Determinaciones en el campo

Para registrar las lecturas de los parámetros fisicoquímicos y establecer su relación con los aislamientos amibianos obtenidos en el laboratorio, se hicieron las siguientes determinaciones *in situ*:

- Oxígeno disuelto (OD) con un oxímetro YSI modelo 33.
- Temperaturas, con un termómetro digital Digi-Sense Cole Parmer.
- pH, con un potenciómetro Digi-sense modelo 5985-00.
- Conductividad, con el conductímetro YSI modelo 33B.
- Cloro libre residual determinado por el método de titulación yodométrica según el manual del "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (Greenberg *et al.*, 1988), el cual fue realizado solamente en las muestras obtenidas de las piscinas.

b. Determinaciones en el laboratorio

Las muestras transportadas al laboratorio (Sección VI.1.a) fueron sometidas a las siguientes determinaciones:

- **Carbono orgánico total (COT).** Muestras por triplicado fueron enviadas en un lapso menor de 48 h al Laboratorio de Ingeniería Ambiental del Instituto de Ingeniería de la UNAM para ser determinadas con un analizador de carbono orgánico total Beckman modelo 915B.
- **Sólidos suspendidos, sedimentables y totales.** Muestras por triplicado fueron enviadas para su determinación al laboratorio de análisis fisicoquímicos del Proyecto CyMA de la ENEP Iztacala UNAM. Los métodos utilizados están descritos en el manual "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" (Greenberg *et al.*, 1988).

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se obtuvieron los índices de correlación de Spearman (prueba no paramétrica) entre el número de especies de amibas totales (S tot.), de amibas patógenas (S pat.) y de amibas no patógenas (S no pat.), donde $S \text{ tot.} = S \text{ pat.} + S \text{ no pat.}$, y todas las variables ambientales medidas en las colectas.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se efectuaron cuatro muestreos en los 10 balnearios de mayor importancia turística en el Estado de San Luis Potosí, durante el período de septiembre de 1993 a marzo de 1996, en busca de AVL con potencial patógeno para el ser humano y animales. El estudio incluyó balnearios naturales y artificiales, así como termales y no termales (ver Sección V; Tabla 5).

1. AMIBAS DE VIDA LIBRE EN LAS MUESTRAS RECOLECTADAS

Para facilitar la presentación de los resultados, los aislados fueron catalogados con la siguiente nomenclatura:

- Número de muestreo: I (septiembre de 1993); II (marzo de 1994; III (diciembre de 1995) y IV (marzo de 1996).
- Abreviatura de la localidad de muestreo (Tabla 5)
- Número de muestra tomada de cada localidad; 1, 2, 3, etc.
- Placa de cultivo donde se obtuvo el aislado; (a), (b), (c) etc.
- ' aislado de sedimento

Por ejemplo: II Tn 2' (b) Denota al aislado amibiano de el muestreo II, lugar, Taninul, muestra No. 2, aislada de sedimento correspondiente a la placa b.

La identificación de las amibas se hizo inicialmente por pruebas convencionales de laboratorio para determinar su género: tolerancia a la temperatura (42 y 45 °C), transformación ameboflagelar y observación de quistes y trofozoitos al microscopio de contraste de fases. Posteriormente, se determinó el patrón de isoenzimas de cada uno de los aislados y se comparó con los patrones de referencia de amibas tipo (Secciones VI.2.f y VI.2.g). De esta manera es posible confirmar el diagnóstico previo o en su caso reconsiderarlo.

En el muestreo I (Tabla 7) se visitaron nueve localidades y se obtuvieron 35 aislados de AVL. Las más frecuentemente aisladas fueron *Naegleria* que es la de mayor potencial patógeno en humanos y *Hartmannella* con siete aislados cada una. También se obtuvieron trofozoitos de *Acanthamoeba*. Los sistemas recreacionales con mayor número de aislados de AVL resultaron ser Taninul y El Bañito, ambos con aguas termales.

El 72% de los aislados de AVL con mayor potencial patógeno (*Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella*) fueron obtenidos de tres de los sistemas recreacionales más frecuentados en las ciudades de Valles y San Luis Potosí (El Bañito, Taninul y Gogorrón). En la piscina del IMSS y en la del Club Campestre de Cd. Valles no se obtuvieron aislados de AVL, en coincidencia con un

mantenimiento más estricto en estos sistemas recreacionales, incluyendo limpieza frecuente de sus piscinas, y especialmente, mantenimiento de una alta concentración de cloro libre que alcanza valores de 2-8 mg/l, lo que representa una concentración mayor de la recomendada (Tabla A2 en Anexo 2) de hasta 2.5 mg/l a pH de 7.2 y 25 °C de temperatura (Chang, 1978).

TABLA 7. Géneros aislados de AVL determinados en cada sistema recreacional durante el muestreo I.

Sistema recreacional	Géneros amibianos aislados						NI ¹	Total de aislados
	<i>Hartmannella</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Valikampijia</i>	<i>Echinamoeba</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Villalbertia</i>		
El Bañito	4	4	0	0	1	1	0	10
Taninul	3	1	0	2	0	5	0	11
H. Valles	2	1	0	0	0	0	0	3
IMSS	0	0	0	0	0	0	0	0
Tambaque	0	1	0	0	0	0	0	1
Tancanhuitz	0	1	2	0	0	0	2	5
Est. Taninul	0	1	0	0	0	0	0	1
C. Campestre	0	0	0	0	0	0	0	0
Gogorrón	0	0	0	2	1	0	1	4
Subtotal	9	9	2	4	2	6	3	35

¹ No identificado

TABLA 8. Géneros aislados de AVL determinados en cada sistema recreacional durante el muestreo II.

Sistema recreacional	Géneros amibianos aislados					Total de aislados
	<i>Hartmannella</i>	<i>Naegleria</i>	<i>Valikampijia</i>	<i>Echinamoeba</i>	<i>Villalbertia</i>	
El Bañito	2	1	0	0	0	3
Taninul	2	1	0	1	1	5
Tambaque	0	0	1	0	0	1
Tancanhuitz	1	0	0	0	0	1
Xilitla	1	0	0	0	0	1
Gogorrón	0	0	0	2	0	2
Subtotal	6	2	1	3	1	13

En el muestreo II se estudiaron seis sistemas recreacionales obteniéndose un total de 13 aislados de AVL (Tabla 8), lo que sugiere una abundancia relativa menor que la del muestreo I. Los aislados se agruparon en un total de cinco géneros diferentes siendo ahora *Naegleria* poco frecuente y *Acanthamoeba* ausente. Nuevamente, los sistemas recreacionales artificiales con mayor número de

aislados de AVL fueron los tres más frecuentados del Estado (Taninul , El Bañito y Gogorrón).

En el muestreo III se obtuvieron resultados similares al anterior en las ocho localidades estudiadas (Tabla 9). Los sistemas recreacionales de Taninul, Gogorrón y El Bañito nuevamente registraron el 70 % de todos los aislamientos ambianos.

Los resultados del muestreo IV mostraron casi el mismo número de aislados de AVL que los muestreos II y III y menor que los del muestreo I. La distribución por géneros fue también similar así como la identificación de los sistemas recreacionales más contaminados (Tabla 10).

TABLA 9. Géneros aislados de AVL determinados en cada sistema recreacional durante el muestreo III.

Géneros ambianos aislados							
Sistema recreacional	<i>Hartmannella</i>	<i>Nargleria</i>	<i>Vahikampfa</i>	<i>Echinamoeba</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Villaveria</i>	Total de aislados
El Bañito	1	1	0	0	1	0	3
Taninul	1	1	1	0	0	1	4
H. Valles	1	0	0	0	0	0	1
IMSS	0	0	0	0	0	0	0
Tambaque	0	1	0	0	0	0	1
Tancanhuitz	0	1	1	0	0	0	2
Xilitla	1	0	0	0	0	0	1
Gogorrón	1	1	0	1	1	0	4
Subtotal	5	5	2	1	2	1	16

TABLA 10. Géneros aislados de AVL determinados en cada sistema recreacional durante el muestreo IV.

Géneros ambianos aislados							
Sistema recreacional	<i>Hartmannella</i>	<i>Nargleria</i>	<i>Vahikampfa</i>	<i>Echinamoeba</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Villaveria</i>	Total de aislados
El Bañito	1	1	0	0	1	0	3
Taninul	1	1	1	1	0	1	5
H. Valles	1	0	0	0	1	0	2
IMSS	0	0	0	0	0	0	0
Tambaque	0	1	0	0	0	0	1
Tancanhuitz	1	1	1	0	0	0	3
Xilitla	1	0	0	0	0	0	1
Gogorrón	1	0	0	1	0	0	2
Subtotal	6	4	2	2	2	1	17

La Tabla 11 resume los resultados de los cuatro muestreos en relación con la temperatura del ambiente y del agua, en total se obtuvieron 81 muestras. En general se acepta que los cuerpos de agua con elevadas temperaturas ofrecen un lugar libre de competencia y con escasa o nula depredación para AVL que son especialmente termotolerantes (Griffin, 1983).

TABLA 11. Total de AVL aisladas de los sistemas recreacionales naturales y artificiales en 4 muestreos en el Estado de San Luis Potosí.

Sistema recreacional	Muestreo I Sep. 1993			Muestreo II Mar. 1994		
	Temp. agua °C	Temp. ambiente °C	No. de aislados	Temp. agua °C	Temp. ambiente °C	No. de aislados
El Bañito	32.0	32.1	10	31.0	27.0	3
Taninul	36.3	29.3	11	35.7	25.3	5
H. Valles	31.0	32.4	3	-	-	-
Campestre	31.5	33.3	0	-	-	-
Tambaque	22.0	30.3	1	24.9	25.0	1
E. Taninul	34.4	29.4	1	-	-	-
Tancanhuitz	26.0	30.5	5	19.8	25.9	1
IMSS	32.0	35.2	0	-	-	-
Xilitla	-	-	-	18.4	20.3	1
Gogorrón	37.0	25.6	4	38.5	29.0	2
TOTAL			35			13
Sistema recreacional	Muestreo III Dic. 1995			Muestreo IV Mar. 1996		
	Temp. agua °C	Temp. ambiente °C	No. de aislados	Temp. agua °C	Temp. ambiente °C	No. de aislados
El Bañito	32.1	20.6	3	31.9	32.2	3
Taninul	37.2	23.7	4	37.6	31.2	5
H. Valles	30.4	25.3	1	31.5	33.5	2
IMSS	26.1	20.0	0	28.0	29.1	0
Tambaque	24.0	18.2	1	25.1	23.3	1
Tancanhuitz	19.2	18.5	2	22.3	21.5	3
Xilitla	17.3	17.1	1	19.5	20.6	1
Gogorrón	37.2	30.3	4	40.7	28.1	2
TOTAL			16			17

A pesar de que no es posible emitir un explicación simple para la presencia de AVL, es claro que algunos sistemas recreacionales (Taninul, El Bañito y Gogorrón, con agua termal y el sistema recreacional natural de Tancanhuitz, con agua no termal) representan un riesgo considerable a los bañistas que los frecuentan. Es preocupante que algunos de ellos se encuentran entre los más populares en el Estado de San Luis Potosí.

Otro factor que puede influir directamente sobre la cantidad de AVL en el agua es la precipitación pluvial, que arrastra los sedimentos con amibas a los cuerpos de agua. Por lo anterior, cabe hacer notar que solamente en el primer

muestreo efectuado en diciembre de 1993 se dieron intensas precipitaciones pluviales en la Huasteca Potosina. A partir de 1994 se presentó una prolongada sequía que duró hasta el año de 1996.

En cuatro muestreos se detectaron 81 aislados de amibas desnudas, lo que nos da un promedio de 20 aislados por cada muestreo (Tabla 12). Del total, 62 aislados de AVL fueron recolectados solo de los sistemas recreacionales artificiales de Taninul, El Bañito, Gogorrón, el Hotel Valles y Xilitla, lo que nos da un valor del 77 % de las amibas encontradas. Los otros 19 aislados que representan el 23% de los aislamientos fueron obtenidos de los cuerpos de agua naturales de Tancahuitz, Tambaque y el estanque de Taninul. Este comportamiento puede deberse a cuatro causas principales:

a) El agua contenida en los sistemas recreacionales artificiales, aunque es agua corriente, permanece durante más tiempo confinada, lo que permite una mayor acumulación de materia orgánica y bacterias que favorecen la proliferación de las amibas, a diferencia de los cuerpos de agua naturales donde el agua fluye constantemente a una velocidad mayor.

b) La gran afluencia de bañistas al El Bañito, Taninul y Gogorrón puede ser un factor importante de aporte de amibas al agua, debido a que estas albercas están rodeadas de pasto y tierra y el caminar de los visitantes puede aumentar el inoculo de AVL, bacterias y otros nutrimentos a las albercas.

c) El agua caliente. Algunos grupos de amibas prefieren las temperaturas mayores de 25 °C en el agua, pero cuando esta aumenta, algunos organismos termotolerantes pueden ser más competitivos sobre otros, desplazándolos y ocupando mayor cantidad de lugares (como es el caso de las AVL termotolerantes). Considérese que la temperatura promedio de los tres sistemas recreacionales antes citados es de 35.6 °C.

d) Mantenimiento de los sistemas recreacionales. La limpieza y desinfección de los sistemas recreacionales es un factor que influye directamente en la prevalencia de las amibas en las piscinas. Como se observa en el caso de Gogorrón (Tabla 11) aunque la temperatura es elevada (hasta 40.7 °C), el número de aislamiento fue menor en comparación con otros sistemas recreacionales, debido a que el sistema recreacional es clorado y lavado una vez a la semana.

Al respecto de la confiabilidad de los métodos de identificación de las amibas, se obtuvieron seis géneros de gimnamebas y se detectaron tres aislados de AVL que pertenecen a la familia Vahlkampfiidae y por lo menos a otros dos géneros, no descritos en las claves del catálogo de Page (1988), ni mencionados en los catálogos del ATCC ni del CCAP. Los resultados recientes sugieren que se trata de nuevas especies y quizá un nuevo género, ya que no existen AVL con esas características en cuanto a forma, número de núcleos, tamaño del quiste y del trofozoito entre otros.

TABLA 12. Número de aislados encontrados por sistema recreacional en 4 muestreos en San Luis Potosí.

Sistema recreacional	No. de aislados
Taninul	25
El Bañito	19
Gogorrón	12
Tancanhuitz	11
H. Valles	6
Tambaque	4
Xilitla	3
E. Taninul	1
C. Campestre	0
IMSS	0
Total	81

Finalmente los géneros más frecuentemente aislados fueron *Hartmannella*, *Naegleria* y *Echinamoeba* con 56 organismos, mientras que *Willaertia*, *Valikampfia* y *Acanthamoeba* tuvieron menor número de organismos aislados (23 aislados) (Tabla 13).

TABLA 13. Géneros amibianos aislados en 4 muestreos, arreglados por número de aislamiento.

Género	No. de aislados
<i>Hartmannella</i> sp.	26
<i>Naegleria</i> sp.	20
<i>Echinamoeba</i> sp.	10
<i>Willaertia</i> sp.	6
<i>Valikampfia</i> sp.	7
<i>Acanthamoeba</i> sp.	6
No identificadas	3

Si bien el número de aislamientos de *Acanthamoeba* fue bajo (8%) este género fue identificado en los muestreos I, III y IV a temperaturas de incubación de 42 y 45 °C, aunque la mayoría de las especies de *Acanthamoeba* crecen óptimamente a temperaturas cercanas a los 25 °C (Robinson, 1992).

2. EVALUACIÓN CUANTITATIVA DE AVL

Cuando se comparan los valores de NMP en muestras del agua de los muestreos III y IV (Tabla 14), se observa que los cuerpos de agua con mayor cantidad de AVL fueron Taninul y El Bañito, seguidos por Tambaque y Tancanhuitz. Para estos sistemas recreacionales, el número de organismos encontrados fue menor en el mes de diciembre y casi se duplicó para el mes de marzo (datos no mostrados).

TABLA 14. Evaluación cuantitativa de trofozoítos de AVL en muestras de agua durante los muestreos III y IV.

Sistema recreacional	NMP/100 ml	Límites de confiabilidad del 95 %	
		Inferior	Superior
Muestreo III			
Hotel Valles	7	1	23
Tambaque	28	10	150
Tancanhuitz	21	4	47
Taninul	43	7	210
IMSS	<3	-	-
El Bañito	39	7	130
Xilitla	9	1	36
Gogorrón	3	<0.5	13
Muestreo IV			
Hotel Valles	11	3	36
Tambaque	39	7	130
Tancanhuitz	23	4	120
Taninul	120	30	380
IMSS	< 3	-	-
El Bañito	64	15	380
Xilitla	11	3	36
Gogorrón	9	1	36

Estos resultados sugieren que hay un claro riesgo de contacto para los bañistas al exponerse a ser infectados con enfermedades como la queratitis amibiana, otitis, EAG y aún MEAP. Sin embargo, estos valores están muy por debajo de lo registrado en sistemas recreacionales artificiales de otros países. En piscinas de Bélgica bajo techo y calentadas artificialmente a 37 °C se han estimado valores de 2-1000 NMP/100 ml (De Jonckheere y Van der Voorde, 1977; De Jonckheere, 1979c) en tanto que en piscinas de Checoslovaquia se reportaron

valores de 10-1000 NMP/100 ml (Cerva *et al.*, 1972). Lamentablemente no existen referencias acerca del número de organismos que deben estar presentes en el ambiente para producir infecciones, tampoco existe una norma que estipule cual es el número máximo permisible de AVL en cuerpos de agua. Sin embargo, en este estudio se probaron las técnicas para estimar el número de amibas presentes en los diversos cuerpos de agua, para tratar de establecer una posible relación entre la abundancia de amibas potencialmente patógenas y los diversos parámetros ambientales.

Los resultados del análisis cuantitativo de muestras de sedimentos de los sistemas recreacionales de Tambaque, Tancanhuitz y Taninul se muestran en la Tabla 15. La mayor densidad de AVL se encontró en los sedimentos del sistema recreacional de Taninul con 75 trofozoitos/g en muestras obtenidas en el muestreo III, seguida por el sistema recreacional natural de Tambaque con 43 trofozoitos/g y el artificial de Xilitla que tuvo el valor más bajo en este mes con solo 15 trofozoitos/g.

En el muestreo IV correspondiente al mes de marzo (Tabla 15), se repitió el mismo patrón, resultando el sistema recreacional de Taninul con el valor de NMP más alto (120 trofozoitos/g) y Xilitla con el NMP más bajo (39 trofozoitos/g).

Al igual que en las muestras de agua, los valores de NMP del muestreo III, son más bajos que los del muestreo IV. El número de organismos es algunas veces más del doble que su contraparte del mes de diciembre lo que sugiere que las poblaciones de AVL presentan variaciones estacionales.

TABLA 15. Evaluación cuantitativa de trofozoitos en los sedimentos de los cuerpos de agua en los muestreos III y IV.

Sistema recreacional	NMP/g de sedimento	Límites de confiabilidad del 95 %	
		Inferior	Superior
Muestreo III			
Tambaque	43	7	210
Tancanhuitz	28	10	150
Taninul	75	14	230
Xilitla	15	3	44
Muestreo IV			
Tambaque	93	15	380
Tancanhuitz	64	15	380
Taninul	120	30	380
Xilitla	39	7	130

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS AISLADOS POR ISOENZIMAS

Se realizaron pruebas de isoenzimas sobre extractos crudos del total de los 81 aislados de AVL, previamente identificados por criterios morfológicos. Para el género *Naegleria* se corrieron pruebas para leucin aminopeptidasa (LAP), malato deshidrogenasa (MDH), fosfatasa ácida (FA) y propionil esterasa (PE). Para el género *Hartmannella* se corrieron pruebas para LAP, PE, FA, glucosa fosfato isomerasa (GFI) y fosfoglucomutasa (FGM). Para el género *Acanthamoeba* se probaron las enzimas MDH, FA, PE y alcohol deshidrogenasa (AlcDH).

Debido al volumen de pruebas, las figuras de los zimogramas completos se muestran en el Anexo 4 (Figuras A5-26).

Isoenzimas del género *Naegleria*

Se corrieron pruebas para LAP, MDH, FA y PE en geles de agarosa, pH 3-10. Se probaron 20 aislados previamente identificados como *Naegleria*, por criterios morfológicos. Los aislados fueron: IB3(b), IB3(c), IB4'(a), IB4'(b), ICh2(b), ITn4, ITn10, ITq1, ITz1(a), IIB2', IIB2(a), IITn4', IIG5, IITn3, IITq1, IITz1, I-V4, IVB4, IVTn3, IVTq1 y IVTz2. Como patrón de referencia se utilizaron las cepas del Catálogo del ATCC que fueron: *N. gruberi* (1518/1e), *N. lovaniensis* (Aq/9/1/45/D), *N. fowleri* (KUL), *N. australiensis* (PP-397) y *N. australiensis italica* (AB-T-F3).

Los resultados de los zimogramas para LAP (Anexo 4) permitieron una clara identificación de *Naegleria lovaniensis* (aislados IB3(b) e IB3(c) del sistema recreacional "El Bañito" y el aislado ITq1 de Tancanhuitz (Figs. A5 y A6). Los aislados del "Bañito" IIB2', IIB2a e IVB4, y los aislados de "Taninul" Ch2(b) e IITn4' fueron identificados por su patrón de bandeado como *N. fowleri*, aunque existe una pequeña diferencia en el aislado Ch2(b), por la presencia de una banda extra en la base del zimograma. El aislado de "Taninul" ITn10 muestra una clara similitud con las dos bandas la cepa PP397 correspondiente a *N. australiensis* (cepa). Finalmente, los aislados: IITq1, IITz1, IVTz2, IVTq1, IB4'(a), IB4'(b), ITn4, ITz1(a), I-V4, IITn3, IIG5 y IVTn3, muestran la banda única característica de *N. gruberi* (Figs. A5 y A6).

Los zimogramas para MDH muestran dos a tres bandas lo que permite hacer una identificación clara de la mayoría de los aislados. El aislado ITq1 tiene el mismo patrón de bandeado que *N. lovaniensis* (Figs. A7 y A8). Los aislados ICh2(b), IIB2', IITn4', IIB2a e IVB4 corresponden por su patrón de bandeado con *N. fowleri*, mientras que el aislado ITn10 claramente pertenece a la especie *N. australiensis*. (Figs. A7 y A8).

Los zimogramas para la FA y PE se probaron para los aislados IB3(b), IB3(c) e ITq1 y guardan una estrecha relación con la cepa *N. lovaniensis*, para ambas enzimas. De igual manera los aislados ICh2(b), IIB2', IITn4', IIB2a e IVB4 dan un patrón semejante con el generado por la cepa de *N. fowleri* de

catálogo. El aislado ITn10 muestra una sola banda que se asocia con aquella de *N. australiensis* también del catálogo del ATCC (Figs. A9, A10, A11 y A12).

Isoenzimas del género *Hartmannella*.

Para el análisis por isoenzimas de los aislados identificados como pertenecientes al género *Hartmannella*, se contrastaron las cepas de *Hartmannella vermiformis* del catálogo del CCAP con los aislados de la Huasteca Potosina IB4(b), IB4(d), IB4(e), ITn6(b), ITn7, IIITn2a, IIIB1a, IIIX1, IIIV1, IIIG1, IIVTn1, IVB2, IVTz1, IVX1, IV-V1, IVG1, IB4'(c), I-V2, I-V5, IIB3(a), IIB4'(b), II Tn2', IITz2' y IIX2'.

Para la identificación de *Hartmannella* se corrieron pruebas para las enzimas propionil esterasa (PE), fosfatasa ácida (FA), glucosa fosfato isomerasa (GFI), fosfoglucomutasa (FGM) y leucin aminopeptidasa (LAP). Los corrimientos se hicieron en el ámbito de pH 3-10.

Los zimogramas mostraron que los aislados IB4(b), IB4(d), IB4(e), ITn6(b), ITn7, IIITn2a, IIIB1a, IIIX1, IIIV1, IIIG1, IIVTn1, IVB2, IVTz1, IVX1, IV-V1 y IVG1 pertenecen a la misma especie, muy relacionada a la cepa de referencia del catálogo CCAP para *Hartmannella vermiformis* 7/A; sin embargo, presentan ligeras diferencias tales como la pérdida de una banda muy delgada en el zimograma de propionil esterasa por parte de los aislados de la Huasteca, y la presencia de bandas situadas un poco por debajo de las originales de catálogo en la enzima glucosa fosfato isomerasa.

Para los aislados ITn6b, ITn7, I-V2, I-V5, IITn2' y IITz2' los zimogramas mostraron una mayoría de bandas que coinciden con aquellas de las cepas de *Hartmannella vermiformis* 7/B de catálogo, salvo pequeñas diferencias los patrones son iguales. Sin embargo, para el aislado IIX2' el patrón mostrado en las enzimas es el mismo que para la cepa *Hartmannella vermiformis* 7/B del catálogo del CCAP (Figs. A13, A14, A15, A16, A17, A18, A19, A20, A21 y A22).

Isoenzimas del género *Acanthamoeba*.

Los seis aislados de amibas identificados por microscopía de contraste de fases como amibas del género *Acanthamoeba* (IB4(c), IG7', IIIG2, IIIB3e, IVB5 y IV-V2) fueron comparados contra las cepas de referencia de *Acanthamoeba* de la colección del laboratorio del Proyecto CyMA, para las enzimas FA, PE, MDH y AlcDH.

Los aislados IIIB3e, IVB5 y IV-V2 mostraron un patrón de corrimiento que corresponde al de la cepa *A. polyphaga* de referencia (Figs. A23, A24, A25 y A26). El análisis microscópico previo de estos organismos había sugerido esta posibilidad dado que la estructura de los quistes y trofozoitos de los aislados correspondían exactamente a la descripción dada para esta especie. Los zimogramas de estos aislados para las enzimas probadas fueron semejantes, y sólo se observó una pequeña diferencia en el grosor de algunas bandas entre los aislados y la cepa de referencia de *A. polyphaga*, lo cual indica un nivel de

concentración para esa proteína específica mayor o menor, pero su posición alélica es la misma y ello nos permite según el criterio establecido relacionar el género por la semejanza en la posición de las bandas en un zimograma.

Por lo que respecta a los aislados IG7', IIG2 y IB4(c), cuando fueron contrastados por isoelectroenfoque (IEF) contra las cepas de *Acanthamoeba* del cepario de referencia, para las enzimas FA, PE, MDH y AlcDH, se demostró una correlación con las cepas de *A. lenticulata*, *A. quina* y *A. hatchetti*, respectivamente.

El análisis de isoenzimas para precisar la posición taxonómica de las amibas de vida comparadas con cepas de referencia es una herramienta importante para los microbiólogos dedicados a este campo, sin embargo, la técnica es muy costosa y por ello en este trabajo sólo se realizó el análisis para determinar aquellas especies de los géneros *Naegleria*, *Hartmanniella* y *Acanthamoeba*. Para todos los demás géneros, el análisis para determinar la especie fue el rutinario método de laboratorio (microscopía, transformación ameboflagelar, morfometría, etc.) utilizando las claves taxonómicas de Page (1988).

Las Tablas 16, 17, 18 y 19 resumen los resultados de la identificación taxonómica final de los aislados amibianos, basados tanto en criterios morfológicos y de isoenzimas como en pruebas de flagelación de los 81 aislados amibianos obtenidos originalmente en el estudio, se redujeron a 74 aislados después de haber aplicado el análisis de isoenzimas y en la Tabla 20 se muestra el número de géneros y especies identificadas en el estudio a lo largo de cuatro muestreos, con un total de 6 géneros y 20 especies de amibas de vida libre. Los cuales son descritos y ubicados taxonómicamente en el Anexo 1.

TABLA 16. Identificación de los aislados amibianos del muestreo 1.

Sistema recreacional	Clave del Aislado ^a	Diagnóstico del aislado	Flagelación
El Bañito	IB 3(b)	<i>Naegleria lovaniensis</i>	+
	IB 3(c)	<i>Naegleria lovaniensis</i>	+
	IB 4(b)	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IB 4(c)	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>	-
	IB 4(d)	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IB 4(e)	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IB 4'(a)	<i>Naegleria gruberi</i>	+
	IB 4'(b)	<i>Naegleria gruberi</i>	+
	IB 4'(c)	<i>Hartmannella vermiformis</i>	+
E. Taninul Gogorrón	IB 4'(d)	<i>Willarta sp.</i>	-
	ICH 2(b)	<i>Naegleria fowleri</i>	+
	IG 2'	<i>Echinamoeba sp.</i>	-
	IG 4'	No identificada	-
Taninul	IG 7'	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>	-
	IG 9'	<i>Echinamoeba exundans</i>	-
	ITn 4	<i>Hartmannella vermiformis</i>	+
	ITn 6(b)	<i>Hartmannella vermiformis</i>	+
	ITn 6(c)	<i>Echinamoeba silvestris</i>	-
	ITn 7	<i>Hartmannella vermiformis</i>	+
	ITn 9(a)	<i>Willarta magna</i>	+
	ITn 9(b)	<i>Willarta magna</i>	+
	ITn 10	<i>Naegleria australiensis</i>	+
	ITn 11	<i>Echinamoeba silvestris</i>	-
	ITn 9'(c)	<i>Willarta sp.</i>	+
Tambaque Tancanhuitz	ITn 9'(d)	<i>Willarta sp.</i>	+
	ITn 9'(e)	<i>Willarta sp.</i>	+
	ITz 1	<i>Naegleria lovaniensis</i>	+
	ITz 1(a)	<i>Naegleria gruberi</i>	+
	ITz 3	No identificada	-
	ITz 4	<i>Valilkampfia sp.</i>	-
	ITz 5	No identificada	-
H. Valles	ITz 6	<i>Valilkampfia sp.</i>	-
	I-V2	<i>Hartmannella sp.</i>	-
	I-V4	<i>Naegleria gruberi</i>	+
	I-V5	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-

^a Las claves se dan según el formato descrito al inicio de la Sección VI.1.

sp. Indica que el aislado no pudo ser identificado hasta el nivel de especie

IB3(b), IB3(c) fueron considerados como clones de *Naegleria lovaniensis*

IB4'(a) y IB4'(b) fueron considerados como clones de *Naegleria gruberi*

IB4(b), IB4(d) y IB4(e) fueron considerados como clones de *Hartmannella vermiformis*

ITn9(a) y ITn9(b) fueron considerados como clones de *Willarta magna*

ITn9'(c), ITn9'(d) y ITn9'(e) fueron considerados como clones de *Willarta sp.*

TABLA 17. Identificación de los aislados amibianos del muestreo II.

Sistema recreacional	Clave del Aislado¹	Diagnóstico del aislado	Flagelación
El Bañito	II B2'	<i>Naegleria fowleri</i>	+
	II B3(a)	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	II B4'(b)	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
Gogorrón	II G2'	<i>Echinamoeba exundans</i>	-
	II G3'	<i>Echinamoeba</i> sp.	-
Taninul	II Tn1'	<i>Echinamoeba</i> sp.	-
	II Tn2	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	II Tn2'	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	II Tn2' (b)	<i>Willacertia</i> sp.	+
Tambaque	II Tn4'	<i>Naegleria fowleri</i>	+
	II Tq 2'	<i>Vahlkampfsia</i> sp.	-
Tancanhuitz	II Tz 2'	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
Xilitla	II X2'	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-

¹ Las claves se dan según el formato descrito al inicio de la Sección VII.1.
sp. Indica que el aislado no pudo ser identificado hasta el nivel de especie

TABLA 18. Identificación de los aislados amibianos del muestreo III.

Sistema recreacional	Clave del Aislado¹	Diagnóstico del aislado	Flagelación
El Bañito	IIIB1a	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IIIB2a	<i>Naegleria fowleri</i>	+
	IIIB3e	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	-
Gogorrón	IIIG1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IIIG3	<i>Echinamoeba exundans</i>	-
	IIIG2	<i>Acanthamoeba quina</i>	-
	IIIG5	<i>Naegleria gruberi</i>	+
Taninul	IIITn2a	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IIITn3	<i>Naegleria gruberi</i>	+
	IIITn5	<i>Vahlkampfsia inornata</i>	-
	IIITn6	<i>Willacertia magna</i>	+
Tambaque	IIITq1	<i>Naegleria gruberi</i>	-
Tancanhuitz	IIITz1	<i>Naegleria gruberi</i>	+
	IIITz3	<i>Vahlkampfsia inornata</i>	+
H. Valles	IIIV1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IIIX1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-

¹ Las claves se dan según el formato descrito al inicio de la Sección VII.1

TABLA 19. Identificación de los aislados amibianos del muestreo IV.

Sistema recreacional	Clave del Aislado ¹	Diagnóstico del aislado	Flagelación
El Bañito	IVB2	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IVB4	<i>Naegleria fowleri</i>	+
	IVB5	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	-
Gogorrón	IVG1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IVG3	<i>Echinamoeba exudans</i>	-
Taninul	IVTn1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IVTn3	<i>Naegleria gruberi</i>	+
	IVTn4	<i>Vahlkampfia inornata</i>	-
	IVTn5	<i>Echinamoeba exudans</i>	-
	IVTn7	<i>Willaertia magna</i>	+
Tambaque	IVTq1	<i>Naegleria gruberi</i>	+
Tancanhuitz	IVTz1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IVTz2	<i>Naegleria gruberi</i>	+
	IVTz3	<i>Vahlkampfia inornata</i>	-
H. Valles	IV-V1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-
	IV-V2	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	-
Xilitla	IVX1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	-

¹ Las claves se dan según el formato descrito al inicio de la Sección VII.1

TABLA 20. Géneros y especies de AVL termófilas aisladas.

<i>Naegleria australiensis</i>	<i>Hartmannella vermiformis</i>	<i>Acanthamoeba hatchetti</i>
<i>Naegleria fowleri</i>	<i>Hartmannella</i> sp.	<i>Acanthamoeba lenticulata</i>
<i>Naegleria gruberi</i>		<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
<i>Naegleria lovaniensis</i>		<i>Acanthamoeba quina</i>
<i>Willaertia magna</i>	<i>Echinamoeba exudans</i>	<i>Vahlkampfia inornata</i>
<i>Willaertia</i> sp.	<i>Echinamoeba silvestris</i>	<i>Vahlkampfia</i> sp.
	<i>Echinamoeba</i> sp.	
No identificadas (3)	TOTAL 6 géneros y 20 especies	

4. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD EN ANIMALES DE LABORATORIO

De los 74 aislados de AVL resultaron patógenos 23 (31%) por instilación nasal e intracerebral (Tabla 21), es decir que el 69% de los aislados de AVL resultaron ser no patógenos.

TABLA 21. Aislados de amibas patógenas en ensayos con ratones de laboratorio¹.

Clave del Aislado	Especie de AVL	Mortalidad (%)		Trofozoitos recuperados de órganos ²
		IN (N=5)	IC (N=5)	
ICh 2(b)	<i>Naegleria fowleri</i>	100	100	-
II B2'	<i>Naegleria fowleri</i>	0	100	C
II Tn4'	<i>Naegleria fowleri</i>	100	100	C y P
IIIB2a	<i>Naegleria fowleri</i>	100	100	C y P
IVB4	<i>Naegleria fowleri</i>	100	100	C
ITn 10	<i>Naegleria australiensis</i>	0	60	-
I-V4	<i>Naegleria sp.</i>	0	80	-
IIIX1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	80	C
IIIV1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	60	C
IVTz1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	60	C
IIIB1a	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	80	C
IV-V1	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	60	C
ITn4	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	100	-
II B4' (b)	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	60	C
II Tn2'	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	100	C
II Tz 2'	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	100	C
II X2'	<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	60	C
IIIB3(e)	<i>Acanthamoeba polyplaga</i>	0	80	C
IVB5	<i>Acanthamoeba polyplaga</i>	0	80	C
IV-V2	<i>Acanthamoeba polyplaga</i>	0	60	C
IIIG2	<i>Acanthamoeba quina</i>	0	80	C
IG2'	<i>Echinamoeba sp.</i>	0	80	C
II Tq2'	<i>Vahlkampffia sp.</i>	0	100	C

¹ Sólo se incluyen los aislados que ocasionaron una mortalidad igual o mayor al 60% (Wong *et al.*, 1977).

² Abreviaturas: IN, instilación nasal; IC, inoculación intracerebral, C, cerebro; P, pulmón.

N=5, lote de 5 ratones inoculados. Se corrieron lotes control de ratones inoculados por las dos vías con agua estéril. (-) No hubo recuperación

Los órganos de los ratones que murieron o que fueron sacrificados a los 21 días de inoculación, se recuperaron y se cortaron en trozos de alrededor de 1 cm³ que fueron sembrados en placas de NNE para recuperar los trofozoitos y confirmar la invasión de algunos órganos considerados blanco.

La inoculación intracerebral y la instilación nasal introducen los trofozoitos directamente en cerebro y pulmón que son órganos que mantienen concentraciones altas de oxígeno. Los trofozoitos tienden a diseminarse por tejidos muy vascularizados y con un suministro importante de oxígeno. En general, la inoculación intracerebral causó la muerte de los ratones más rápidamente (en seis días como máximo), mientras que por instilación nasal la muerte ocurrió hasta los 21 días (Fig. 4).

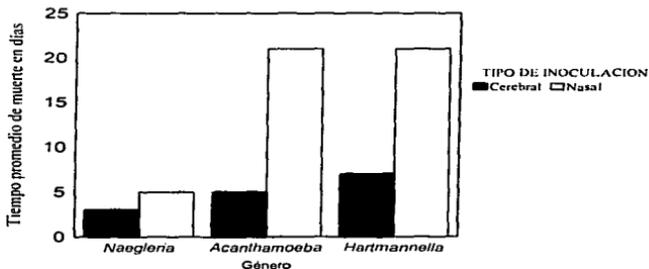


Figura 4. Tiempos requeridos para que después de la inoculación cerebral y nasal murieran ratones

Se intentó recuperar los trofozoitos de todos los órganos blancos aunque sólo se recuperaron de cerebro y pulmón. Es posible que la velocidad con que las amibas destruyen el tejido determina si son recuperadas o no. En el cerebro, los trofozoitos invasores provocan una severa necrosis que mata rápidamente al ratón. La rapidez con la que se produce la invasión del cerebro no siempre permite que las amibas alcancen otros órganos como hígado y riñón, puesto que el ratón muere.

Los resultados de las pruebas de patogenidad por muestreo, por sistema recreacional y por especie de amiba se muestran en las Tablas 22, 23 y 24, respectivamente.

TABLA 22. Frecuencia de aislamientos de las amibas patógenas durante los 4 muestreos.

Muestreo	Aislados patógenos	Aislados no patógenos
I	5	23
II	7	6
III	6	10
IV	5	12
Total	23	51
Porcentaje	31 %	69 %

TABLA 23. Número de aislados patógenos encontrados por sistema recreacional en 4 muestreos.

Cuerpo de agua	Sistema recreacional	Aislados patógenos
Artificial	El Bañito	7
	Taninul	4
	H. Valles	3
	Gogorrón	2
	Xilitla	2
Natural	E. Taninul	2
	Tancanhuitz	2
	Tambaque	1
Total		23

Las pruebas de patogenicidad fueron positivas para siete aislados del género *Naegleria* incluyendo a las especies *N. fowleri* y *N. australiensis*, diez aislados de *Hartmannella*, cuatro aislados de *Acanthamoeba* (donde se incluyeron *A. polyphaga* y *A. quinana*), una *Echinamoeba* y un aislado de *Vahlkampfia* (Tabla 24).

El aislado catalogado como *N. lovaniensis* resultó inocuo en pruebas de patogenicidad con ratones. Esto concuerda con lo reportado en la literatura (Rondanelli, 1987). *Naegleria lovaniensis* parece ser una especie definitivamente no patógena aunque se ha reportado su presencia en un infante con malformaciones cerebrales congénitas (Rivera *et. al.*, 1989a).

TABLA 24. Especies patógenas encontradas en los 4 muestreos.

Especie de AVL	Número de aislados
<i>Naegleria fowleri</i>	5
<i>Naegleria australiensis</i>	2
<i>Hartmannella vermiformis</i>	5
<i>Hartmannella</i> sp.	5
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	3
<i>Acanthamoeba</i> sp.	1
<i>Echinamoeba</i> sp.	1
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1
Total	23

Muchos de los mecanismos de patogenicidad de estas amibas no son bien entendidos. Se han descrito pocos casos de infecciones por otras AVL diferentes de *N. fowleri* y *Acanthamoeba*. En el presente estudio la presencia de *Naegleria fowleri* en algunos sistemas recreacionales de la Huasteca y del Altiplano Potosino, documenta el riesgo a que se exponen los bañistas que visitan estos lugares (Kilvington *et al.*, 1991b). También se debe poner atención que, aunque no hay muchos casos de hartmanelosis causada por amibas del género *Hartmannella*, éstas fueron encontradas en gran número y con un alto índice de representantes patógenos. Un hecho importante fue el de haber encontrado organismos patógenos del género *Acanthamoeba*, del cual también existe una abundante documentación de casos de encefalitis amibiana granulomatosa y de queratitis. Esto nos permite afirmar que es deseable que en cuerpos de agua de uso recreativo no estén presentes organismos de este tipo.

Por otra parte, en los resultados de las Tablas 23 y 24 muestran que en ocho de los diez lugares muestreados se encontraron organismos de distintos géneros, entre ellos las AVL. Como en análisis anteriores, los sistemas recreacionales mencionados recurrentemente tienen la mayor concentración de organismos amibianos y los de mayor potencialidad patógena.

El análisis de patogenicidad permite establecer que aislados son virulentos y de esta manera podremos tener un mayor cuidado en el aislamiento futuro de estas amibas en los lugares donde originalmente fueron aisladas para cuidar y en su caso prevenir la posible infección en seres humanos.

5. RELACIÓN DE LAS AMIBAS CON LOS FACTORES AMBIENTALES

Con el objeto de determinar las condiciones ambientales en las que se desarrollan las AVL se evaluaron algunos factores fisicoquímicos en los sitios de muestreo (ver Sección VI.4. a,b). Los registros de la temperatura del agua y aire, pH, oxígeno disuelto, conductividad, cloro libre, carbono orgánico total y sólidos (suspendidos, sedimentables y totales) representan un volumen considerable de datos que se presentan en la Tabla A2 en el Anexo 2. Los sitios de muestreo se describen en la Sección V.

a. Determinaciones en el campo

Temperatura del agua

Uno de los factores que tiene un efecto directo en la supervivencia y abundancia de las AVL en el ambiente, es la temperatura del agua. Algunos géneros como *Naegleria* y *Acanthamoeba* con representantes patógenos para el hombre, pueden tolerar e incluso se desarrollan más rápidamente por disminución de competencia con otros organismos no termotolerantes en agua con temperatura elevada (Rivera *et al.*, 1983).

En el Estado de San Luis Potosí la mayoría de los acuíferos con aguas termales son aprovechados con fines turísticos por lo que aquellos que presentan condiciones ideales de terreno y suministro abundante de este tipo de agua han sido entubados y el agua ha sido confinada en piscinas. Tal es el caso de El Bañito, Taninul, Hotel Valles y Gogorrón, sistemas recreacionales artificiales todos ellos de agua termal. Los sistemas recreacionales no termales fueron la Piscina del IMSS, del Club Campestre y las pozas de Xilitla las cuales presentaron temperaturas del agua promedio de 18, 29 y 32 °C respectivamente (Tabla 25 y Fig. 5).

De la información contenida en la Tabla A2 se destaca que los sistemas recreacionales de Gogorrón, Taninul, El Bañito y el Hotel Valles mantienen temperaturas casi constantes con solo 3 °C de variación en los distintos muestreos.

En la Figura 5 se describe el comportamiento de la temperatura del agua a lo largo de 4 muestreos, en ella se puede observar que los sistemas recreacionales artificiales de Gogorrón, Taninul y El Bañito, junto con el Hotel Valles, alimentan naturalmente sus piscinas con agua termal entre los 31 y los 40.7 °C, a excepción de Xilitla que la temperatura del agua promedio fue de 18 °C. Para los sistemas recreacionales naturales de Tambaque y Tancanhuitz además de Xilitla (sistema recreacional artificial) cuyo aporte de agua es de ríos principalmente, la temperatura fue la más baja entre 17.3 y 18.4 °C. Se observa en la Fig. 5, una gran diferencia entre el valor mínimo encontrado en Xilitla (17.3 °C) en diciembre de

1995 y el valor máximo del agua del sistema recreacional de Gogorrón (40.7) °C en marzo de 1996.

En la Figura 5 también se observa que para los cuatro muestreos hubo un comportamiento estable con respecto al parámetro de temperatura del agua, no presentándose cambios drásticos. Esta observación se aplica individualmente para cada sistema recreacional, es decir, aunque hay una separación marcada en las temperaturas del agua de los diferentes sistemas recreacionales, que va de los 17 a los 40 °C.

Temperatura ambiental

Además de la temperatura del agua, la temperatura ambiental es un factor que debe considerarse cuando se buscan AVL en ambientes naturales. La importancia de la temperatura en el ambiente, se acentúa como ya se explicó anteriormente porque las amibas patógenas tienden a crear un sistema de competencia capaz de desplazar a otras amibas que no son patógenas cuando el ambiente es más cálido en una relación directamente proporcional.

En la Figura 6 se representan las temperaturas del ambiente registrada en los cuatro muestreos, ahí se observa que el valor mínimo fue para Xilitla con 17 °C en el muestreo III y la mayor temperatura fue de 35.2 °C para la piscina del IMSS ubicada en Cd. Valles en el muestreo I, la baja temperatura del ambiente de Xilitla se explica por su ubicación a gran altitud en la sierra del mismo nombre. Los valores para los otros sitios de muestreo fluctuaron como también puede observarse en la Fig. 6 entre los 20 y los 30 °C, aunque también se puede ver en esta Figura que en el muestreo IV se presentaron las temperaturas ambientales más elevadas, y en el muestreo III, los valores de temperatura más bajos.

Fue notorio presenciar a lo largo del recorrido por los sistemas recreacionales a varios jóvenes sumergiéndose al nadar en estos cuerpos de agua. Esta actividad es frecuente debido a las altas temperaturas que se alcanzan durante el día.

Existen numerosos reportes en donde se menciona que en las épocas más calurosas del año hay un aumento en los casos de meningitis debidas a AVL (Callicot *et al.*, 1968; John, 1993; Lares-Villa *et al.*, 1993; Ockert, 1993; Griesemer *et al.*, 1994), también se señala la relación directa que existe entre la posible presencia de AVL con potencial patógeno y la temperatura elevada del agua (Cain *et al.*, 1981; Kilvington *et al.*, 1991 a, b; Schoeman *et al.*, 1993).

Oxígeno disuelto

Las AVL, a diferencia de *Entamoeba* son aerobias estrictas, por esta razón requieren oxígeno para su sobrevivencia. Sin embargo, cuando las condiciones se vuelven anaerobias, las formas tróficas y flageladas de las AVL sufren un cambio hacia la formación de quiste como protección natural contra las condiciones adversas del ambiente. Por ello la medida de la concentración de

oxígeno disuelto (O D) en el agua nos puede indicar la fase en la que se pueden encontrar estas amibas (John, 1993).

La concentración de oxígeno disuelto se encontró en un ámbito muy amplio para los cuatro muestreos, desde los 0.7 mg/l de O D hasta los 5.0 mg/l, la menor concentración se encontró en el sistema recreacional de Taninul en el muestreo I con 0.7 mg/l de O D, estos valores de O D nos indican que este parámetro no fue un factor crítico para que delimitara la ausencia o presencia de AVL en el agua (Tablas 25 y A2; Fig. 7).

Los sistemas recreacionales artificiales de Taninul, El Bañito, Gogorrón, la piscina del IMSS y Xilitla tuvieron las concentraciones de O D más bajas durante todos los muestreos con concentraciones de O D de 0.7 a 2.3 mg/l, mientras que los sistemas recreacionales naturales de Tambaque y Tancanhuitz presentaron los valores más altos, en el ámbito de 3.5 a 5.0 mg/l de O D (Fig. 7). Estos datos indican que aquellos cuerpos de agua con temperaturas elevadas (lo que favorece la pérdida de oxígeno disuelto en la misma) tienen valores de O D bajos, mientras que los de agua fría, son capaces de mantener una concentración más alta de oxígeno disuelto, es decir, de estas mediciones se pueden apreciar algunas fluctuaciones que son inversamente proporcionales entre la temperatura del agua y su concentración de oxígeno disuelto.

pH

El ámbito de pH tolerado por las AVL potencialmente patógenas *in vitro* fluctúa de 4.6 a 9.5 (Kyle y Pittman, 1985). Los resultados en las Tablas 25 y A2 indican que las AVL aisladas de los cuerpos de aguas no estuvieron sometidas a cambios de pH amplios por lo que este parámetro no fue un factor limitante que influyera en la presencia o ausencia de estos organismos.

Los valores de pH encontrados fueron de un mínimo de 5.7 y un máximo de 8.2. El pH de 5.7 fue para las piscinas del Hotel Valles y pudo deberse a los químicos utilizados para desinfectar el agua, este valor no se encontró en muestreos posteriores en ningún cuerpo de agua. La Figura 8 muestra un ámbito de pH muy estrecho en el cual hay cambios en el agua para todos los sitios de muestreo. Las variaciones de menos de 1 unidad de pH en los muestreos II y III podrían haberse debido a la concentración que ocurrieron en los cuerpos de agua en la época de sequía y los valores más bajos pudieron deberse al poder de dilución del agua en la época de lluvia.

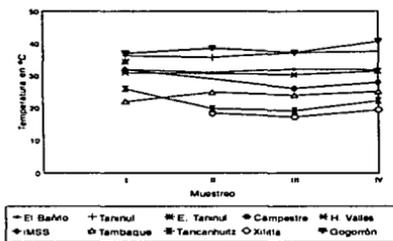


Figura 5. Temperatura del agua

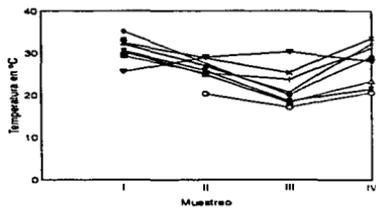


Figura 6. Temperatura ambiental

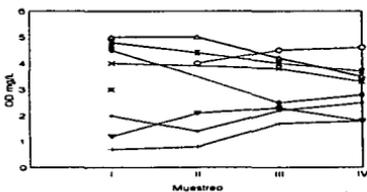


Figura 7. Oxígeno disuelto

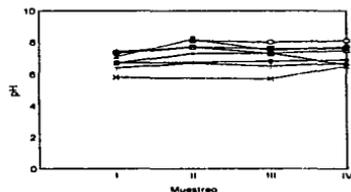


Figura 8. pH

Determinaciones de la temperatura del agua, ambiental, oxígeno disuelto y pH durante los 4 muestreos (I: sep. '93; II: mar. '94; III: dic. '95; IV: mar. '96).

Cloro libre

El factor más inhibitorio para todas las AVL es el cloro como desinfectante, el cual fue detectado solo en la piscina del IMSS (sistemas recreacional artificial) de la cual no se efectuó ningún aislamiento de AVL (Tablas 25 y A2). En los demás centros recreativos con piscinas el cloro solo se usa ocasionalmente o como en el caso de Gogorrón en cantidades insuficientes alcanzando un valor mínimo de 0.2 mg/l de cloro libre, aunque otros como El Bañito, Taninul y Xilitla no lo utilizan, la explicación dada por la mayoría de los administradores de estos centros es de que no es costoso agregar desinfectantes a las piscinas porque el agua está fluyendo continuamente y la dilución es tan grande que no se puede mantener una concentración constante a lo largo de un día, además, la materia orgánica introducida al agua inactivaría parcial o totalmente el efecto amebicida del cloro activo en muy poco tiempo, aunque la mayoría de los administradores de estos centros de recreo artificiales mencionaron que sus piscinas son lavadas mensualmente.

Conductividad

Los datos de conductividad medidos en todos los sistemas recreacionales naturales y artificiales se encontraron dentro del ámbito de los valores óptimos promedio para aguas naturales en condiciones normales (Greenberg *et al.*, 1988).

Los valores de los factores ambientales analizados, incluyendo la temperatura del agua y del ambiente, el oxígeno disuelto, valores de pH y la falta de cloración de los sistemas recreacionales muestreados, favorecen el desarrollo sin inhibiciones de los protozoos que nos ocupan en este estudio.

b. Determinaciones de laboratorio

Con los antecedentes de los muestreos I y II se realizaron dos muestreos más en donde se midieran aquellos parámetros relacionados con la materia orgánica presente en los cuerpos de agua. Los análisis seleccionados fueron carbono orgánico total (COT), sólidos suspendidos (SS), sólidos disueltos (SD) y sólidos totales (ST). Estos parámetros fueron medidos solo en los muestreos III y IV (Tablas 25 y A2).

Carbono orgánico total (COT)

El carbono orgánico total permite la estimación de la demanda de oxígeno debida a los compuestos orgánicos fijos, volátiles, naturales o sintéticos presentes en las aguas superficiales, residuales industriales y domésticas. El principio se basa en la oxidación a 950 °C de la materia carbonosa a bióxido de carbono.

Como antecedente se tiene en México que los valores para las aguas residuales domésticas crudas están en el ámbito de 100-400 mg/l de COT.

En las Tablas 25 y A2 se muestran los resultados de COT del agua de los sistemas recreacionales muestreados en el Estado de San Luis Potosí, en los dos muestreos la concentración máxima fue de 36 mg/l de COT y la mínima fue de 6 mg/l de COT. Considerando el ámbito de concentración de COT para aguas residuales de 100 y 400 mg/l de COT, el agua de los sistemas recreacionales analizados tiene poco contenido de carbono orgánico, y no se considera un factor limitante favorezca la presencia o la ausencia de AVL.

Aunque existen valores de referencia de la concentración de COT en el agua, no se encuentran en la norma oficial mexicana valores permisibles de COT para cuerpos de agua recreativos de contacto primario. Comparando los valores obtenidos en los muestreos con los referidos para aguas residuales (Tabla A1) se tiene que los sistemas recreacionales muestreados contienen concentraciones de COT muy bajas. La apariencia de los sistemas recreacionales de San Luis Potosí es de agua completamente cristalina, ya que estas brotan de manantiales que se encuentran en el mismo sitio.

TABLA 25. Datos promedio de los parámetros ambientales para los 4 muestreos.

Sistemas recreacionales artificiales	pH	Temp. agua °C	Temp. amb. °C	OD mg/l	Conductividad µS	Cloro libre mg/l	COT ¹ mg/l	SS ¹ mg/l	SD ¹ mg/l	ST ¹ mg/l
El Bañito	7.0	32	30	2.0	1263	0	35	13	675	688
Taninul	6.6	37	28	0.9	1400	0	26	4	387	391
Club Campestre	7.4	32	33	4.6	1400	2	nd	nd	nd	nd
Hotel Valles	6.0	31	31	3.7	883	0	11	7	429	436
Piscina IMSS	6.8	29	28	3.3	1283	6	6	6	234	240
Gogorrón	7.6	38	28	1.8	412	0	10	2	288	290
Xilitla	8.0	18	19	4.4	317	0	14	17	1499	1516
Sistemas recreacionales naturales										
Estandue Taninul	6.7	34	29	3.0	1200	nd	nd	nd	nd	nd
Tambaque	7.5	24	24	4.4	1100	nd	33	19	1557	1576
Tancanhuitz	7.6	22	24	4.2	338	nd	17	11	1317	1328

(OD) Oxígeno disuelto; (COT) Carbono orgánico total; (SS) Sólidos suspendidos; (SD) Sólidos disueltos; (ST) Sólidos totales (ST= SS+SD); (nd) no determinado.

(¹) Solo se determinó en los muestreos III y IV.

Sólidos (suspendidos, disueltos y totales)

Los sólidos corresponden a las sustancias orgánicas e inorgánicas disueltas o suspendidas en el agua. Para aguas naturales recreativas con contacto primario como en el caso de nuestros sistemas recreacionales, la norma oficial mexicana (SEDUE, 1989) no da valores de criterios ecológicos de calidad del agua para ningún tipo de sólidos. Esta legislación solo considera fuentes de abastecimiento de agua potable y uso pecuario.

Sin embargo, los sólidos suspendidos medidos en los sistemas recreacionales y que son aquellos constituidos por sólidos sedimentables, sólidos en suspensión y sólidos coloidales cuyo tamaño de partícula no pase el filtro estándar de fibra de vidrio, dieron valores bajos (Tabla 25 y A2) por lo que este parámetro al igual que para COT, no debe tener una influencia determinante para la presencia o ausencia de AVL en estos cuerpos de agua. En este tipo de sólidos está comprendida la materia orgánica particulada.

c. Correlación entre las AVL y los parámetros ambientales

Al afirmar que la Huasteca Potosina posee las características ambientales adecuadas para la supervivencia de AVL y en especial para las especies patógenas, se aplicó un método estadístico que permitiera establecer de una manera válida las posibles relaciones entre los organismos aislados y los diferentes parámetros ambientales. Para este fin se obtuvieron los índices de correlación de Spearman (prueba estadística no paramétrica).

En este procedimiento se utilizaron dos conjuntos de datos cada vez para buscar la posible relación entre amibas patógenas, amibas no patógenas y amibas totales contra cada uno de los parámetros fisicoquímicos analizados (ver Sección VI.5).

Con respecto a los parámetros fisicoquímicos y de acuerdo a experimentos previos registrados en la literatura (Griffin, 1972; Lares-Villa, 1993; Rivera, 1993) se esperaría encontrar una correlación alta entre el número de amibas patógenas aisladas y la temperatura del agua y el ambiente, es decir, a mayor temperatura mayor número de amibas patógenas, al analizar los datos de la Tabla 26 se observó que no existió correlación entre las amibas patógenas y las amibas totales con las temperaturas del agua y del ambiente con los siguientes valores respectivamente ($r_s = 0.136$; $P = n. s.$; $r_s = 0.006$; $P = n. s.$). Estos valores estadísticos de correlación se contraponen a lo mencionado anteriormente de que las amibas patógenas pueden ser encontradas con mayor facilidad en ambientes acuáticos con temperaturas elevadas. Esta contradicción puede ser interpretada como el resultado de un posible sesgo en los datos obtenidos al manipular, por razones exigidas en la metodología, las temperaturas de aislamiento de las amibas. Sin embargo, las amibas no patógenas tuvieron una correlación directamente proporcional aunque marginalmente significativa con respecto al parámetro de la temperatura del agua ($r_s = 0.157$; $P = m. s.$), es decir, a mayor temperatura del agua se incrementa el número de amibas no patógenas. No se debe olvidar que existen otros aspectos que deben de tomarse en cuenta, como la plasticidad de los organismos acuáticos a adaptarse a un amplio ámbito de temperatura, lo cual pudo haber influenciado el valor final obtenido estadísticamente.

Con respecto al oxígeno disuelto (OD) se encontró que la única correlación (inversamente proporcional) fue con las amibas no patógenas, lo que tampoco es esperado ya que las AVL son estrictamente aerobias aunque en este caso puede ser fácil entender que la ecuación estadística para generar el coeficiente de Spearman no considera que las amibas toleran ámbitos de concentraciones de OD que van de 0.2-4 ppm además de que otros factores ambientales pueden alterar su comportamiento y la presencia de las amibas en el agua.

Los coeficientes de Spearman para COT con respecto a las amibas no patógenas y totales fueron los más altos como puede verse en la Tabla 26, esta alta correlación demuestra como las amibas requieren de una elevada concentración de nutrientes que se refleja en el análisis de COT como una medida de la materia orgánica en el agua, lo que repercute en el mantenimiento de poblaciones abundantes de organismos.

Para el cloro libre fue aparente la relación inversamente proporcional de este parámetro con las amibas no patógenas, a mayor concentración de cloro menor número de amibas. Para este parámetro se esperaría una correlación de este tipo también con las amibas patógenas y totales, pero el resultado solo pudo ser comprobado estadísticamente con las amibas no patógenas.

Para los demás parámetros fisicoquímicos no se demostró estadísticamente ninguna evidencia de relación con los organismos aislados. Pero como ya se dijo anteriormente, será necesario evaluar la relación multifactorial de los distintos parámetros ambientales sobre las poblaciones amibianas. Y tomar en cuenta que los parámetros analizados no indican necesariamente una causa efecto.

El análisis de correlación de Spearman mostró poca relación probabilística que haga depender a los organismos aislados de algunos parámetros analizados como la temperatura del agua y del ambiente con las amibas patógenas. Un factor de importancia que pudo haber incidido en el análisis de correlación, fue el bajo número de aislados encontrados a lo largo de este estudio, lo que hace pensar que no se puede tomar este análisis estadístico como un criterio definitivo para afirmar que no existe relación entre las amibas aisladas y algunos de los parámetros del medio acuático de donde fueron aisladas.

Debe recordarse que las placas de NNE inoculadas para cultivar amibas, fueron incubadas a 42 y 45 °C restringiendo el crecimiento de una gran cantidad de estos organismos, este hecho pudo producir un sesgo en los resultados y por ello no reflejar el comportamiento real de las amibas patógenas como por ejemplo con respecto a la temperatura del agua, ya que por experiencia se sabe que incluso a menores temperaturas (30 °C o menos) se pueden aislar amibas patógenas. Además existe el principio explicado anteriormente de que todas las amibas patógenas son termotolerantes, pero no todas las termotolerantes son patógenas.

TABLA 26. Coeficientes de correlación de Spearman entre número de especies de amibas y las variables ambientales.

Variable 1	Variable 2	N	r_s	P
S no pat.	Temperatura del agua	138	0.157	m.s.
	Temperatura ambiente	162	- 0.072	n. s.
	pH	139	- 0.105	n. s.
	OD	139	- 0.186	<0.05
	Conductividad	138	0.110	n. s.
	Cloro libre	116	- 0.132	n. s.
	COT	16	0.445	m. s.
	Sólidos suspendidos	16	- 0.212	n. s.
	Sólidos disueltos	16	0.226	n. s.
	Sólidos totales	16	0.214	n. s.
S pat.	Temperatura del agua	138	0.006	n. s.
	Temperatura ambiente	162	- 0.039	n. s.
	pH	139	- 0.083	n. s.
	OD	139	0.049	n. s.
	Conductividad	138	- 0.027	n. s.
	Cloro libre	116	- 0.086	n. s.
	COT	16	- 0.047	n. s.
	Sólidos suspendidos	16	0.334	n. s.
	Sólidos disueltos	16	0.125	n. s.
	Sólidos totales	16	0.141	n. s.
S tot.	Temperatura del agua	138	0.136	n. s.
	Temperatura ambiente	162	- 0.068	n. s.
	pH	139	- 0.122	n. s.
	OD	139	- 0.128	n. s.
	Conductividad	138	0.091	n. s.
	Cloro libre	116	- 0.184	<0.05
	COT	16	0.467	m. s.
	Sólidos suspendidos	16	0.058	n. s.
	Sólidos disueltos	16	0.179	n. s.
	Sólidos totales	16	0.179	n. s.

S= Riqueza específica de amibas; S pat.= Número de especies de amibas patógenas; S no pat.= Número de especies de amibas no patógenas; S tot.= Número de especies de amibas totales (S tot.= S pat. + S no pat.).

N= Número de datos.

r_s = Coeficiente de correlación de Spearman

P= Nivel de significancia

n. s.= no significativo con $P < 0.05$

m. s.= marginalmente significativo

Para validar las pruebas estadísticas de los experimentos de este tipo, en el futuro se deberán establecer criterios de muestreo más estrictos que incluyan mayor número de muestras y evitar restringir el crecimiento de las amibas al seleccionar temperaturas de aislamiento tan elevadas como lo fueron en este experimento. Sin embargo, en este estudio en particular y dado que la metodología requirió que el aislamiento de los microorganismos se hiciera en las condiciones descritas, los resultados generados por el trato estadístico de los datos, no dan mucha información sobre el comportamiento de los parámetros ambientales y la presencia/ausencia de amibas en el agua.

d. Nivel de infestación del agua

Se calculó el nivel de infestación del agua (NIA) expresado en porcentaje (Tabla 27), con las amibas patógenas aisladas (ver Sección VI.3).

Los valores del NIA se correlacionaron con los datos fisicoquímicos obtenidos de los cuatro muestreos en la Huasteca Potosina (Tabla 28).

Se encontró correlación entre el NIA y algunos de los parámetros ambientales analizados, con el análisis de Spearman y fue posible establecer una correlación inversamente proporcional con el cloro libre (Tabla 28 $r_s = -0.552$ $P < 0.05$) es decir que a mayor concentración de cloro existe una menor cantidad de amibas, lo cual es congruente con la sensibilidad de las amibas al cloro. La materia orgánica en suspensión COT tuvo una influencia sobre el NIA como lo indica el valor de correlación de $r_s = 0.493$ $P < 0.05$. Este resultado demostró nuevamente que el COT tuvo una influencia definitiva sobre la presencia de amibas en el ambiente y de manera muy clara sobre los organismos patógenos.

El valor de $r_s = -0.370$ $P < 0.05$ para el OD muestra una relación inversamente proporcional con respecto al NIA, esta correspondencia indica que a mayor concentración de OD en el agua, el número de amibas con potencial patógeno disminuye, en esto deben considerarse varios factores tales como la calidad del agua, incluyendo niveles de OD altos, lo que estimula la autopurificación de los cuerpos de agua, es decir, se puede favorecer la presencia de otros organismos depredadores que controlen a las poblaciones amibianas. Lo anterior puede explicar el comportamiento encontrado.

La correlación entre el cloro y el NIA fue muy alta y el valor negativo calculado ($r_s = -0.552$ $P < 0.05$) reflejó que a mayor concentración de cloro libre en el agua, el número de amibas patógenas fue menor. Por otra parte una correlación similar se encontró entre el NIA y el pH ($r_s = -0.528$ $P < 0.05$) lo que demuestra una relación inversamente proporcional entre los dos parámetros, esto quiere decir que mientras más alcalino es el ambiente acuático existe menor probabilidad de encontrar amibas patógenas, aunque ya se ha mencionado anteriormente que las AVL soportan ámbitos de pH muy amplios.

TABLA 27. Niveles de Infestación del Agua (Frecuencia de AVL):

Sistema recreacional/Muestreo	No. total de muestras	No. de muestras positivas con AVL patógenas	Niveles de Infestación del Agua %
El Bañito I	8	0	0.0
El Bañito II	6	2	33.3
El Bañito III	6	3	50.0
El Bañito IV	6	2	33.3
Taninul I	9	2	22.2
Taninul II	7	2	28.5
Taninul III	7	0	0.0
Taninul IV	7	0	0.0
H. Valles I	5	1	20.0
H. Valles II	-	-	-
H. Valles III	2	1	50.0
H. Valles IV	2	2	100.0
IMSS I	2	0	0.0
IMSS II	-	-	-
IMSS III	2	0	0.0
IMSS IV	2	0	0.0
Tambaque I	2	0	0.0
Tambaque II	4	1	25.0
Tambaque III	4	0	0.0
Tambaque IV	4	0	0.0
Tancanhuitz I	6	2	33.3
Tancanhuitz II	7	2	28.5
Tancanhuitz III	6	0	0.0
Tancanhuitz IV	6	0	0.0
Est. Taninul I	2	1	50.0
Est. Taninul II	-	-	-
Est. Taninul III	-	-	-
Est. Taninul IV	-	-	-
C. Campestre I	3	0	0.0
C. Campestre II	-	-	-
C. Campestre III	-	-	-
C. Campestre IV	-	-	-
Gogorrón I	10	1	10.0
Gogorrón II	8	0	0.0
Gogorrón III	8	1	8.0
Gogorrón IV	8	0	0.0
Xilitla I	-	-	-
Xilitla II	4	1	25.0
Xilitla III	4	1	25.0
Xilitla IV	4	0	0.0
- No se muestreo	-	-	-

TABLA 28. Coeficientes de correlación de Spearman entre los niveles de infestación del agua y los parámetros ambientales.

Parámetro	N	r_s	P
Temperatura del agua	31	0.340	m. s.
Temperatura ambiente	31	0.255	n. s.
pH	31	-0.528	<0.05
OD	31	-0.370	<0.05
Conductividad	31	0.137	n. s.
Cloro libre	31	-0.552	<0.05
COT	16	0.493	<0.05
Sólidos suspendidos	16	-0.088	n. s.
Sólidos disueltos	16	0.005	n. s.
Sólidos totales	16	-0.002	n. s.

N= Número de datos.

r_s = Coeficiente de correlación de Spearman

P= Nivel de significancia

n. s.= no significativo con $P < 0.05$

m. s.= marginalmente significativo

Como se ha mencionado consistentemente a través de este trabajo, las AVL con potencial patógeno son termotolerantes y se esperaría encontrar mayor cantidad de amibas de este tipo en aquellos lugares donde las aguas sean termales. La prueba estadística de Spearman como se ve en la Tabla 28 da un valor de $r_s = -0.340$ m. s., lo que demuestra es que la presencia de amibas patógenas está relacionada con la temperatura elevada del agua. Este hecho está en concordancia con la información que anteriormente se ha descrito acerca de que las AVL pueden ser encontradas con facilidad en agua caliente.

Es interesante recalcar en esta Sección que cuando se aplicó el análisis de correlación seleccionando solo a las amibas patógenas con los diferentes parámetros ambientales medidos, se pudo establecer una relación directamente proporcional entre la temperatura del agua, pH, OD y COT comprobándose que estos parámetros ejercieron una influencia muy marcada sobre su crecimiento en la forma como se reporta en la literatura.

6. ANÁLISIS DE CASOS POTENCIALES DE INFECCIONES AMIBIANAS EN EL HOSPITAL GENERAL DE CD. VALLES

Con el objeto de documentar casos potenciales de infecciones por AVL, se analizaron retrospectivamente 100 expedientes médicos tomados de los archivos del Hospital General de Cd. Valles (1990-93), incluyendo solamente aquellos casos con diagnóstico meningitis o meningoencefalitis de etiología desconocida.

De los 100 expedientes se encontraron 16 casos, todos ellos de desenlace fatal y fulminante, donde no se encontró información acerca del agente que produjo la muerte (Fig. 9). Sin embargo, la sintomatología y los antecedentes registrados sugieren una probable infección por AVL patógenas como causa de muerte. Desafortunadamente, no se hicieron necropsias de los pacientes para obtener cortes histológicos con los que se pudiera verificar la causa de la enfermedad.

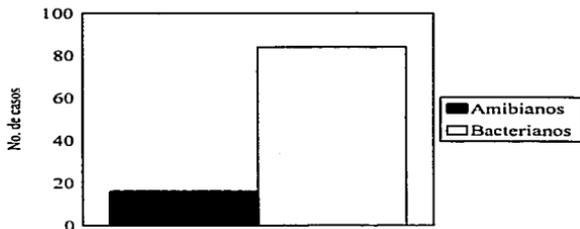


Figura 9. Casos potenciales de infección amibiana de pacientes con meningoencefalitis del Hospital General de Cd. Valles (1993-1994).

Como se observa en la Tabla 29, las meningoencefalitis aparecieron en pacientes muy jóvenes (1 mes a 9 años), jóvenes (14 a 27 años) y adultos (57 a 83 años), siendo diez casos masculinos y seis femeninos.

En otros países, la mayoría de los casos de MEAP ocurren durante el verano cuando la temperatura del ambiente es alta. Un estudio epidemiológico efectuado encontró que todos los pacientes con MEAP contrajeron la enfermedad en los meses de junio, julio y agosto (CDC, 1980). Por otra parte, la EAG parece ocurrir en cualquier estación en pacientes inmunosuprimidos o en aquellos debilitados por diabetes, desnutrición, alcoholismo, radioterapia, cáncer e incluso embarazo (Rivera *et al.*, 1993).

TABLA 29. Relación de casos fatales de meningoencefalitis de etiología desconocida registrados entre 1991 y 1993 en el Hospital General de Cd. Valles.

Edad (años)	Sexo	Origen del paciente
1 mes	M	Tancuayalab
1	F	Xilitla
2	F	Cd. Valles
3	M	Cd. Valles
4	F	Tamuín
6	F	Tampamolón
9	M	Tanlajás
14	F	Tanlajás
15	M	Axtla de Terrazas
16	M	Ébano
21	M	Cd. Valles
25	M	Cárdenas
27	M	Tamasopo
51	M	Tamuín
68	F	Cd. Valles
83	M	San Antonio

Número de casos totales N= 16

VIII. CONCLUSIONES

Las principales conclusiones son las siguientes:

1. La diversidad de amibas de vida libre recolectadas en sistemas recreacionales del estado de San Luis Potosí estuvo representada por 74 aislados pertenecientes a tres órdenes, cuatro familias y seis géneros: *Hartmannella*, *Naegleria*, *Echinamoeba*, *Willertia*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*. A los que correspondieron 20 especies diferentes. Tres aislados no fueron identificados a nivel genérico.
2. Cinco aislados fueron identificadas como *Naegleria fowleri* que es una amiba que se ha descrito extensamente en la literatura como altamente patógena.
3. El número de amibas y la variedad de especies aisladas fue mayor en los cuerpos de agua artificiales (piscinas) que en los cuerpos de agua naturales. Los sistemas recreacionales artificiales de El Bañito, Taninul y el Hotel Valles tuvieron el mayor número de aislados patógenos durante todos los muestreos. Se destaca que de El Bañito y de Taninul se aislaron también amibas de la especie *Naegleria fowleri*, el organismo amibiano de vida libre más virulento de todos los conocidos.
4. De los 74 aislados amibianos, 23 mataron a los ratones inoculados hasta un 100% en pruebas de patogenicidad. El lapso promedio para la muerte de los ratones inoculados fue de seis días y los órganos más afectados cerebro y pulmón, sin llegar a afectar severamente a hígado y riñones. Esto indica que la velocidad con que las amibas se desplazan destruyendo tejidos (infección fulminante), es un factor que puede explicar la rapidez con la que se ven afectados los pacientes.
5. Los factores que más favorecieron la presencia de amibas patógenas en el agua fueron la temperatura del agua y el COT. Temperaturas elevadas y la presencia de materia orgánica en el agua promueven el crecimiento y proliferación de protozoos de diversos tipos incluyendo a las especies patógenas.
6. La presencia de cloro en el agua afectó de los niveles de infestación del agua por amibas patógenas, es decir que cuando había cloro en el agua, no hubo presencia de amibas.

7. En la columna de agua de los sistemas recreacionales muestreados, el número de amibas registradas por NMP/100 ml de agua estuvo entre 3 y 43 durante el mes de diciembre de 1995. Mientras que en el mes de marzo la estimación de amibas fue entre 9 a 120. Los datos de mayor NMP coinciden con la época más calurosa. Cuando se comparan estos valores con aquellos registrados en otros sistemas recreacionales artificiales en Bélgica y Checoslovaquia tenemos que las concentraciones de AVL en los sistemas recreacionales mexicanos son menores casi 10 veces (Cerva y Huldt, 1974; De Jonckheere, 1979 a, c, 1981a).
8. Los niveles de infestación del agua por AVL patógenas encontrados en la Huasteca Potosina son motivo de preocupación aunque no se produzcan un número de infecciones por MEAP y EAG a nivel de problema de salud pública.
9. En el estudio retrospectivo sobre expedientes de pacientes con meningoencefalitis del Hospital General de Ciudad Valles, entre el período de 1990 a 1993, se encontraron 100 casos totales. En 84 de ellos los exámenes de laboratorio indicaron la presencia de bacterias como causa de la infección. En los otros 16 pacientes no se pudo identificar al agente causante de la enfermedad, aunque los síntomas y signos de estos pacientes coinciden con los descritos para infecciones causadas por amibas de la especie *Naegleria fowleri*. Sin embargo, no se determinó si alguno de los pacientes con meningoencefalitis pudo haberse inoculado en alguno de los sistemas recreacionales muestreados.

IX. RECOMENDACIONES

Considerando las conclusiones anteriores y reconociendo que en los sistemas recreacionales muestreados hay presencia de AVL con potencial patógeno, se debe enfocar la atención a los hábitos de los bañistas. De la observación directa durante este estudio se pudo comprobar el hacinamiento de usuarios en piscinas pequeñas como en El Bañito. Por ejemplo, por negligencia o por falta de infraestructura, los usuarios no se bañan previamente o no se lavan los pies antes de meterse a las piscinas. En lugares como Taninul los bañistas utilizan los lodos apicándolos directamente en la cara para tratamientos faciales, ejecutan clavados sin narigueras, permitiendo que el agua entre violentamente a través de la nariz, facilitando la inoculación directa de AVL como *Naegleria fowleri*. Personas enfermas, incluso con infecciones en piel, se introducen en las piscinas con el fin de recibir los beneficios de las aguas termales exponiéndose a acantamebas oportunistas; los individuos inmunosuprimidos son especialmente susceptibles. Sumado a todo lo anterior, la gente remueve los sedimentos de la piscina e incorpora materia orgánica que sirve como alimento para el crecimiento de las amibas.

La limitada cantidad de agua potable y la disponibilidad de cuerpos de agua naturales empleados para satisfacer las necesidades básicas de las poblaciones, así como los niveles de cloro insuficientes o nulos en las piscinas son otros factores que pueden favorecer la aparición de enfermedades del sistema nervioso central causadas por AVL en los lugares donde se detectaron estas amibas.

Se recomienda vigilar y analizar con mayor frecuencia la calidad microbiológica de las aguas de los sistemas recreacionales donde se encontró mayor cantidad de amibas, sobre todo aquellas pertenecientes a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella* referidas como los organismos de mayor patogenicidad. Por esto el Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente ha propuesto la creación del "Programa de vigilancia permanente de aparición de casos de meningoencefalitis debidos a amibas de vida libre". El programa está diseñado para ser aplicado a nivel nacional y en esta primera etapa ha iniciado en el Estado de San Luis Potosí. Para ello se han logrado establecer vínculos de cooperación con los principales centros hospitalarios de Cd. Valles, entre los que se incluyen el IMSS, el ISSSTE, el Hospital Regional de Cd. Valles además de diversas clínicas particulares, para revisar muestras biológicas de aquellos pacientes que presenten síntomas de meningitis y especialmente aquellos casos en donde los resultados de laboratorio no demuestren la presencia de bacterias ni de hongos en líquido cefalorraquídeo.

Se recomienda un adecuado mantenimiento de las piscinas añadiendo (en aquellas donde sea posible, como el Hotel Valles y El Bañito) niveles de cloro suficientes para eliminar quistes viables de AVL. Se ha demostrado que concentraciones de cloro libre residual de 2 mg/l a pH de 7.2, temperaturas de alrededor de 25 °C y con un tiempo de contacto de 30 min se logra la eliminación de quistes de *Naegleria* patógena hasta en un 99.95% (Chang, 1978).

Los datos acerca de los protozoos indican que estos microorganismos son considerablemente más resistentes a la acción del cloro que las bacterias o virus. Por consiguiente, es importante que se respeten los niveles de cloración con las concentraciones adecuadas y tiempos de contacto recomendados mencionados para la total eliminación de estos agentes potencialmente patógenos (OMS, 1984).

En el caso de Taninul la cloración no sería conveniente debido al flujo continuo del agua en la alberca, en cambio la limpieza frecuente para remover los sedimentos y natas parece una mejor estrategia de prevención contra las AVL.

Se recomienda también establecer campañas para los usuarios de los sistemas recreacionales artificiales y naturales promoviendo el uso de narigueras, para evitar la entrada directa del agua a las fosas nasales, especialmente si van a realizar clavados.

El hallazgo de AVL patógenas causantes de meningoencefalitis, en cuerpos de agua natural de la Huasteca Potosina sugiere un llamado de alerta para mantener una vigilancia hacia los casos de meningoencefalitis de etiología desconocida en los hospitales de la región.

Actualmente no se cuenta con métodos para detectar protozoos patógenos en el agua que puedan emplearse en un programa ordinario de vigilancia. Existen métodos de investigación en los que se emplean técnicas de concentración para detectar quistes mediante microfiltración y otras técnicas de identificación por cultivos, pero su empleo es conveniente sólo cuando se efectúan simultáneamente estudios epidemiológicos. Por otra parte no se pueden efectuar recomendaciones en relación con la frecuencia de muestreo para la vigilancia sanitaria requiriéndose estudios al respecto.

Con respecto a la legislación para controlar a las AVL en el ambiente, existen tres aspectos reglamentarios que dificultan la instrumentación de un control aplicable en el corto plazo:

1. Las AVL no se consideran un problema de salud pública que justifique el distraer recursos para la vigilancia sanitaria de AVL.
2. El conocimiento de la existencia de las AVL no está muy extendido, incluso en la comunidad médica. Se deben hacer esfuerzos para que los médicos y el personal de laboratorio conozcan y diagnostiquen oportunamente las infecciones causadas por estas amibas.
3. No existe personal capacitado en los laboratorios del sector salud para aislar e identificar a las AVL y el que existe se encuentra restringido a laboratorios de investigación y hospitales regionales.

X. LITERATURA CITADA

- Anderson, K. y Jameson, A. 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* i: 902-903.
- Andrews, A. M., Robinson, R. H., Robinson, B., Christi, P., Baverstock, P. R., Dobson, P. J. y Blackler, S. J. 1989. A genetic approach to species criteria in the amoebae genus *Naegleria* using allozyme electrophoresis. *Int. J. Parasitol.* 19: 823-834.
- Anzil, A. P., Rao, C., Wrzolek, M. A., Visvesvara, G. S., Sher, J. H. y Kozlowski, P. B. 1991. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115: 21-25.
- Apley, J., Clarke, S. K. R., Roome, A. P. C. H., Sandry, S. A., Saygi, G., Silk, B. y Warhurst, D. C. 1970. Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Brit. Med. J.* i: 596-599.
- Bassols, B. A., Rentería, R. S., Ortiz, W. A., Hernández, A. R., Bustamante, L. C. y Sosa, F. P. 1977. *Las Huastecas en el Desarrollo Regional de México*. Trillas, México. 436 pp.
- Batista, N. D., Mascaró, C. L., Guevara, D. B. y Osuna, A. C. 1982. Capacidad patógena para el ratón albino de algunas especies de *Acanthamoeba* y *Hartmannella*. *Rev. Ibér. Parasitol.* 42: 95-102.
- Berger, T.S., Mondino, J. B., Hoft, H. R., Donzis, B. P., Holly, N. G., Farley, K. M. y Levenson, E. J. 1990. Successful medical management of *Acanthamoeba* keratitis. *Amer. J. Ophthalmol.* 110: 395-403.
- Bottone, E. J. 1993. Free-living amoebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Mt. Sinai J. Med.* 60: 260-270.
- Brown, T. J., Cursons, R. T. M., Keys, E. A., Marks, M. y Miles, M. 1983. The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the North Island of New Zealand. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.* 17: 59-69.
- Butt, C. G. 1968. The pathology of amoebic encephalitis. *J. Bull. Pathol.* 9: 83-92.

- Byers, T., Hugo, E. R. y Stewart, V. J. 1990. Genes of *Acanthamoeba*: DNA, RNA and protein sequences (A Review). *J. Protozool.* **37**: 175-255.
- Cable, B. L. y John, D. T. 1986. Conditions for maximum enflagellation in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **33**: 467-472.
- Cain, A. R. R., Wiley, P. F., Brownell, B. y Warhurst, D. C. 1981. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet* **i**:441.
- Callicot, J. H. Jr., Nelson, E. C., Jones, M. M., Dos Santos, J. G., Duma, R. J. y Morrison, J. V. 1968. Meningoencephalitis due to pathogenic free-living amoebae. *J. Am. Med. Assoc.* **206**: 579-582.
- Carter, R.F. 1970. Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental changes induced by it. *J. Pathol.* **100**: 217-244.
- Carter, R.F. 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**: 193-201.
- Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderon, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramirez, E. y Suarez, G. 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch. Med. Res.* **27**: 579-586.
- Cerva, L. 1969. Amoebic meningoencephalitis: Axenic culture of *Naegleria*. *Science* **163**: 576.
- Cerva, L. 1971. Studies of limax amoebae in a swimming pool. *Hydrobiologia* **38**: 141-161.
- Cerva, L. y Novak, K. 1968. Amoebic meningoencephalitis. Sixteen fatalities. *Science* **160**: 92.
- Cerva, L. y Huldtt, G. 1974. Limax amoebae in five swimming pools in Stockholm. *Folia Parasitologica* **21**: 71-75.
- Cerva, L., Novak, K. y Culbertson, C. G. 1968. An outbreak of acute, fatal, amoebic meningoencephalitis. *Am. J. Epidemiol.* **88**: 436-444.
- Cerva, L., Tintera, M. y Bednar, J. 1972. Investigation of amoebae of the limax group in a swimming pool during experimental application of iodine for water disinfection. *Cs. Hyg.* **17**: 389-392.

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Cerva L., Serbus C. y Skocil V. 1973. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitologica* 20: 97-103.
- Cerva, L., Kasprzak, W. y Mazur, T. 1982. *Naegleria fowleri* in cooling waters of power plants. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 26: 152-161.
- CDC (Center for Disease Control). 1980. Primary amoebic meningoencephalitis. *M. M. W. R.* 29: 405-407.
- Cleland, P. G., Lawande, R. V., Onyemelukwe, G. y Whittle, H. C. 1982. Chronic amoebic meningoencephalitis. *Arch. Neurol.* 39: 56-57.
- Conde, B. M. 1990. *Entamoeba histolytica*: Relación huésped parásito y respuesta inmune. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 32: 215-220.
- Coronado-Gutiérrez, R. y López-Ochoterena, E. 1980. Análisis protozoológico de diez piscinas localizadas en el Distrito Federal y el Estado de Morelos, México. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 22: 157-160.
- Culbertson, C. G. 1975. Soil amoeba infection. *Am. J. Clin. Pathol.* 63: 475-482.
- Culbertson, C. G. 1981. Amoebic meningoencephalitis. *Antibiotics Chemoter.* 30: 28-53.
- Culbertson, C. G., Smith, J. y Minner, J. 1958. *Acanthamoeba* observations on animal pathogenicity. *Science* 127:1506.
- Cursons, R. T. M., y Brown, T. J. 1978. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *J. Clin. Pathol.* 31: 1-11.
- Cursons, R. T. M., Brown, T. J., Keys, E. A., Moriarty, K. M., y Till, D. 1980. Immunity to pathogenic free-living amoebae: role of humoral antibody. *Infect. Immun.* 29: 401-407.
- Chang, S. L. 1971. Small, free-living amoebas: cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenesis, and resistance. *Curr. Top. Comp. Pathobiol.* 1: 201-254.
- Chang, S. L. 1974. Ethiological, pathological, epidemiological, and diagnostical consideration of primary amoebic meningoencephalitis. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 3: 135-159.

- Chang, S. L. 1978. Resistance of pathogenic *Naegleria* to some common physical and chemical agents. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 368-375.
- Chang, S. L. 1979. Pathogenesis of pathogenic *Naegleria* amoeba. *Folia Parasitol. Pague.* **26**: 195-200.
- Daggett, P. M. y Nerad, T. A. 1983. The biochemical identification of vahlkampfiid amoebae. *J. Protozool.* **30**: 126-128.
- Daggett, P. M., Sawyer, T. K. y Nerad, T. A. 1982. Distribution and possible interrelationships of pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* from aquatic environments. *Microb. Ecol.* **8**: 371-386.
- Darbyshire, J. F. , Wheatley, R. E. , Greaves, M. P. y Inkson, R. H. 1974. A rapid micromethod for estimating bacterial and protozoan populations in soil. *Revue Ecol. Biol. Sol.* **11**: 465-475.
- Das, S., Saha, A. K., Nerad, T. A., Martinez, A. J., Lamarco, K. L., Basu, A., Legler, G. y Gleu, R. H. 1987. Partial purification and characterization of *Naegleria fowleri* β -glucosidase. *J. Protozool.* **34**: 68-74.
- Dawson, M. W. y Brown, T. J. 1987. The effect of chlorine and chlorine dioxide on pathogenic free-living amoebae (PFLA) in simulated natural conditions: The presence of bacteria and organic matter. *N. Z. J. Marine Freshwater Res.* **21**: 117-123.
- Dawson, M. W., Brown, T. J., Biddick, C. J. y Till, D. G. 1983. The effect of Baquacil on pathogenic free-living amoebae (PFLA) in simulated natural conditions in the presence of bacteria and/or organic matter. *N. Z. J. Marine Freshwater Res.* **17**: 313-320.
- De Jonckheere, J. F. 1977. Use of an axenic medium for differentiation between pathogenic and non pathogenic *Naegleria fowleri* isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 751-757.
- De Jonckheere, J. F. 1978. Quantitative study of *Naegleria fowleri* in surface water. *Protistologica* **14**: 475-481.
- De Jonckheere, J. F. 1979a. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur* **130 B**: 205-212.
- De Jonckheere, J. F. 1979b. Occurrence of *Naegleria* and *Acanthamoeba* in Aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **34**: 590-593.

- De Jonckheere, J. F. 1979c. Studies on pathogenic free-living amoebae in swimming pools. *Bull. Inst. Pasteur* 77: 385-392.
- De Jonckheere, J. F. 1981a. *Naegleria australiensis* sp. nov. another pathogenic *Naegleria* from water. *Protistologica* 17: 423-429.
- De Jonckheere, J. F. 1981b. Pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* spp. thermally polluted discharges and surface waters. *J. Protozool.* 28: 56-59.
- De Jonckheere, J. F. 1982. Isoenzyme patterns of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* spp. using agarose isoelectric focusing. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur* 133 A: 319-342.
- De Jonckheere, J. F. 1984. *Postgraduate Course on Biochemical Techniques for the Diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis*. UNAM, México. 70 pp.
- De Jonckheere, J. F. 1987a. *Taxonomy. from Amphizoic Amoebae. Human Pathology*. Ed. por Rondanelli, E. G. Puccin Nuova Libreria, Padua, Italia: 25-48.
- De Jonckheere, J. F. 1987b. *Epidemiology. From Amphizoic Amoebae. Human Pathology*. Ed. por Rondanelli, E. G. Puccin Nuova Libreria, Padua, Italia: 125-147.
- De Jonckheere, J. F. 1987c. Characterization of *Naegleria* spp. by restriction endonuclease digestion of whole-cell DNA. *Molecular and Biochemical Parasitol.* 24: 55-56.
- De Jonckheere, J. F. y Van de Voorde. 1977. The distribution of *Naegleria fowleri* in man-made thermal waters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 26: 10-15.
- De Jonckheere, J. F., Van Dijk., H. y Van de Voorde. 1975. The effect of thermal pollution on the distribution of *Naegleria fowleri*. *J. Hyg.* 75: 7-13.
- De Jonckheere, J. F., Aerts, M. y Martinez, J. 1983. *Naegleria australiensis*: experimental meningoencephalitis in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 712-716.
- De Jonckheere, J. F., Pernin, P., Scaglia, M. y Michel, R. 1984. A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* n. spp. *J. Protozool.* 31: 324-331.

- De la Maza, E. J. y White, L. 1990. Rhopalocera de la Huasteca Potosina, su distribución, composición, origen y evolución. *Rev. Soc. Mex. Lep.* **13**: 31-88.
- Delattre, J. M., y Oger. 1981. *Naegleria fowleri* and heated aquatic environments: a possible mechanism. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **61**: 441-452.
- Detterline, J. L. y Wilhelm, W. E. 1991. Survey of pathogenic *Naegleria fowleri* and thermotolerant amoebas in federal recreational waters. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **110**: 244-261.
- Derreumaux, A. L., Jadin, J. B., Willaert, E. y Moret, R. 1974. Action du chlore sur les amebes de l'eau. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **54**: 415-428.
- Dirección Estatal de Turismo del Estado de San Luis Potosí. 1984. *Guía Turística del Estado de San Luis Potosí*. Proyectos y Ejecución Editorial, México. 165 pp.
- Dirección Estatal de Turismo del Estado de San Luis Potosí. 1993. *Guía Personal del Estado de San Luis Potosí*. Unicornio, México. 66 pp.
- Donzis, B. P., Mondino, J. B., Weissman, A. B. y Bruckner, A. D. 1989. Microbial analysis of contact lens care systems contaminated with *Acanthamoeba*. *Amer. J. Ophthalmol.* **108**: 53-56.
- Dorsch, M. M., Cameron, A. S. y Robinson, B. S. 1983. The epidemiology and control of primary amoebic meningoencephalitis with particular reference to South Australia. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* **77**: 372-377.
- Dos Santos, J. G. N. 1970. Fatal primary amoebic meningoencephalitis. A retrospective study in Richmond, Virginia. *Am. J. Clin. Pathol.* **54**: 737-742.
- Duma, R. J. y Finley, R. 1976. *In vitro* susceptibility of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* species to a variety of therapeutic agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**: 370-376.
- Duma, R. J., Rosenblum, W. I., McGehee, R. F., Jhons, M. M. y Nelson, E. C. 1971. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria*. Two new cases, response to amphotericin B, and a review. *Ann. Intern. Med.* **74**: 923-931.
- Edmondson, W. T. y Winberg, G. G. 1971. *A Manual on Methods for the Assessment of Secondary Productivity in Fresh Waters*. Kemp, Osney Mead, Oxford. 103 pp.

- Eisen, D. y Franson, R. C. 1987. Acid-active neuraminidases in the growth media from cultures of pathogenic *Naegleria fowleri* and in sonicates of rabbit alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Acta* **924**: 369-372.
- Embley, T. M. 1991. The linear PCR reaction: A simple and robust method for sequencing amplified rRNA genes. *Letters in Appl. Microbiol.* **13**: 171-174.
- Engel, J. P., Rubin, A. J., y Sproul, O. J. 1983. Inactivation of *Naegleria gruberi* cyst by chlorinated cyanurates. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1157-1162.
- Fenchel, T. 1987. *Ecology of Protozoa: The Biology of Free-living Phagotrophic Protists*. Springer Verlag, Wisconsin. 197 pp.
- Fernández-Galiano, D. 1979. *Las Amebas Anfizoicas del Hombre*. Instituto de España. Real Academia Nacional de Medicina, Madrid. 28 pp.
- Ferrante, A. 1991. Free-living amoebae: pathogenicity and immunity. *Parasite Immunology* **13**: 31-47.
- Ferrante, A. y Bates, E. J. 1988. Elastase in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infect. Immun.* **56**: 3320-3321.
- Ferrante, A., Kelly, R. B. y Thong, H. Y. 1984. *In vitro* sensitivity of virulent *Acanthamoeba culbertsoni* to a variety of drugs and antibiotics. *Int. J. Parasitol.* **14**: 53-56.
- Ferrante, A., Hill, N. L., Goh, D. H. B. y Kumaratilake, L. 1989. Altered neutrophils in mice immune to experimental *Naegleria* amoebic meningoencephalitis. *Immunol. Letts.* **22**: 301-306.
- Fowler, M. y Carter, F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp. *Brit. Med. J.* **2**: 740-742.
- Fulford, D. E. y Marciano-Cabral, F. 1986. Cytolytic activity of *Naegleria fowleri* cell-free extract. *J. Protozool.* **33**: 498-502.
- Fulford, D. E., Bradley, S. G. y Marciano-Cabral, F. 1985. Citophatogenicity of *Naegleria fowleri* for cultured rat neuroblastoma cells. *J. Protozool.* **32**: 176-180.
- García, E. 1988. *Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen*. Laríos, México. 217 pp.

- Gonzalez, M. M., Gould, E., Dickinson, G., Martinez, A. J., Visvesvara, G. S., Cleary, T. J. y Hensley, G. T. 1986. Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organisms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **110**: 749-751.
- Greenberg, E. A., Trussell, R. R. y Clesceri, S. L. 1988. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 16th. APHA, AWWA, WPCF. EUA. 1268 pp.
- Griesemer, D. A., Barton, L. L., Reese, C. M. Johnson, P. C., Gabrielsen, J. A., Talwar, D. y Visvesvara, G. S. 1994. Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. *Pediatr. Neurol.* **10**: 249-254.
- Griffin, J. L. 1972. Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free-living amoebas. *Science* **178**: 69.
- Griffin, J. L. 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: Isolations, competitors, ecologic interactions and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J. Protozool.* **30**: 403-409.
- Hanadto, H. H., Aufy, S. M., el-Hayawan, I. A., Saleh, M. H. y Nagaty, I. M. 1993. Study of free living amoebae in Egypt. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **23**: 631-637.
- Hysmith, R. M. y Franson, R. C. 1982a. Elevated levels of cellular and extracellular phospholipases from pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta* **711**: 26-32.
- Hysmith, R. M. y Franson, R. C. 1982b. Degradation of human myelin phospholipids by phospholipase-enriched culture media of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta* **712**: 698-701.
- Jager, B. V. y Stamm, W. P. 1972. Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet* **ii**: 1343-1345.
- Jaramillo, Y. R., Chávez, M. G., Olvera, J. R. y Martinez, J. A. 1989. Encefalitis por una nueva amiba de vida libre, probablemente *Leptomyxa*. *Patología* **27**: 137-141.
- John, D. T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. In: *Parasitic Protozoa*, Ed. por Kreier J. P. y Baker J. R. Academic Press, Nueva York. 140-246.

- John, D. T. y De Jonckheere, J. F. 1985. Isolation of *Naegleria australiensis* from an Oklahoma lake. *J. Protozool.* **32**: 571-575.
- John, D. T., Cole, T. B. y Bruner, R. A. 1985. Amebostomes of *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **32**: 12-19.
- Kadlec, V., Skvářová, J., Červa, L. y Nebázniva, D. 1980. Virulent *Naegleria fowleri* in indoor swimming pool. *Folia Parasitol. Prague* **27**: 11-17.
- Kalinina, V. L. y Page, C. F. 1992. Culture and preservation of naked amoebae. *Acta Protozoologica* **31**: 115-126.
- Kasprzak, W., Mazur, T. y Červa, L. 1982. *Naegleria fowleri* in thermally polluted waters. *Folia Parasitol. Prague* **29**: 211-218.
- Kilvington, S. 1995. Identification and epidemiological typing of *Naegleria fowleri* with DNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2071-2078.
- Kilvington, S., Beeching, J. R. y White, G. D. 1991a. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 310-314.
- Kilvington, S., Mann, P. G. y Warhurst D. C. 1991b. Pathogenic *Naegleria* amoebae in the waters of Bath, a fatality and its consequences. En: *Hot Springs of Bath*, Ed. por Kellaway, G. A. Bath City Council, Reino Unido: 89-96.
- Kyle, D. E. y Pittman, N. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in freshwater lakes. *J. Protozool.* **32**: 99-105.
- Kyle, D. E. y Noblet, G. P. 1986. Seasonal distribution of the thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* **33**: 422-434.
- Kyle, D. E. y Noblet, G. P. 1987. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J. Protozool.* **34**: 10-15.
- Lalitha, M. K., Anandi, V., Srivastava, A., Thomas, K., Cherian, A. M. y Chandri, S. M. 1985. Isolation of *Acanthamoeba culbertsoni* from a patient with meningitis. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 666-667.

- Lares-Villa, F., De Jonckheere, J. F., Moura, H., Rechi, I. A., Ferreira, G. E., Fernández, Q. G., Rufz, M. C. y Visvesvara, G. S. 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: Study of the isolates. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 685-688.
- Lee, J. J., Hutner, S. H. y Bovee, E. C. 1985. *An Illustrated Guide to the Protozoa*. Soc. Prot. Allen Press, Inc., Kansas. 622 pp.
- López-Corella, E., De León, B. B. y De Jonckheere, J. F. 1989. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo Michoacán México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **46**: 619-622.
- Loschiavo, F., Ventura-Spagnolo, T., Sessa, E. y Bramenti, P. 1993. Acute primary meningoencephalitis from entamoeba *Naegleria fowleri*. Report of a clinical case with favourable outcome. *Acta Neurol.* **15**: 333-340.
- Lowrey, D. M. y McLaughlin, J. 1985. Subcellular distribution of hidrolases in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **32**: 616-621.
- Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiological Rev.* **52**: 114-133.
- Marciano-Cabral, F. y Fulford, D. E. 1986. Cytopathology of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* species for cultured rat neuroblastoma cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 1133-1137.
- Marciano-Cabral, F. y M. Cline. 1987b. Chemotaxis by *Naegleria fowleri* for bacteria. *J. Protozool.* **34**: 127-131.
- Marciano-Cabral, F., Patterson, M., John, D. T. y Bradley, S. G. 1982. Cytopathogenicity of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* for established mammalian cell cultures. *J. Parasitol.* **68**: 1110-1116.
- Marciano-Cabral, F., Cline, M. L. y Bradley, S. G. 1987a. Specificity of antibodies from human sera for *Naegleria* species. *J. Clin. Microbiol.* **25**: 692-697.
- Marciano-Cabral, F., Stanitski, S., Radhakrishna, V. y Bradley, S. G. 1987b. Characterization of a neutral aminoacyl-peptide hydrolase from *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **34**:146-149.
- Marciano-Cabral, F., Zoghby, K. L. y Bradley, S. G. 1990. Cytopathic action of *Naegleria fowleri* amoebae on rat neuroblastoma target cells. *J. Protozool.* **37**: 138-144.

- Martinez, A. J. 1980. Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection? *Neurology*. **30**: 567-574.
- Martinez, A. J. 1983. Isolation of two strains of *Acanthamoeba culbertsoni* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol.* **18**: 1405-1412.
- Martinez, A. J. 1985. *Free-living Amebas: Natural History Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 156 pp.
- Martinez, A. J. y Amado-Ledo, E. 1979. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amibas de vida libre. *Protozoología, Epidemiología y Neuropatología. Morfología Normal y Patológica* **B3**: 679-704.
- Martinez, A. J. y Janitschke, J. 1985. *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; a review. *Infection* **13**: 251-256.
- Martinez, A. J., Dos Santos, J. G., Nelson, E. C., Stamm, W. P. y Willaert E. 1977. *Primary amoebic meningoencephalitis*. In: Sheldon, S.S. y Rosen, P.P. *Pathology Annual* Parte 2. Vol. 12. Appleton-Century Crofts Nueva York: 225-248.
- Mascaró, M. L., Mascaró, M. C., Osuna, A., Pérez, M. I. y González-Castro, J. 1986. Study of an ameboflagellate isolated from the nasal mucosa of man. *J. Protozool.* **33**: 89-93.
- Michelson, M. K., Henderson, W. R., Chi, E. Y., Fritsche, T. R. y Klebanoff, S. J. 1990. Ultrastructural studies on the effect of tumor necrosis factor on the interaction of neutrophils and *Naegleria fowleri*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**: 225-233.
- Nerad, T. A. y Daggett, P. M. 1979. Starch gel electrophoresis: an effective method for separation of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* strains. *J. Protozool.* **26**: 613-625.
- Nerad, T. A., 1993. *Catalogue of Protists*. Ed. por ATCC (American Type Culture Collection), EUA. 100 pp.
- Newsome, A. L., y Arnold, R. R. 1985. Equivalent mortality in normal and athymic mice infected with *Naegleria fowleri*. *J. Parasitol.* **71**: 678-679.

- Ockert, G. 1993. Review article: Occurrence, parasitism and pathogenic potency of free-living amoeba. *Appl. Parasitol.* **34**: 77-88.
- Ofori-Kwakye, S. K., Sidebotton, D. G., Herbert, J., Fischer, E. G. y Visvesvara, G. S. 1986. Granulomatous brain tumor caused by *Acanthamoeba*. *J. Neurosurg.* **64**: 505-509.
- Oloму, N., Martínez, A. J., Lamarco, K. L., Nerad, T. A., Saha, A. K., Das, S. y Gleu, R. H. 1986. Demonstration of various acid hidrolases and preliminary characterization of acid phosphatase in *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* **33**: 317-321.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 1984. *Guías para la Calidad del Agua Potable*. Vol. 1. No. 481. OMS, Washington. 101pp.
- Page, F. C. 1966. *Taxonomical Criteria for Small Amoebae, With a Redefinition of the Genera Hartmanella and Acanthamoeba and Descriptions of Three New Species*. Tesis Doctoral, University of Wisconsin. 150pp.
- 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.* **116**: 149-184.
- Page, F. C. 1975. Morphological variation in the cyst wall of *Naegleria gruberi* (Amoebida, Vahlkampfiidae). *Protistologica* **11**: 195-204.
- Page, F. C. 1976. *An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 180 pp.
- Page, F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 122 pp.
- Pan, N. R. y Ghosh, T. N. 1971. Primary amoebic meningoencephalitis in two Indian children. *J. Indian Med. Assoc.* **56**: 134-137.
- Parnow, R. J. 1992. Computer program estimates of bacterial densities by Most Probable Numbers. *Food Techn.* **26**: 56-62.

- Paule, M. R., Bateman, E., Hoffman, L., Iida, C., Imboden, M., Kubaska, W., Kownin, P., Li, H., Lofquist, A., Risi, P., Yang, Q. y Zwick, M. 1991. Initiation and regulation mechanisms of ribosomal RNA transcription in the eukaryote *Acanthamoeba culbertsoni*. *Molecular and Cellular Biochemistry* **104**: 119-126.
- Pelczar, J. M., Reid, D. R. y Chan, S. C. 1982. *Microbiología*. Mc Graw Hill, Nueva York. 826 pp.
- Pernin, P., Cariou, M. L. y Jacquier A. 1985. Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.* **32**: 592-603.
- Petri, W. A. y Ravdin, J. I. 1990. Protection of gerbils from amebic liver abscess by immunization with the galactose-specific adherence lectin of *Entamoeba histolytica*. *Infect. Immun.* **59**: 97.
- Petri, W. A., Smith, R. D., Slechsinger, P. H., Murphy, C. F. y Ravdin, J. I. 1987. Isolation of the galactose-binding lectin that mediates the *in vitro* adherence of *Entamoeba histolytica*. *J. Clin. Invest.* **80**: 12387.
- Pidherney, M. S., Alizadeh, H., Stewart, G. L., McCulley, J. P. y Niederkorn, J. Y. 1993. *In vitro* and *in vivo* tumoricidal properties of a pathogenic/free living amoebae. *Cancer Letters* **72**: 91-98.
- Puig, H. 1976. *Végétation de la Huasteca, Mexique*. Mission Archeologique et Ethnologique Française au Mexique, Paris. 534 pp.
- Pussard, M. y Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica* **13**: 557-598.
- Ravdin, J. I. 1986. Pathogenesis of disease caused by *Entamoeba histolytica*: studies of adherence, secreted toxins and contact-dependent cytolysis. *Rev. Infect. Dis.* **8**: 247.
- Ravdin, J. I., Shain, D. C. y Kelsall, B. L. 1993. Antigenicity immunogenicity and vaccine efficacy of the galactose-specific adherence protein of *Entamoeba histolytica*. *Vaccine* **11**: 241.
- Reilly, M. F., Marciano-Cabral, F., Bradley, M. D. y Bradley, S. G. 1983a. Agglutination of *Naegleria fowleri* and *Naegleria gruberi* by antibodies in human serum. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 576-581.

- Reilly, M. F., White, K. L. y Bradley, S. G. 1983b. Host resistance of mice to *Naegleria fowleri* infections. *Infect. Immunity*. **42**: 645-652.
- Richardson, B. J., Baverstock, P. R. y Adams, M. 1986. *Allozyme Electrophoresis. A Handbook for Animal Systematics and Population Studies*. Academic Press, Sydney. 100pp.
- Rivera, F. y Paz, E. 1978. Discusión y comentarios sobre los criterios taxonómicos para las amibas del grupo "limax". *Arch. Mex. Anat.* **15**: 72-82.
- Rivera, F., Paz, E. y López-Ochoterena, E. 1978a. Transformación ameboflagelar espontánea e inducida en especies del género *Naegleria*, Alexeieff (1912), emend Calkins (1913), recolectadas en piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México. *Arch. Mex. Anat.* **15**: 9-19.
- Rivera, F., Paz, M. E. y López-Ochoterena, E. 1978b. Estudio biológico de las amibas del grupo limax, géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*. *Arch. Mex. Anat.* **15**: 54.
- Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, E. y Paz, M. 1979. A quantitative, morphological, and ecological study of protozoa polluting tap waters in Mexico City. *Trans. Amer. Micr. Soc.* **98**: 465-469.
- Rivera, F., Galván, M., Robles, E., Leal P., González, L. y Lacy, A. M. 1981. Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J. Protozool.* **28**: 54-56.
- Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E. y Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming-pool waters in Mexico City. *J. Environ. Res.* **32**: 205-211.
- Rivera, F., Medina, F., Ramírez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G. y Robles, E. 1984a. Pathogenic and free-living protozoa isolated by culture from the nasopharyngeal and oral regions of odontological patients. *J. Environ. Res.* **33**: 428-440.
- Rivera, F., Romero, R. y Medina, F. 1984b. Meningoencefalitis amibiana primaria producida por *Naegleria fowleri*. *Rev. Fac. Med. México* **27**: 113-122.
- Rivera, F., García, G., Lugo, A., Zierold, E., Islas, J., Ramírez, E. y Bonilla, P. 1986a. Amoebae in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution Journal* **28**: 185-198.

- Rivera, F., Rosas, I., Castillo, M., Chavez, M., Gómez, R., Chio, R. E. y Islas, J. 1986b. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients II. *J. Environ. Res.* 39: 364-371.
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P. y Lares F. 1987a. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *J. Environ. Res.* 42: 149-154.
- Rivera, F., Sánchez, M. R., Lugo, A., Ramírez, P., Ortiz, R. y Calderón, A. 1987b. Ciliates in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution Journal* 34: 245- 262.
- Rivera, F., Lares, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Ramírez, P. y Paulín, A. 1988. Pathogenic Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and Environs. In: *Hazardous Waste: Detection, Control, Treatment*. Ed. por Abbou, R. Elsevier Science, Amsterdam: 1175-1179.
- Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Martínez, J., Rodríguez, S. y Alcocer, J. 1989a. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *J. Environ. Res.* 50: 289-295.
- Rivera, F., Lares, F., Morayta, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Xóchihua, L. y Calderón, A. 1989b. Contaminación del líquido cefalorraquídeo de un infante con síndrome de Arnold-Chiari tipo II, hidrocefalia y mielomeningocele, por *Naegleria lovaniensis*. *Rev. Enf. Infecc. Pediatría* 2: 91-94.
- Rivera, F., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez S., Ramírez, J., Xóchihua, L. y Guzmán, H. 1989c. *Acanthamoeba* spp. en quemaduras infectadas y rinitis. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 31: 137-140.
- Rivera, F., Cerva, L., Martínez, J., Keleti, G., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Graner, S. R., Saha, A. K. y Glew, R. H. 1990. *Naegleria lovaniensis tarasca* new subspecies, and the Purepecha strain, a morphological variant of *Naegleria lovaniensis* isolated from natural thermal waters in Mexico. *J. Protozool.* 37: 301-310.

- Rivera, F., Gallegos, E., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Ortiz, R. y Rodríguez, S. 1991. Félix Dujardin (semblanza histórica). *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* **42**: 13-17.
- Rivera, F., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos E., Labastida, A. and Chávez, M. 1992. Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution* **61**: 17-33.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Saldivar, B., Ramírez, P. y Durán A. 1993. Pathogenic and free-living amoebae from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *J. Environ. Res.* **62**: 43-52.
- Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air, and Soil Pollution* **74**: 65-87.
- Robert, V. B. y Rorke, L. B. 1973. Primary amebic encephalitis, probably from *Acanthamoeba*. *Ann. Intern. Med.* **79**: 174-179.
- Robinson, B. S., Christy, P. E. y De Jonckheere, J. F. 1989. A temporary flagellate (mastigote) stage in the vahlkampfiid amoeba *Williertia magna* and its possible evolutionary significance. *BioSystems* **23**: 75-86.
- Robinson, B. S., Christy, P., Hayes, S. y Dobson, P. 1992. *Manual of Analytical Methods. Protozoology*. Reporte No. 39. State Water Laboratory Engineering and Water Supply Department, Sidney. 90 pp.
- Rodríguez-Pérez, E. 1984. Meningoencefalitis por *Naegleria fowleri*. Informe de un caso. *Infectología* **4**: 263-266.
- Rodríguez, S., Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R. y Hernández, D. 1993. Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosí, SLP. México. *J. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* **3**: 229-241.
- Rondanelli, E. G. 1987. *Infectious Diseases. 1. Amphizoic Amoebae Human Pathology*. Piccin Nuova Libreria, Padua, Italia. 279pp.
- Rowbotham, T. J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathol.* **33**: 1179-1183.

- Rowbotham, T. J. 1983. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J. Clin. Pathol.* **36**: 978-986.
- Rzedowski, J. 1978. Vegetación del Estado de San Luis Potosí. *Acta Científica Potosina* **5**: 1-291 pp.
- Sadaka, H. A., el-Nassery, S. F., Samra, L. M. y Awadalla, H. N. 1994. Isolation and identification of free-living amoeba from some water source in Alexandria. *J. Egypt Soc. Parasitol.* **24**: 247-257.
- Sawyer, T. K., Visvesvara, G. S., y Harke, B. A. 1977. Pathogenic amoebas from brackish and oceans sediments, with a description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. *Science* **196**: 1324-1325.
- Scaglia, M., Strosselli, M., Grazioli, V., Gatti, S., Bernuzzi, M. y De Jonckheere, J. F. 1983. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria australiensis* (Amoebida, Vahlkampfiidae) from a spa in northern Italy. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**: 1282-1285.
- Schardinger, . 1899. Entwicklungskreis einer *Amoeba lobosa*: *Amoeba gruber*. *Sitzber. Akad. Wiss (Wien) Math. Natur. Abt. J.* **108**: 713-734
- Schoeman, C. J., van der Vyver, A. F. y Visvesvara, G. S. 1993. Primary amoebic meningo-encephalitis in southern Africa. *J. Infect.* **26**: 211-214.
- Schuster, F. L. y Mandel, N. 1984. Phenothiazine compounds inhibit *in vitro* growth of pathogenic free-living amoebae. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **25**: 109-112.
- SEDUE. 1989. *Diario Oficial de la Federación*. Criterios Ecológicos de la Calidad del Agua NOM. CEE-CCA-001/89, México. **435**: 23-29.
- Seidel, J. S., Harmatz, P., Visvesvara, G. S., Cohen, A., Edwards, J. y Turner, J. 1982. Successful treatment of primary amoebic meningoencephalitis. *New Engl. J. Med.* **306**: 346-348.
- Sharon, N. y Lis, H. 1987. A century of lectine research (1888-1988). *Trends Biochem. Sci.* **12**: 488-491.
- Singh, B. N. 1952. Nuclear division in nine species of small free-living amoebae and its bearing on the classification of the order Amoebida. *Philosoph. Trans. Roy. Soc. Lond.* **236**: 405-461.

- Singh, B. N. 1985. Culturing Soil Protozoa and Estimating their Numbers in Soil. In: *Protocols in Protozoology*. Editor Kevan, D. K. McE. Butterworths, Londres. 403-411.
- Singh, B. N. y Das, S. R. 1970. Studies on pathogenic and non-pathogenic small free living amoebae and the bearing of nuclear division on the classification of the order Amoebida. *Philosoph. Trans. Roy. Soc. Lond.* 259: 435-476.
- Singh, B. N. y Hanumaiah, V. 1979. Studies on pathogenic and non-pathogenic amoebae and the bearing of nuclear division and locomotive form and behaviour on the classification of the order Amoebida. Monografía No. 1. Association of Microbiologist of India. *Ind. J. Microbiol.* 1: 1-80.
- Skocil, V., Červa, L. y Serbus, C. 1970. Epidemiological study of amoebas of the limax group in military communities. first reports. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 14: 61-70.
- Skocil, V., Dvorak, R., Sterba, J., Slajs, J., Serbus, C. y Červa, L. 1972. Epidemiological study of the incidence of amoebas of the limax group in military communities. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* 16: 101-106.
- SPP-INEGI. 1985. *Síntesis Geográfica de San Luis Potosí*. México. 128 pp.
- Sykora, J. L. Keleti, G. y Martinez, J. 1983. Occurrence and pathogenicity of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 974-979.
- Stevens, A. R., De jonckheere, J. y Willaert, E. 1980. *Naegleria lovaniensis* new species: Isolation and identification of six thermophilic strains of a new species found in association with *Naegleria fowleri*. *Int. J. Parasitol.* 10: 51-61.
- Tamayo, J. G., González, J. E. y Martínez, A. J. 1980. Meningoencefalitis amibiana primaria y encefalitis granulomatosa arribiana. *Acta Médica Venezolana* 27: 84-91.
- Taratuto, A. L., Monges, J. Acefe, J. C., Meli, F., Paredes, A. y Martínez, A. J. 1991. Leptomyxid amoebae encephalitis: report of the first case in Argentina. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 77.

- Thong, Y. H. y Ferrante, A. 1987. Experimental pharmacology. In *Infectious Diseases. 1. Amphizoic Amoebae Human Pathology*. Ed. por Rondanelli, E. G. Piccin Nuova Libreria, Padua, Italia. 279 pp.
- Toney, M. D. y Marciano-Cabral, F. 1992. Alterations in protein expression and complement resistance of pathogenic *Naegleria* amoebae. *Infect. Immunity*. 60: 2784-2790.
- Toney, M. D. y Marciano-Cabral, F. 1994. Modulation of complement resistance and virulence of *Naegleria fowleri* amoebae by alterations in growth media. *J. Euk. Microbiol.* 41: 337-343.
- Torsvik, V. 1995. Cell extraction method. In: *Molecular Microbial Ecology Manual*. Editado por Akkermans, A. D. L., Elsas, J. D. y Bruijn, F. J. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam: 1-15.
- Tyndall, R. L., Ironside, K. S., Metler, P. L. Tan, E. L., Hazen, T. C. y Fliermans, C. B. 1989. Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic *Naegleria fowleri* in a newly created cooling lake. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 722-732.
- Valenzuela, G., López-Corella, E. y De Jonckheere, J. F. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 558-559.
- Victoria, E. J. y Korn, E. D. 1975. Plasma membrane and soluble lysophospholipases of *Acanthamoeba culbertsoni*. *Arch. Biochem. Biophys.* 171: 255-258.
- Visvesvara, G. S., Mirra, S. S., Brandt, F. H., Moss, D. M., Mathews, H. M. y Martínez, A. J. 1983. Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol.* 18: 1405-1412.
- Visvesvara, G. S., Martínez A. J., Schuster, G. J., Wallace, S. V., Sawyer, T. K. y Anderson, M. 1990. Leptomyxid ameba, a new agent of amoebic meningoencephalitis in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2750-2756.
- Visvesvara, G. S., Schuster, F. L. y Martínez, J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. sp., Agent of amoebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.* 40: 504-514.

- Vodkin, H. M., Howe, K. D., Visvesvara, G. S. y McLaughlin, L. G. 1992. Identification of *Acanthamoeba* at the generic and specific levels using the polymerase chain reaction. *J. Protozool.* 39: 378-385.
- Wadowsky, R. M., Wilson, T. M., Kapp, N. J., West, A. J., Kuchta, J. M., States, S. J., Dowling, J. N. y Yee, R. B. 1991 Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1950-1957.
- Wang, A., Kay, R., Poon, W. S. y Ng, H. k. 1993. Successful treatment of amoebic meningoencephalitis in a Chinese living in Hong Kong. *J. Clin. Neurol. Neurosurg.* 95: 249-252.
- Wang, S. S. y Feldman, H. A. 1967. Isolation of *Hartmannella* species from human throats. *N. Engl. J. Med.* 277: 1174-1179.
- Wellings, F. M., Amuso, S. L. y A. L. Lewis. 1977. Isolation and identification of pathogenic *Naegleria* from Florida lakes. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 661-667.
- Wellings, F. M., Amuso, S. L., Lewis, A. L., Farmelo, M. J., Moody, D. J. y Osikowicz, C. L. 1979. *Pathogenic Naegleria, Distribution in Nature*. Publicación de la Environmental Protection Agency, Cincinnati, EPA/600/1-79-018.
- Wiley, C. A., Safrin, R. E., Davis, C. E., Lampert, P. W., Braude, A. I., Martinez, A. J. y Visvesvara, G. S. 1987. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in a patient with AIDS. *J. Inf. Dis.* 155: 130-133.
- Willaert, E. y D. Le Ray. 1973. Caractères morphologiques, biologiques et immunochimiques de *Naegleria jadini* sp. nov. (*Amoebida, Vahlkampfiidae*). *Protistologica* 9: 417-426.
- Wong, M. M., Karr, S. L. y Balamuth, W. B. 1975. Experimental infections with pathogenic free-living amoebae in laboratory primate hosts: I. (A) A study on susceptibility to *Naegleria fowleri*. *J. Parasitol.* 61: 199-208.
- Wong, M. M., Karr, S. L. y Chow, C. K. 1977. Changes in the virulence of *Naegleria fowleri* maintained *in vitro*. *J. Parasitol.* 63: 872-878.
- Woodworth, T. W., Keefe, W. E. y Bradley, S. G. 1982. Characterization of the proteins of *Naegleria fowleri*: relationships between subunit size and charge. *J. Protozool.*, 29: 246-251.

- Yaguita, K. y Endo, T. 1990. Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. *J. Protozool.* **37**: 570-575.
- Young, J. D. E. y Lowrey, D. M. 1989. Biochemical and functional characterization of a membrane-associated pore-forming protein from the pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. *J. Biol. Chem.* **264**: 1077-1083.

XI. ANEXOS

ANEXO 1

**UBICACIÓN TAXONÓMICA Y DESCRIPCIÓN DE
LAS AVL ENCONTRADAS EN LA HUASTECA
POTOSINA**

UBICACIÓN TAXONÓMICA DE LAS AVL

TABLA A1. Ubicación taxonómica de las amibas de vida libre encontradas en la Huasteca Potosina (Tomada de Lee *et al.*, 1985).

Reino:	Protista Haeckel, 1866
Subreino:	Protozoa Goldfuss, 1818; emend. von Siebold, 1846
Phylum:	Sarcomastigophora Honigberg y Balamuth, 1963
Subphylum:	Sarcodina Schmarda, 1871
Superclase:	Rhizopodea von Siebold, 1845
Clase:	Lobosea Carpenter, 1861
Subclase:	Gymnamoebia Haeckel, 1862
Orden:	Amoebida Kent, 1880
Suborden:	Tubulina Bovee y Jahn, 1966
Familia:	Hartmannellidae Volkonsky, 1931; emend. Page, 1974
Género:	<i>Hartmannella</i> Alexejeff, 1912; emend. Page, 1974
Suborden:	Acanthapodina Page, 1976
Familia:	Acanthamoebidae Sawyer y Griffin, 1975
Género:	<i>Acanthamoeba</i> Volkonsky, 1931; emend. Page, 1967
Familia:	Echinamoebidae Page, 1975
Género:	<i>Echinamoeba</i> Page, 1975
Orden:	Schizopyrenida Singh, 1952
Familia:	Vahlkampfiidae Jollos, 1917; Zulueta, 1917
Género:	<i>Naegleria</i> Alexeiff, 1912; emend. Calkins, 1913
Género:	<i>Vahlkampfia</i> Chaton y Lalung-Bonnaire, 1912; emend. Page, 1967
Género:	<i>Willaertia</i> De Joncheere, Dive, Pussard y Vickerman, 1984

DESCRIPCIÓN DE LAS AVL ENCONTRADAS EN LA HUASTECA POTOSINA.

Género *Hartmannella*

Las amibas del género *Hartmannella* son organismos que tienen un trofozoito alargado y monopodial, su forma es "limax" y se desplazan por suaves movimientos de extensión del pseudópodo anterior redondeado. Los quistes son esféricos con paredes simples y no muestran una fase flagelar (Fig. A1).

Hartmannella vermiformis Page, 1967.

Cubierta hialina siempre presente; longitud del trofozoito de 12-37 μm ; diámetro promedio del núcleo de 2.1-4.1 μm ; quistes esféricos o ligeramente ovoides con 4.0-9.5 μm de diámetro; estructuras superficiales en forma de cáliz.

Género *Acanthamoeba*

Los trofozoitos de las amibas del género *Acanthamoeba* son irregulares y algo aplanados, y se desplazan por acantópodos cortos y muy finos que son producidos desde los bordes anteriores del lobópodo. Los quistes tienen en promedio más de 18 μm y siempre tienen una pared doble la cual es un distintivo para la separación de especies. El ectoquiste generalmente es ondulado; el endoquiste es redondo, angular o estrellado y tiene varios poros para el exquistamiento en los bordes angulados. *Acanthamoeba* no presenta una fase flagelar (Fig. A2).

Acanthamoeba hatchetti Sawyer, Visvesvara y Harke, 1977.

Endoquiste con tres o cuatro brazos; el diámetro promedio del quiste es de 13 μm .

Acanthamoeba lenticulata Molet y Ermolieff-Braun, 1976.

Endoquiste circular; el ectoquiste algunas veces es delgado y ligeramente ondulado, algunas veces grueso y doblado formando una capa en forma de dientes aserrados alrededor de todo el quiste; el número promedio de poros es de 4-6; el diámetro promedio de los quistes es de 11-13 μm .

Acanthamoeba polyphaga Puschkarew, 1913.

Una pequeña porción de los quistes son reticulados; el endoquiste es muy irregular y prácticamente nunca es estrellado; el ectoquiste está menos marcadamente doblado que en *A. castellanii* o *A. mauritaniensis*, es delgado y está ampliamente separado del endoquiste; el número promedio de las esquinas del endoquiste es de 5-6; el diámetro medio del quiste es de 14 μm .

Acanthamoeba quina Pussard y Pons, 1977.

Endoquiste esférico, ovoide, algunas veces cuadrangular, pentagonal o piriforme; ectoquiste delgado, íntimamente cercano al endoquiste; número medio de brazos del endoquiste 4 o 5; diámetro promedio del quiste es de 12 μm .

Género *Echinamoeba*

Estas amibas pequeñas se parecen a las mixamebas más que a cualquier otra gimnameba. Las amibas de este género son generalmente triangulares, alargadas o irregulares, su longitud promedio no es de más de 15 μm , por lo general tienen unos cuantos y muy finos pseudópodos (equinópodos) de alrededor de 1-1.5 μm de largo; los quistes son esféricos de pared delgada y nunca sobrepasan los 10 μm de diámetro siendo generalmente menores (Fig. A3).

Echinamoeba exudans Page, 1967.

Amiba expandida con forma de abanico o elongada, forma casi limax, con una terminación anterior irregular, longitud de 7-22 μm ; núcleo con un diámetro promedio de 2.1-2.8 μm , con un nucleolo relativamente pequeño de 0.5 μm de diámetro; la pared del quiste generalmente no se separa en dos capas, diámetro de quiste 3.8-8.4 μm .

Echinamoeba silvestris Page, 1975.

Amiba generalmente con una forma triangular, ensanchada o espatulada, longitud de 6.5-21 μm ; núcleo con un diámetro promedio de 2-2.8 μm , con diámetro nucleolar de alrededor de la mitad del núcleo; espacio muy estrecho entre las capas externa e interna de la pared del quiste, diámetro del quiste de 5.5-10 μm .

Género Naegleria

Las amibas del género *Naegleria* presentan un trofozoito de tamaño variable de 15-28 μm . El desplazamiento es muy rápido en todas las especies de *Naegleria* por la formación de lobópodos eruptivos hialinos.

El quiste de las amibas del género *Naegleria* tiene forma esférica y varía de tamaño de 8.4-22.9 μm con una medida promedio de 15.6 μm . En observaciones al microscopio de contraste de fases son fácilmente visibles uno o varios poros sobre la pared del quiste, los cuales son más conspicuos en quistes vacíos que en quistes maduros o prequistes.

Una característica notable del género es una fase temporal ameboflagelar, que es aparente cuando las amibas son puestas en contacto con agua destilada a 37 °C, después de 60-90 minutos, se forman de uno a dos flagelos en uno de los extremos del trofozoito de *Naegleria* y el desplazamiento de la amiba por el movimiento flagelar se acelera (Fig. A4A).

Naegleria australiensis De Jonckheere, 1981.

Su diámetro del quiste es en promedio de 11.6 μm . Se aglutina con concanavalina A.

Naegleria fowleri Carter, 1970.

El diámetro del quiste está en el ámbito de 7-15 μm . El collar de los poros del quiste no es notablemente grueso.

Naegleria gruberi Schardinger, 1899.

Diámetro del quiste es de 10-16 μm . Morfología del quiste variable. Los poros del quiste con un grueso anillo sobresaliente; la pared del quiste puede ser lisa, áspera o angular.

Naegleria lovaniensis Stevens, De Jonckheere y Willaert, 1980.

El diámetro del quiste es de 9.6-13 μm . El collar de los poros del quiste es ligeramente grueso. El núcleo está envuelto en retículo endoplásmico rugoso.

Género *Vahlkampfia*

Los quistes de este género carecen de poros para el exquistamiento; gránulos perinucleares ausentes o irregulares en forma y tamaño; la separación de las paredes varía con las especies. No existe una fase flagelar. Puede haber pigmentación en algunas especies (Fig. A4B).

Vahlkampfia inornata Page, 1967.

Quiste comúnmente circular u oval pero también reniforme, con una delgada, y algunas veces pegajosa cubierta externa, con un diámetro promedio de 8.6-13.2 μm ; amibas comúnmente con unos pocos filamentos uroidales, con una longitud promedio de 18.5-36.5 μm ; núcleo 3.4-4.5 μm ; masas polares compactas, no fragmentadas.

Género *Willaertia*

Los representantes de este género tienen el endoquiste y el exoquiste poco unidos, con poros de exquistamiento muy aparentes que salen desde la pared del endoquiste; los trofozoitos tienen una sola capa uniforme de gránulos perinucleares que se pierde durante la maduración del quiste. Es aparente un estado flagelar formándose cuatro flagelos, durante esta fase la forma es ovalada y se pierden los citostomas pero son capaces de un limitado número de divisiones (Fig. A4C).

Willaertia magna De Jonckheere, Dive, Pussard y Vickerman, 1984.

Amiba de hasta 100 μm de longitud (con núcleos supernumerarios), más frecuentemente de 50 μm o menos, filamentos uroidales prominentes; usualmente presenta una capa de glóbulos perinucleares; diámetro nuclear de 4-7.5 μm ; flagelados de 19-30 μm de largo; quistes con la pared interna gruesa, capa externa delicada, esférica o poligonal dependiendo de las condiciones del cultivo, con una medida promedio de 18-28 μm .

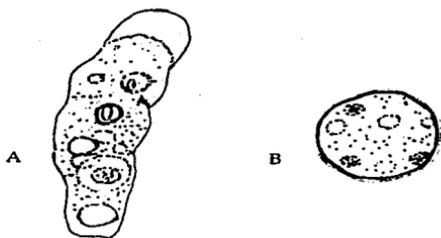


Figura A1. *Hartmannella*. A, trofozolto forma "limax", mótil; B, quiste.

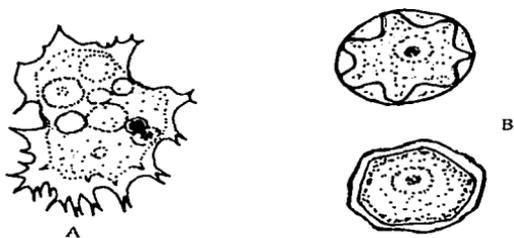


Figura A2. *Acanthamoeba*. A, trofozolto; B, quistes.

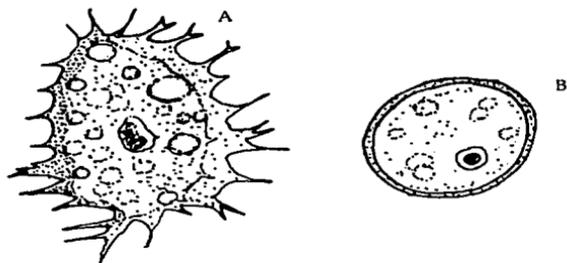


Figura A3. *Echinamoeba*. A, trofozoito; B, quiste.

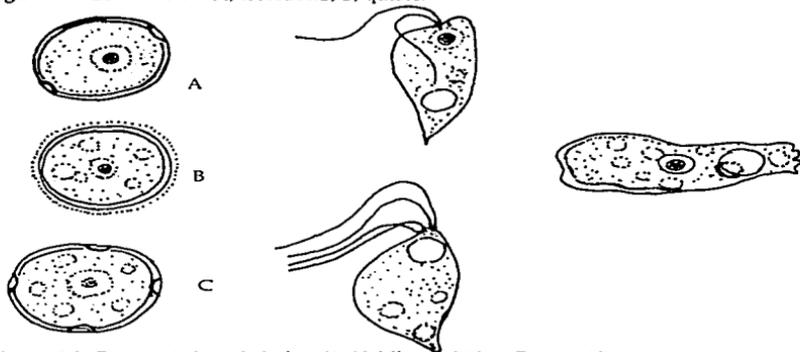


Figura A4. Características de la familia Vahlkampfiidae. Fases trófica, quística y flagelada. A, *Naegleria*; B, *Vahlkampfia* (sin fase flagelar); C, *Willaertia*.

ANEXO 2

FACTORES AMBIENTALES (RESULTADOS)

FACTORES AMBIENTALES

TABLA A2. Parámetros ambientales medidos en los sistemas recreacionales artificiales y naturales para los 4 muestreos.

Sistemas recreacionales artificiales	Muestreo	pH	Temp. agua °C	Temp. amb. °C	OD mg/l	Conductividad µS	Cloro libre mg/l	COT ¹ mg/l	SS ¹ mg/l	SD ¹ mg/l
El Bañito	I	6.7	32.0	32.1	2.0	1350	0	nd	nd	nd
	II	7.3	31.0	27.0	1.4	1250	0	nd	nd	nd
	III	7.3	32.1	27.6	2.2	1200	0	34	15	620
	IV	6.6	31.9	32.2	2.5	1250	0	36	10	730
Taninul	I	6.4	36.3	29.3	0.7	1250	0	nd	nd	nd
	II	6.7	35.7	25.8	0.8	1450	0	nd	nd	nd
	III	6.5	37.2	24.0	1.2	1400	0	27	2	367
	IV	6.7	37.6	31.2	0.9	1500	0	25	6	406
Club Campestre²	I	7.4	31.6	33.3	4.6	1400	2	nd	nd	nd
Hotel Valles²	I	5.8	31.0	32.4	4.0	800	0	nd	nd	nd
	III	5.7	30.4	26.3	3.8	900	0	10	12	400
	IV	6.5	31.5	33.5	3.3	950	0	12	2	458
	IV	6.7	32.0	35.2	4.5	1750	8	nd	nd	nd
Piscina IMSS²	I	6.7	32.0	35.2	4.5	1750	8	nd	nd	nd
	III	6.8	26.1	20.0	2.5	900	6	6	2	250
	IV	6.9	28.0	29.1	2.8	1200	4	6	10	210
	IV	7.3	37.0	25.6	1.2	450	0	nd	nd	nd
Gogorrón	I	7.7	38.5	29.0	2.1	450	0	nd	nd	nd
	III	7.6	37.2	30.3	2.3	450	0	9	2	309
	IV	7.6	40.7	28.1	1.8	300	0	10	0	268
	IV	8.1	18.4	20.3	4.0	200	0	nd	nd	nd
Xilitlia²	I	8.0	17.3	17.1	4.5	250	0	12	28	1500
	III	8.0	17.3	17.1	4.5	250	0	12	28	1500
	IV	8.1	19.5	20.6	4.6	500	0	15	6	1499
	IV	8.1	19.5	20.6	4.6	500	0	15	6	1499
Sistemas recreacionales naturales										
Estanque Taninul²	I	6.7	34.4	29.4	3.0	1200	nd	nd	nd	nd
Tambaque	I	7.4	22.0	30.3	5.0	700	nd	nd	nd	nd
	II	7.7	24.9	25.0	5.0	1400	nd	nd	nd	nd
	III	7.3	24.0	18.2	4.2	1200	nd	26	26	1478
	IV	7.5	25.1	23.3	3.5	1100	nd	20	12	1636
Tancanhuitz	I	7.1	26.0	30.5	4.8	400	nd	nd	nd	nd
	II	8.1	19.8	25.0	4.4	350	nd	nd	nd	nd
	III	7.5	19.2	18.5	4.0	300	nd	16	2	1303
	IV	7.7	23.3	21.5	3.7	300	nd	18	20	1332

(OD) Oxígeno disuelto; (COT) Carbono orgánico total; (SS) Sólidos suspendidos; (SD) Sólidos disueltos; (ST) Sólidos totales (ST = SS+SD); (nd) no determinado.

(1) Solo se determinó en los muestreos III y IV.

(2) No se efectuaron todos los muestreos por estar la piscina en mantenimiento o por ser cuerpos de agua temporales

ANEXO 3

**MEDIOS DE CULTIVO
SOLUCIONES Y TINCIONES**

MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES

Para aislar amibas de vida libre se utilizaron placas de agar no nutritivo con una capa de bacteria *Enterobacter aerogenes* muerta. Este medio se conoce como NNE. El medio NNE proporciona las sales y la fuente de carbono, en forma de bacterias, necesarios para el sostenimiento de las amibas de vida libre. Se prepara con los componentes de la solución salina de Neff y agar bacteriológico a una concentración de 1.5 % (De Jonckheere, 1984).

Medio NNE

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

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

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

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

Medio PBSGM (Medio de Chang)

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

Medio PBSGM

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

Esta solución se envasa en tubos con tapón de rosca, vaciando en cada tubo 2.7 ml de medio. Se esterilizan los tubos con el medio a 15 lb de presión durante 15 min.

Después de esterilizado el medio y ya frío, se agrega a cada tubo 0.3 ml de suero fetal de ternera adicionado con penicilina y kanamicina a una concentración de 200 mg/ml de cada antibiótico. Los tubos se conservan en refrigeración.

Medio de Nelson para *Naegleria*

Solución de Page

MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.4 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.4 mg
Na ₂ HPO ₄	14.2 mg
KH ₂ PO ₄	13.6 mg
NaCl	12.0 mg
Agua destilada.....	100.0 ml

A la solución anterior agregar:

Infusión de hígado (Oxoid o Panmede)	0.17 g
Glucosa	0.17 g

Vaciar 4.5 ml en tubos con tapón de rosca de 16 X 125 mm. Esterilizar en autoclave por 25 min a 121 °C. Enfriar y asépticamente agregar 0.5 ml de suero fetal por tubo (concentración final de 10 % de suero) antes de utilizar.

Medio modificado PYNFH

Solución 1

Peptona Difco #3	10.0 g
Extracto de levadura Difco	10.0 g
Acido nucleico de levadura	
Sigma (almacenar a -20 °C)	1.0 g
D-Glucosa	1.0 g
Acido fólico	15 mg
Solución de Hemina	0.5 ml
KH ₂ PO ₄	0.362 g
Na ₂ HPO ₄	0.5 g
Agua destilada	900 ml

Si es necesario ajustar a pH de 6.9 y esterilizar a 121 °C por 15 min y almacenar a 4 °C.

Solución de Hemina

Hemina	200 mg
Trietanolamina	100 ml

Almacenar a 4 °C.

Medio Completo

Solución 1 900 ml

Suero fetal de bovino	100 ml
Penicilina (100 000 U/ml)	1 ml
Estreptomicina (100 000 U/ml)	1ml

Almacenar a 4 °C.

354 Medio para *Acanthamoeba*

Proteosa peptona.....	15.0 g
Glucosa	15.0 g
KH ₂ PO ₄	0.3 g
Vitamina B12.....	1.0 µg
Biotina	200.0 µg
Tiamina.....	1.0 mg
L-Metionina.....	14.9 mg
Solución salina (ver abajo).....	1.0 ml
Agua destilada.....	1.0 l

Solución salina

CaCl ₂ .2H ₂ O	0.15 g
FeCl ₃	0.02 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	2.46 g
Agua destilada.....	100.0 ml

Ajustar el pH a 5.5. El medio puede ser preparado libre de partículas por filtración o centrifugación a alta velocidad previo a la esterilización en autoclave. Utilizar 5.0 ml por cada tubo de tapón de rosca de 16 X 125 mm.

711 PYb

Proteosa peptona.....	1.0 g
Extracto de levadura.....	1.0 g
Agua destilada.....	900ml

Preparar y esterilizar separadamente cada una de las siguientes soluciones patrón y agregue al medio basal como se indica abajo para evitar precipitación (Preparar un volumen final de 1.0 l)

Soluciones patrón:

0.05 M CaCl ₂	4.0 ml
0.4 M MgSO ₄ .7 H ₂ O	2.5 ml
0.25 M Na ₂ HPO ₄	8.0 ml
0.25 M KH ₂ PO ₄	32.0 ml

El pH deber de ser 6.5. Esterilizar 25 min a 121 °C.

902 Medio axénico de Schuster para *Naegleria*

Extracto de levadura.....	2.5 g
Peptona.....	2.5 g
Concentrado de hígado Oxoid al 5 %	100 ml
Na ₂ HPO ₄ (0.05 M)	60.0 ml
KH ₂ PO ₄ (0.05 M).....	40.0 ml
Agua destilada cbp	1.0 l

Preparar el concentrado de hígado en agua destilada, filtrar o centrifugar a alta velocidad para remover el sedimento y esterilizar durante 25 min a 121 °C. Agregar el concentrado de hígado filtrado al medio al momento de su preparación. Agregar suero de bovino antes de utilizar el medio.

997 Medio para amibas de agua dulce

Extracto de malta	0.1 g
Extracto de levadura.....	0.1 g
Bacto agar.....	10.0 g
Agua destilada.....	1.0 l

1029 Medio LIT

Caldo infusión de hígado.....	9.0 g
Triptosa.....	5.0 g
NaCl	1.0 g
Na ₂ HPO ₄	8.0 g
KCl.....	0.4 g
Glucosa	1.0 g
Suero fetal de bovino.....	100.0 ml
Hemina	10.0 mg
Agua destilada q.b.p.....	1.0 l

Ajustar el pH a 7.2 y esterilizar por filtración Seitz. Vaciar aseptícamente en alícuotas de 5.0 ml en tubos de tapón de rosca de 16 X 125 mm.

1152 Medio EG

Acetato de sodio.....	1.0 g
Extracto de carne.....	1.0 g
Triptona.....	2.0 g
Extracto de levadura.....	2.0 g
CaCl ₂	0.01 g
Agua destilada.....	1.0 l
Esterilizar por 20 min. a 121 °C.	

TINCIONES

Tinción Tricrómica (modificada por Cerva, L. com. pers.)

Hematoxilina de Gómori

Cromótopo 2R.....	0.6 g
Verde rápido FCF.....	0.3 g
Ácido fosfowolfrámico.....	0.6 g
Ácido acético.....	1.0 ml
Agua destilada.....	100 ml

Hematoxilina de Koolovsek

Hematoxilina.....	0.2 g
Sulfato de aluminio y potasio.....	5.0 g
Quelaton III.....	0.1 g
(no esencial)	
Peryodato de sodio.....	20 mg
Agua destilada.....	100 ml

Alcohol sublimado

HgCl ₂	40 g
NaCl.....	50 g
Alcohol 50%.....	1000 ml

Carbonato de litio al 1%

Alcohol

Alcohol etílico 96%.....99.0 ml
Ácido acético.....1.0 ml

Proceso de fijación

Se lava 1 placa con amibas en buen crecimiento con 5 ml de agua destilada.

Se hace el arrastre de este lavado de amibas con un asa acodada.

Se marcan los portaobjetos con un círculo de cera donde se va a poner el concentrado de amibas.

Con un bulbo unido a una pipeta Pasteur de punta alargada se toma el lavado de las cajas y se vacía en un tubo de ensaye con tapón de rosca. Centrifugar a 2 000 rpm durante 10 min.

Se desecha el sobrenadante y se toman 3 gotas de la pastilla que se ha sedimentado en el tubo para colocarlas en el portaobjetos ya marcado con la cera.

Se ponen los portaobjetos en cámaras húmedas (cajas Petri con agua destilada).

Estas cámaras se incuban a la temperatura óptima a la que crece la amiba, durante 30 min con el objeto de que las amibas se adhieran al cristal. Ver al microscopio inmediatamente al sacarlas de la incubadora.

Se sumerge lo más pronto posible en el alcohol sublimado, debido a que las amibas se pueden separar del vidrio. Se mantiene la muestra sumergida de 1 a 2 h. En este paso se lleva a cabo la coagulación de las proteínas.

Se hace el cambio de las muestras a alcohol al 80 %, y se deja durante toda la noche.

NOTA: Las preparaciones no se deben dejar secar. Al día siguiente se hace un cambio a agua destilada para enjuagar.

Proceso de tinción

La muestra se sumerge en hematoxilina de Koolovsek no más de 30 seg.

Se enjuaga con agua alcalina. (Unas gotas de NaOH 0.1 N en agua destilada con el objeto de que la hematoxilina vire de rojo a azul).

Se enjuaga con agua de la llave abundantemente.

Se le pone la solución de Gómori (Mezcla Tricrómica) durante 10 min

Se enjuaga rápidamente en la mezcla de solución ácido-acético-alcohol para quitar el exceso de solución de Gómori.

Se sumerge la muestra en etanol al 96 % 10 veces.

En otro recipiente con alcohol se vuelve a sumergir la muestra 10 veces (sacando y metiendo). Esto se hace con el objeto de deshidratar la preparación.

Finalmente se sumerge en el xilol durante 5 min.

ANEXO 4

**ISOENZIMAS
(TÉCNICAS Y ZIMOGRAMAS)**

TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE ISOENZIMAS

Preparación de los concentrados de amibas para isoelectroenfoque

Cultivar las amibas en botellas para cultivo de tejidos de 25 cm³ con 10-15 ml de medio Chang por tres días a 30 °C o hasta observar una monocapa de trofozoitos, lo cual debe de representar alrededor de 10⁶ células por ml.

Cosechar las amibas poniendo las botellas durante 3 min a una temperatura de -20 °C teniendo cuidado que el medio no se congele, o las células serán lisadas. Se agitan vigorosamente las botellas y el medio se vacía en tubos de centrífuga de polipropileno de 15 ml. Las células amibianas se concentran por centrifugación a 2000 rpm durante 10 min y se desecha cuidadosamente el sobrenadante.

La pastilla de células se resuspende con agua destilada y se transfiere a tubos de microcentrífuga de 2 ml. y se concentra nuevamente a 3000 rpm por 10 min. Se tira con cuidado el sobrenadante, cuidando que la pastilla no se altere.

Se agregan 10 µl de Tritón X-100 y la muestra se congela y descongela 2 veces a -20 °C para lisar las células y liberar su contenido. Si este concentrado no va a ser utilizado inmediatamente se puede guardar hasta 1 mes a -75°C o en nitrógeno líquido. Se ha probado la efectividad de este procedimiento para lisar completamente las células de amibas, sin embargo, una alternativa es someter las a las células concentradas en la pastilla a lisis por sonicación utilizando 4 pulsos al 30% y a 15-20 watts.

Para utilizar los concentrados en isoelectroenfoque, se descongelan las muestras a 37 °C utilizando 25 µl y congelando inmediatamente, no se recomienda descongelar más de 3 veces ya que las enzimas pierden actividad y las marcas de los zimogramas pueden aparecer muy claras o no ser visibles (De Jonckheere, 1984; Robinson *et al.*, 1992).

Proceso de Isoelectroenfoque (IEF)

Se utilizó el procedimiento para la identificación de especies de amibas por isoenzimas separadas en geles de agarosa por isoelectroenfoque enzimático descrito por De Jonckheere(1984) y por Robinson *et al.*, (1992) y que se detalla abajo:

Disolver en baño de agua hirviendo la solución de agarosa en un matraz earlenmeyer de 50 ml. Con 30 ml de solución se puede formar un gel de 11 x 225 mm que contenga:

0.3 g de agarosa IEF
3.6 g de sorbitol
27 ml de agua destilada

Mientras se disuelve la agarosa, se prepara el molde.

- Se ajusta una tabla de nivelación que debe estar horizontal.
- Vaciar 2 ml de agua destilada en la mitad de la placa de nivelación.
- Colocar una hoja de película Gel Bond para geles de agarosa de 114 x 225 mm sobre la placa de nivelación con la superficie hidrofóbica hacia arriba.
- Con un rodillo se hace presión sobre la película y contra la placa de nivelación para quitar el exceso de humedad y las burbujas que se pudieran haber formado bajo del gel. Se seca la película y sus orillas con papel absorbente suave.
- Se coloca el marco de acrílico sobre la película y se sujeta con grapas para formar un molde.

Cuando la agarosa se disuelve completamente, se deja enfriar hasta 75 °C. Se agrega el anfolito (1.9 ml), se mezcla suavemente evitando formar burbujas y se vacía rápida y de manera uniforme dentro del molde, dejando gelificar la solución por 10-15 min. Se retira el marco de acrílico de la tabla niveladora cuidando de no dañar el gel y se deja que la agarosa gelifique completamente 1 h a 4 °C.

Pipetear 2 ml de agua destilada sobre la placa de enfriamiento de la unidad de electroforesis, colocar arriba la película con el gel asegurándose de que el agua se extienda en una delgada película sin burbujas bajo del gel. Quitar el exceso de agua con toallas de papel absorbente.

Sumergir los electrodos de 6 x 10 x 225 mm en las soluciones del ánodo (H_2SO_4 0.05 M) y del cátodo (NaOH 1 M) respectivamente. Secar los electrodos colocándolos sobre papel filtro por 1 minuto para quitar el exceso de líquido (los electrodos no deben gotear) y luego colocarlos sobre el gel aproximadamente a 1 mm de los extremos.

Aplicar 25 μl de cada una de las muestras utilizando los papeles aplicadores de muestra de 10 x 5 mm.

Colocar la tapa del equipo de electroforesis de cama plana FBE 3000 (Pharmacia Fine Chemicals) y revisar que haya buen contacto entre los electrodos de la tapa y los electrodos colocados sobre el gel.

Ajustar la fuente de poder ECPS 3000/150 (Pharmacia Fine Chemicals) a 15W, 1500V y corriente ilimitada.

Quitar los aplicadores de muestra después de 45 min.

Después de otros 45 min apagar el equipo, levantar la tapa y quitar los electrodos del gel.

Colocar el gel en la solución reveladora de enzima a 37 °C durante 30-60 min.

Secar el gel colocándole varias hojas de papel secante arriba, seguido de una placa de vidrio de tamaño adecuado y un peso de alrededor de 1 Kg para ayudar al secado. Después de 15 min, se quitan los papeles y se termina con una secadora de pelo hasta que el gel quede completamente seco.

REVELADO DE ENZIMAS

Fosfatasa ácida (FA)

Fosfato ácido de Na- β -naftil	100 mg
Sal negra K	100 mg
Amortiguado de acetato 0.05 M pH 5.0	100 ml

Leucin aminopeptidasa (LAP)

β -leucin- β -naftilamida	40 mg
Sal negra K	50 mg
Amortiguador Tris-maleato 0.2 M pH 6.0	100 ml

Propionil esterasa (PE)

Sal RR de azul rápido	100 mg
Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 5.7	100 ml
α -naftilpropionato al 1 % (en acetona al 50 %)	2 ml
Malato deshidrogenasa (MDH)	

Na-L-malato 1 M	10 ml
β -NAD ⁺	50 mg
Nitro azul tetrazolio (NBT)	30 mg
Metasulfato de fenazina (PMS)	2 mg
NaCN 0.1 M	5 ml
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 7.1	15 ml
H ₂ O	70 ml

Alcohol deshidrogenasa (AlcDH)

Etanol (96 %)	3 ml
β -NAD ⁺	50 mg
NBT	30 mg
PMS	2 mg
NaCN 0.1 M	5 ml
Amortiguador Tris-HCl 0.5 M pH 7.1	15 ml
H ₂ O	77 ml

Glucosa fosfato isomerasa (GFI)

Fructosa-6-fosfato.....	5 mg
Amortiguador Tris-HCl 100 mM pH 8.0	2 ml
Solución stock de NADP.....	25 µl
MgCl ₂ 1.0 M	25 µl
Solución stock de MTT	25 µl
Solución stock de PMS	25 µl
Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa	5 µl

Fosfoglucomutasa (FGM)

Glucosa-1-fosfato.....	10 mg
Glucosa-1,6-difosfato.....	0.2 mg
Amortiguador Tris-HCl 100mM pH 8.0	2 ml
Solución stock de NADP.....	25 µl
MgCl ₂ 1.0 M	25 µl
Solución stock de MTT	25 µl
Solución stock de PMS	25 µl
Glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa	5 µl

SOLUCIONES STOCK

MTT 14.5 M (disolver 240 mg en 10 ml de agua destilada; almacenar a 4 °C en la oscuridad).

PMS 6.5 mM (Disolver 80 mg en 40 ml de agua destilada; almacenar a 4 °C en la oscuridad).

NADP 25 mM (Disolver 800 mg en 40 ml de agua destilada; almacenar a 4 °C).

Glucosa-6fosfato-deshidrogenasa (Disolver 1000 unidades en 1 ml. Guardar alícuotas de 0.1 ml y congelar a -80 °C. Para usar, descongele una alícuota, agregue agua destilada q.b.p. 2 ml, almacene a 4 °C).

SOLUCIONES AMORTIGUADORAS:

Amortiguador de Acetato 0.05 M pH 5.0

Solución 1

CH₃COONa..... 1.64 g
Agua destilada.....100 ml

Solución 2

CH₃COOH.....0.6 ml
Agua destilada.....100 ml

Combinar 176 ml de la solución 1 y 74 ml de la solución 2 con 250 ml de agua destilada.

Amortiguador Tris-maleato 0.2 M pH 6.0

Solución 1

Tris..... 7.26 g
Acido maléico 6.96 g
Agua destilada..... 150 ml

Solución 2

NaOH..... 1.6 g
Agua destilada.....100 ml

Combinar 125 ml de la solución 1 y 65 ml de la solución 2 con 310 ml de agua destilada.

Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 5.7

Solución 1

NaH₂PO₄..... 6.875 g
Agua destilada.....250 ml

Solución 2

Na₂HPO₄..... 2.83 g
Agua destilada..... 100 ml

Combinar 230 ml de la solución 1 y 20 ml de la solución 2 con 250 ml de Agua destilada.

Amortiguador Tris HCl 0.5 M pH 7.1

Solución 1

Tris..... 18.15 g
Agua destilada..... 150 ml

Solución 2

HCl 2.1 ml
Agua destilada..... 250 ml

Combinar 125 ml de la solución 1 y 250 ml de la solución 2 con 125 ml de agua destilada.

Amortiguador Tris HCl 100 mM pH 8.0

Trizma base 12.1 g
Agua destilada..... 1000 ml

Disolver el Trizma y ajustar el pH a 8.0 con HCl 4M.

Los esquemas de la página siguiente muestran los resultados obtenidos de los corrimientos por isoelectroenfoque para identificar a nivel de especie a las amibas de vida libre de los géneros *Naegleria*, *Hartmannella* y *Acanthamoeba*.

Figura A5. Zimograma de *Naegleria* para la enzima leucín aminopeptidasa pH 3-10

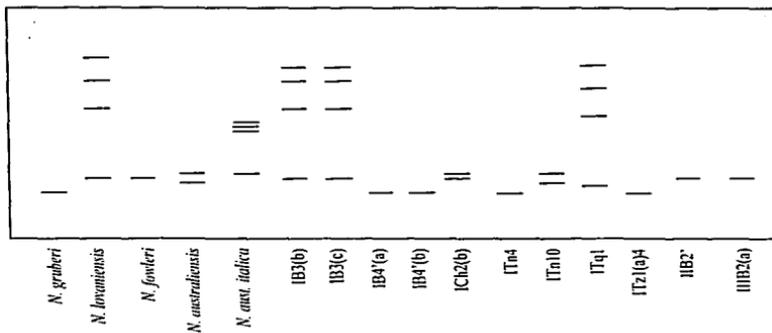


Figura A6. Zimograma de *Naegleria* para la enzima leucín aminopeptidasa pH 3-10 cont.

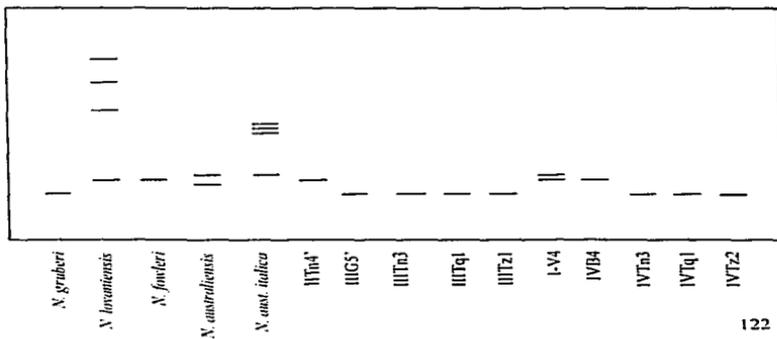


Figura A7. Zimograma de *Naegleria* para la enzima malato deshidrogenasa pH3-10

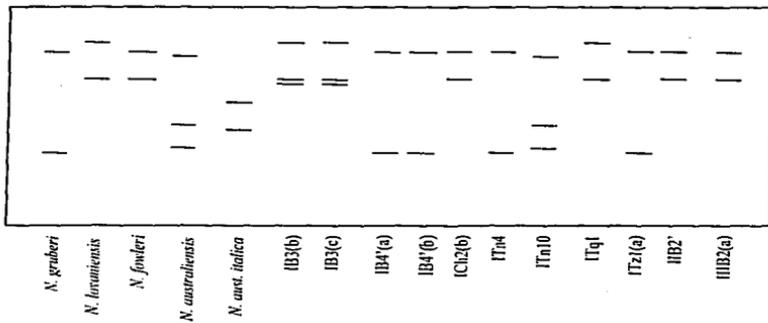


Figura A8. Zimograma de *Naegleria* para la enzima malato deshidrogenasa pH3-10

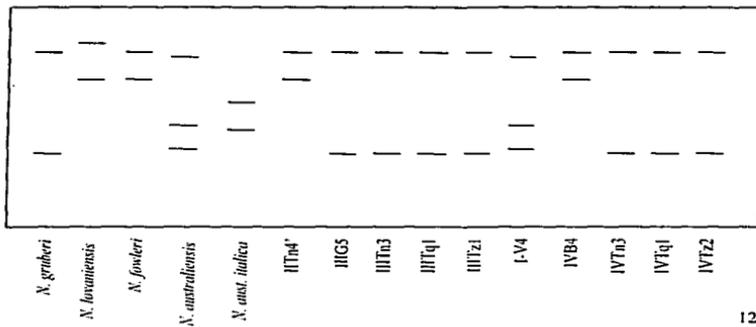


Figura A9. Zimograma de *Naegleria* para la enzima fosfatasa ácida pH 3-10

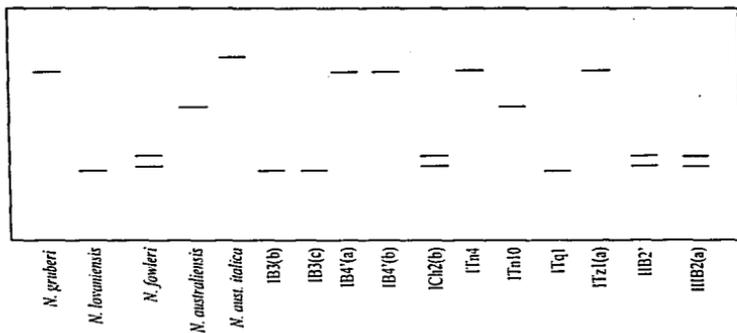


Figura A10. Zimograma de *Naegleria* para la enzima fosfatasa ácida pH 3-10

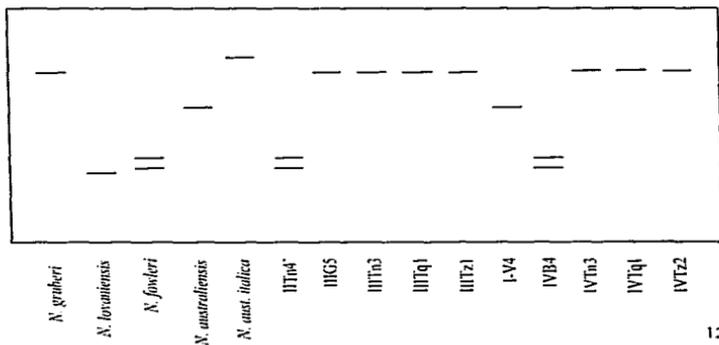


Figura A11. Zimograma de *Naegleria* para la enzima propionil esterasa pH 3-10

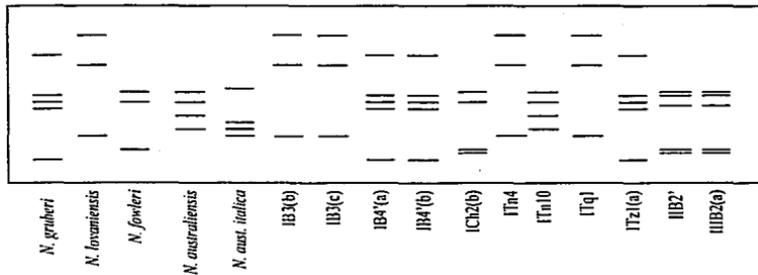


Figura A12. Zimograma de *Naegleria* para la enzima propionil esterasa pH 3-10

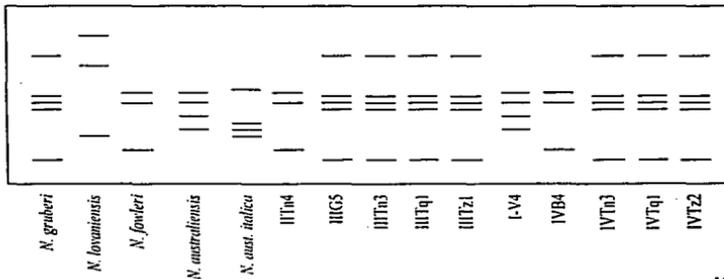


Figura A13. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima propionil esterasa pH 3-10

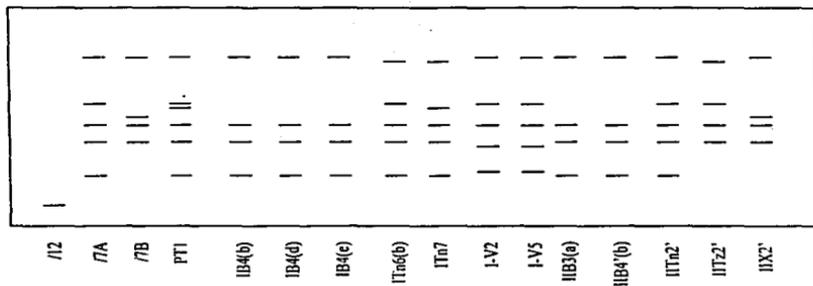


Figura A14. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima propionil esterasa pH 3-10

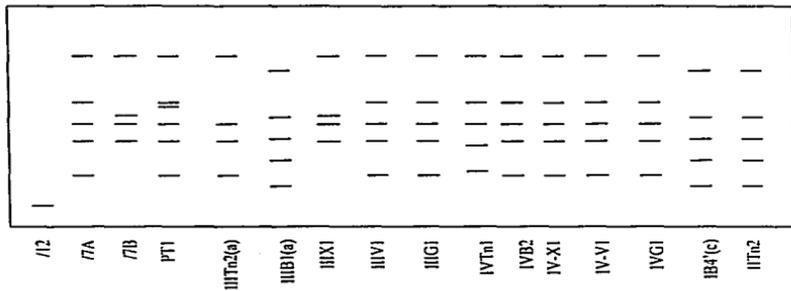


Figura A15. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima fosfatasa ácida pH 3-10

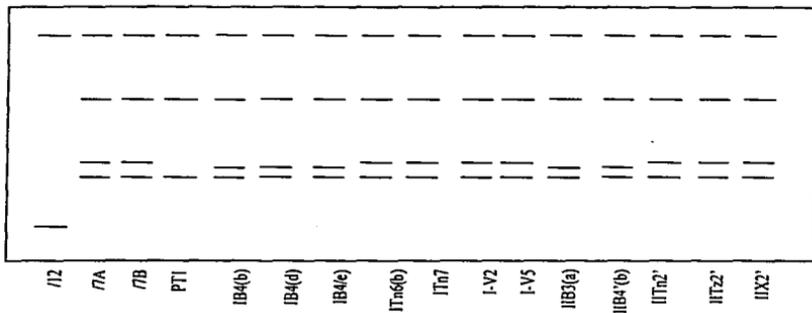


Figura A16. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima fosfatasa ácida pH 3-10

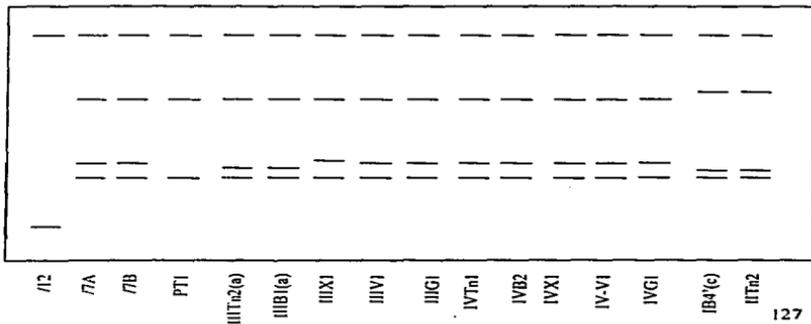


Figura A17. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima glucosa fosfato isomerasa pH 3-10

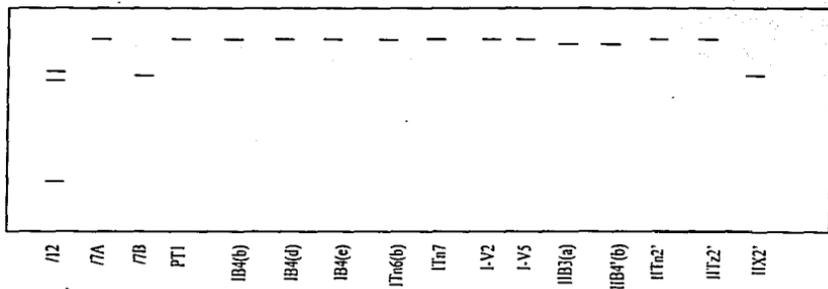


Figura A18. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima glucosa fosfato isomerasa pH 3-10

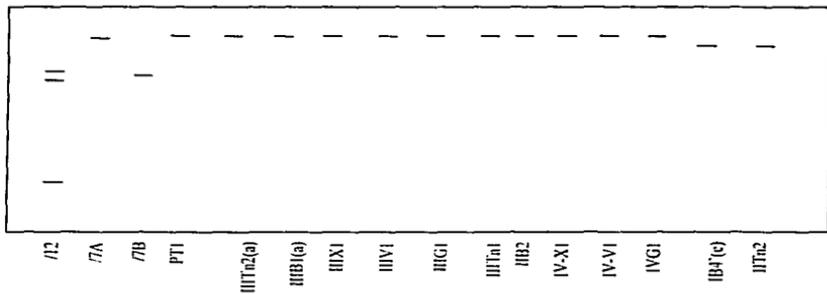


Figura A19. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima fosfoglucomutasa pH 3-10

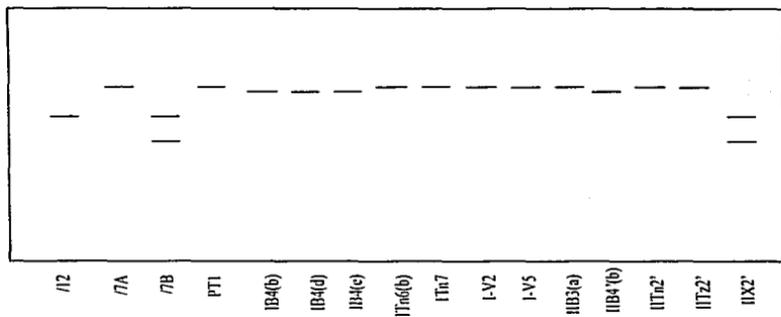


Figura A20. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima fosfoglucomutasa pH 3-10

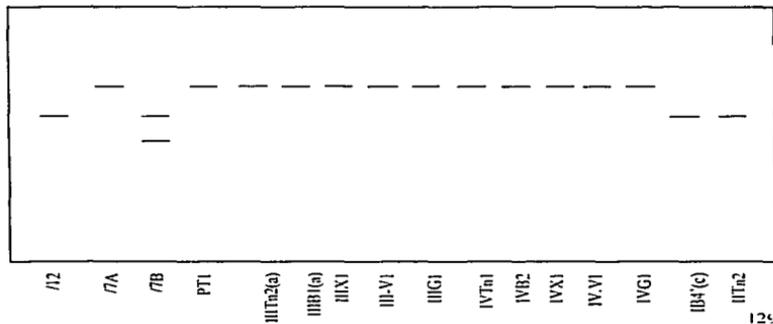


Figura A21. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima leucín aminopeptidasa pH 3-10

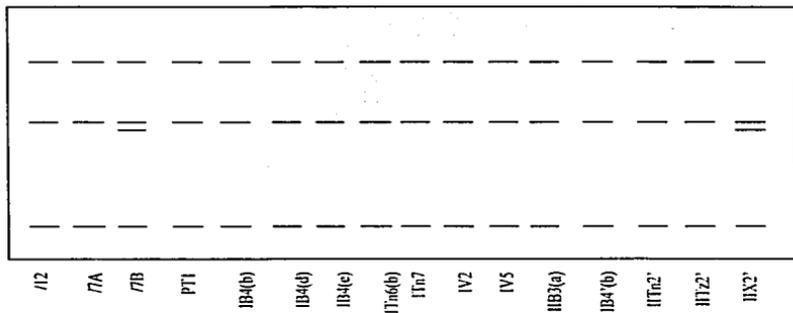


Figura A22. Zimograma de *Hartmannella* para la enzima leucín aminopeptidasa pH 3-10

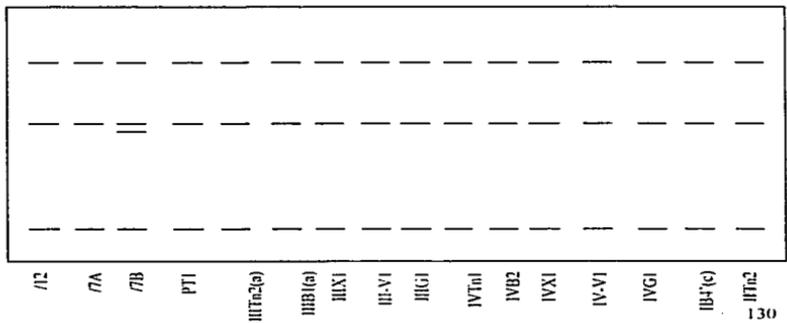


Figura A23. Zimograma de *Acanthamoeba* para la enzima propionil esterasa pH 3-10

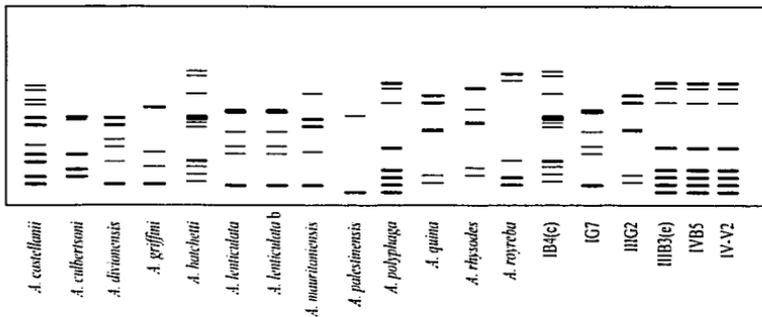


Figura A24. Zimograma de *Acanthamoeba* para la enzima fosfatasa ácida pH 3-10

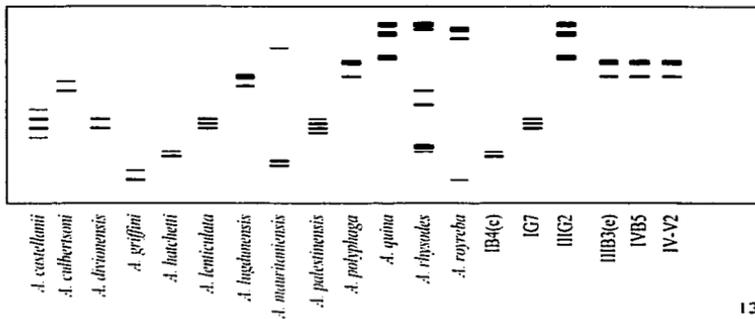


Figura A25. Zimograma de *Acanthamoeba* para la enzima malato deshidrogenasa IEF pH 3-10

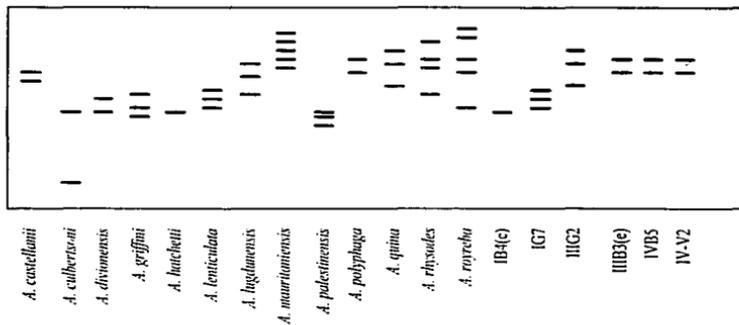


Figura A26. Zimograma de *Acanthamoeba* para la enzima alcohol deshidrogenasa pH 3-10

