

00381

-4-



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

HETEROGENEIDAD DE LAS AMIBAS DE VIDA LIBRE
CON POTENCIAL PATOGENO AISLADAS DE LA
ATMOSFERA DE LA CIUDAD DE MEXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A :
PATRICIA BONILLA LEMUS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. IRMA A. ROSAS PEREZ

MEXICO, D. F.

2000

27295A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Al maestro y amigo,
Dr. Fermín Rivera Agüero (†)
con mi agradecimiento y
eterno reconocimiento

Con agradecimiento y amor infinito a:

A mis padres: Agustín y Margarita

A mis hermanos: Alejandro, Enrique, María Elena y Ricardo

A mis cuñados: José Luis e Isabel

A mis sobrinos: Fernando, Adriana, Alejandro y Mariana

AGRADECIMIENTOS

De manera especial quiero agradecer a los Integrantes del Jurado por su tiempo, sus valiosas observaciones y sugerencias para mejorar el presente trabajo.

Integrantes del Comité Tutorial:

**Dra. Irma A. Rosas Pérez
Dra. María Antonieta Aladro Lubel
Dr. Jorge Tay Zavala**

Revisores de la tesis

**Dra. Paz María Silvia Salazar Schettino
Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez
Dra. María Esther Martínez Murillo
Dra. María del Carmen Calderón Ezquerro**

Agradezco y expreso mi amplio reconocimiento a los siguientes integrantes del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala de la UNAM, que de una manera u otra, contribuyeron a la terminación de este trabajo:

M. en C. Alfonso Lugo Vázquez, Biól. Angel Durán Díaz, Biól. Arturo Calderón Vega, Biól. Dolores Hernández Martínez, M. en C. Elizabeth Ramírez Flores, Dra. Gloria Vilaclara Fatjo, Quím. Luis Fernando González, Biól. Mario Chávez Arteaga, Dr. Miroslav Macek, Pas. de Biól. Patricia Chalico Marcial, M. en C. Pedro Ramírez García y Biól. Ricardo Ortíz Ortega.

Al Dr. Harold Schlichting por su amistad, estímulo y apoyo incondicional.

A la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE) hoy SEMARNAP, por proporcionar los datos meteorológicos.

Este trabajo contó con el apoyo del CONACyT convenio PCCCNA-051002.

CONTENIDO

	Página
Lista de abreviaturas.....	<i>i</i>
Relación de esquemas, cuadros, figuras y tablas.....	<i>ii</i>
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1. Protozoos del aire.....	5
2.2. Amibas de vida libre.....	6
2.3. Especies patógenas.....	6
a) <i>Naegleria fowleri</i>	7
b) <i>Acanthamoeba</i> spp.....	8
c) <i>Balamuthia mandrillaris</i>	9
2.4. Morfología y ciclo de vida.....	9
a) <i>Naegleria</i>	10
b) <i>Acanthamoeba</i>	11
c) <i>Balamuthia</i>	12
2.5. Infecciones en humanos.....	13
a) Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP).....	13
b) Encefalitis amibiana primaria (EAG).....	13
c) Queratitis amibiana (QA).....	14
2.6. Mecanismos de patogenicidad.....	15
2.7. Epidemiología.....	18
2.8. Ecología	21
2.9. Distribución en el ambiente.....	24
2.10. Ubicación taxonómica	25
2.11. Filogenia.....	30
2.12. Antecedentes en México.....	31

	Página
3. OBJETIVOS	34
4. ÁREA DE ESTUDIO	35
5. MATERIAL Y MÉTODOS	39
5.1. Muestreo de aire.....	39
5.2. Aislamiento y cultivo.....	40
5.3. Determinación taxonómica.	41
a) Morfológica.....	41
b) Análisis de isoenzimas y proteínas totales.....	41
5.4. Prueba de patogenicidad.....	43
5.5. Análisis estadístico.....	44
6. RESULTADOS	46
7. DISCUSIÓN	70
8. CONCLUSIONES	82
9. REFERENCIAS	85
ANEXO A. Soluciones y medios de cultivo.....	100
ANEXO B. Técnica de IEF.....	103

Lista de abreviaturas

ATCC	American type culture collection
AVL	Amibas de vida libre
BC	Bactocasitona
CCAP	Culture collection of algae and protozoa
cols.	Colaboradores
com. pers.	Comunicación personal
D.F.	Distrito Federal
EAG	Encefalitis amibiana granulomatosa
IC	Intracerebral
IEF	Isoelectroenfoque
IN	Nasal
<i>I_U</i>	Índice de urbanización
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MCN	Material citopatógeno de <i>Naegleria</i>
MDH	Malato deshidrogenasa
µg	Microgramos
µm	Micrómetros
MEAP	Meningoencefalitis amibiana primaria
NE	Noreste
NNE	Agar no nutritivo
No.	Número
NO	Noroeste
O ₃	Ozono
PE	Propionil esterasa
ppm	Partes por millón
PICA	Programa Integral contra la Contaminación Atmosférica
PST	Partículas suspendidas totales
PT	Proteínas totales
QA	Queratitis amibiana
RAMA	Red automática de monitoreo ambiental
rpm	Revoluciones por minuto
SE	Sureste
SEDUE	Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología
SEMARNAP	Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
SO	Suroeste
ta	Temperatura ambiente
Temp.	Temperatura
ZMCM	Zona Metropolitana de la Ciudad de México

Relación de esquemas, cuadros, figuras y tablas

Página

ESQUEMAS

1. Posición taxonómica de las AVL patógenas para el hombre: <i>Naegleria</i> , <i>Acanthamoeba</i> y <i>Balamuthia</i>	29
2. Métodos empleados.....	45

CUADRO

1. Distribución geográfica mundial de la MEAP, EAG y QA.....	20
--	----

FIGURAS

1. Ubicación de las estaciones de muestreo.....	38
2. Muestreador volumétrico "burbujeador".....	39
3. Variación mensual de las PST, temperatura del aire y aislamientos de AVL por estación de muestreo.....	58
4. Número de aislamientos de AVL por género: a-d) por estación de muestreo, e) respecto al total de aislamientos.....	59
5. Distribución del número de aislamientos de AVL asociadas a las aeropartículas.....	61
6. Frecuencia de aparición de géneros de AVL por época del año.....	62
7. Frecuencia de aparición de los géneros de AVL por estación.....	63
8. Zimogramas de: a) Proteínas totales (PT) y b) Malato deshidrogenasa (MDH) de las amibas de referencia y de los aislamientos ambientales de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	66
9. Zimogramas de Propionil esterasa (PE) de las amibas de referencia y de los aislamientos ambientales de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	67
10. A-B, <i>Filamoeba nolandi</i> ; C, <i>Naegleria gruberi</i> ; D, <i>Platyamoeba placida</i>	68
11. A-B, <i>Acanthamoeba astronyxis</i> ; C-D, <i>Vahlkampfia avara</i>	69

TABLAS	Página
1. Ubicación taxonómica de las AVL aisladas de la atmósfera de la ZMCM (Levine <i>et al.</i> , 1980).....	49
2. Frecuencia de aparición de las AVL de acuerdo a la altura de muestreo y temperatura de incubación.....	51
3. Frecuencia de aparición de las especies de AVL en las diferentes épocas del año.....	54
4. Parámetros meteorológicos y aeropartículas durante el período de muestreo en la zona sur.....	55
5. Parámetros meteorológicos y aeropartículas durante el período de muestreo en la zona norte.....	56
6. Coeficiente de correlación de Spearman entre los parámetros ambientales (PST y temperatura) y los aislamientos y especies de las AVL totales.....	57
7. Frecuencia de aparición de las especies de AVL en las diversas estaciones de muestreo.....	60
8. Prueba de patogenicidad de los aislamientos del género <i>Acanthamoeba</i>	64

RESUMEN

Se llevó a cabo un estudio aerobiológico durante un año, con el objeto de conocer la distribución espacial y temporal, así como el potencial patógeno de las amibas de vida libre asociadas con las aeropartículas en la zona metropolitana de la Ciudad de México.

Las muestras de aire se tomaron simultáneamente a dos y cinco metros sobre el nivel del suelo utilizando un muestreador volumétrico "burbujeador" con medio líquido de Bold y un flujo de 19.6 L/min durante una hora.

Las muestras se concentraron por centrifugación y se inocularon en medios selectivos para obtener las amibas en cultivos axénicos. Para ubicar taxonómicamente a las amibas aisladas, se utilizaron sus características morfológicas y fisiológicas, así como sus patrones isoenzimáticos.

La patogenicidad de las amibas aisladas se determinó empleando la prueba de inoculación intracerebral y nasal en ratones de laboratorio. Del total de los 108 aislamientos amibianos obtenidos, 25 fueron patógenos vía inoculación intracerebral y sólo nueve por vía nasal. Todos éstos, pertenecientes al género *Acanthamoeba*.

Acanthamoeba, *Vahlkampfia*, *Hartmannella* y *Filamoeba* fueron los géneros que se aislaron con mayor frecuencia. Especies de *Acanthamoeba* fueron las más frecuentemente aisladas de la atmósfera durante el período de muestreo.

Los resultados sugieren que la concentración de aeropartículas, el índice de urbanización y la baja humedad relativa fueron los principales factores asociados con la frecuencia y heterogeneidad de las amibas aisladas. También la habilidad para producir quistes y su tamaño fueron características importantes.

Este estudio demuestra que en la atmósfera de la zona metropolitana de la ciudad de México, existen quistes viables de amibas de vida libre. Esto representa un riesgo potencial para la salud humana, ya que algunas de ellas pueden producir infecciones graves en el sistema nervioso central, como la encefalitis amibiana granulomatosa y la queratitis amibiana.

ABSTRACT

An aerobiological survey was carried out over a one year period to study the spatial and seasonal distribution, and the pathogenic potential of free-living amoebas associated with airborne particles from the metropolitan zone of Mexico City.

Simultaneous air samples were taken at two and five m above ground level, using a bubbler sampler containing Bold's basal medium, this was sampled at 19.6 L/min for one hour.

The air samples were concentrated by centrifugation and inoculated in selective culture media to obtain amoebic axenic culture. Morphological and physiological features, as well as isoenzymatical patterns from the isolated amoebas were used to identify them.

The pathogenicity of the amoebas was tested by intranasal and intracerebral inoculations into laboratory mice. From 108 amoebas sampled, 25 were pathogenic after intracerebral inoculation and only nine after intranasal inoculation. All of them belonged to the *Acanthamoeba*.

Acanthamoeba, *Vahlkampfia Hartmannella* and *Filamoeba* were the most common isolated genera. *Acanthamoeba* species were frequently isolated from the atmosphere during the sampling period.

These results suggest that the concentration of airborne particles, urbanization index and low humidity of the air were the main factors associated with the frequency and amoebas heterogeneity. Also, the ability to produce cysts and their size were considered important characteristics.

This study show that viable cysts of free-living amoebas in the atmosphere of the metropolitan zone in Mexico City. This represent a potential risk for human health because some of them can produce serious central nervous system infections such as granulomatous amoebic encephalitis and *Acanthamoeba* keratitis.

1. INTRODUCCIÓN

Las bacterias, las algas, los protozoos y los hongos son prácticamente ubicuos en la naturaleza y constituyen una parte muy importante del ambiente. Sin embargo, día con día se descubre que microorganismos considerados exclusivamente de vida libre pueden actuar como parásitos patógenos de animales superiores.

Uno de estos hallazgos ocurrió en 1958, cuando se descubrió que determinadas amibas pequeñas del suelo y de las aguas que hasta entonces se consideraban inocuas, llegaban a colonizar los tejidos del hombre y de los animales, pudiendo causar la muerte o daño cerebral irreversible (Culbertson *et al.*, 1958).

Estas amibas se encuentran naturalmente en el ambiente -suelo y agua-, donde se alimentan de bacterias y materia orgánica. Pero debido a su habilidad para vivir como organismos de vida libre y como endoparásitos, se les ha denominado anfizoicas, del griego *amphi* que significa de ambos lados. También se les ha llamado amibas limax, término derivado del latín que se utiliza para las amibas que se mueven en forma semejante a una "babosa" (Martínez, 1985; Ma *et al.*, 1990; John, 1993). Algunas pueden ser patógenas *per se*, alergénicas o vectores de virus o de patógenos bacterianos, como ocurre con *Legionella pneumophila* (Tyndall & Ironside, 1990; Baker & Brown, 1994).

Son microorganismos de forma cambiante, que generalmente muestran aspectos morfológicos muy distintos a lo largo de su ciclo biológico, aspectos que dependen frecuentemente de las condiciones físicas y químicas del ambiente en que se desarrollan. Su movimiento continuo es un obstáculo importante cuando se trata de identificarlas morfológicamente.

El estudio de las amibas de vida libre (AVL) era hasta hace poco un asunto exclusivamente académico que sólo le interesaba a los especialistas más estrictos y únicamente desde el punto de vista descriptivo. Sin embargo, a partir de que se descubrió su potencial patógeno, el estudio del grupo de las pequeñas amibas ha adquirido gran importancia descubriéndose además, que aparte de *Naegleria* y *Acanthamoeba*, existen otras amibas que también pueden invadir el sistema nervioso central (SNC) y causar infecciones en hombre y animales.

En comparación con otras enfermedades causadas por protozoos, las infecciones causadas por las AVL parecen poco importantes; sin embargo destacan como patógenos debido a su amplia distribución, extrema virulencia y falta de tratamiento efectivo. Hasta ahora, las AVL con importancia médica están restringidas a un grupo pequeño donde se incluyen los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y posiblemente *Hartmannella*. Estas amibas son capaces de provocar en el hombre dos enfermedades mortales:

Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MEAP) o naegleriosis y Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) o acantamoebosis

También pueden provocar infecciones muy severas en algunos órganos como en pulmón, oídos, nariz, y -de manera importante- en ojos al producir queratitis ocular, muy común entre los usuarios de lentes de contacto (Martínez, 1985; John, 1993; Omaña, 1997).

El primer caso de meningoencefalitis amibiana primaria en humanos fue descrito por Fowler & Carter (1965) en Australia, posteriormente se registraron muchos más en Estados Unidos (Butt, 1966) y en la hoy denominada República Checa (Cerva & Novak, 1968). A partir de entonces se han registrado casos en todos los continentes, lo cual demuestra la amplia dispersión de estas amibas por todo el mundo (Visvesvara & Stehr-Green, 1990; Riestra *et al.*, 1997; Martínez & Visvesvara, 1997; 1998) y sugiere la posibilidad de que muchos casos hayan pasado inadvertidos por falta de conocimiento acerca de dicho grupo de organismos.

Las especies patógenas son termófilas. De aquí que las altas temperaturas favorezcan su crecimiento y proliferación, por lo que se encuentran frecuentemente en aguas termales naturales y aguas térmicamente contaminadas por descargas industriales (Cerva, 1977; De Jonckheere, 1977; Martínez, 1985; John, 1993).

La mayoría de los casos registrados se han asociado con la natación, no obstante, existen reportes sin ese antecedente en zonas áridas de Australia y Nigeria. Para estos casos se ha propuesto como posibles causas, el lavado de la cara con agua contaminada y el baño en tina (Anderson & Jamieson, 1972a; Lawande *et al.*, 1980).

Varios autores han sugerido que estos organismos pueden transportarse a través del aire adheridos a partículas de polvo o viajar solos y de esa manera invadir otros ambientes (Lawande *et al.*, 1979, 1983). Sin embargo, se conoce muy poco acerca de la diversidad protozoológica en la atmósfera y de la influencia de los factores meteorológicos en la sobrevivencia de los protozoos aerotransportados y menos aún en el caso de las AVL.

En la década de los setentas surgió y se ha venido desarrollando una nueva disciplina llamada Aerobiología, la cual se dedica al estudio de organismos y materiales biológicos transportados por la atmósfera con especial énfasis en las fuentes, dispersión, depositación e impacto en animales y plantas (Schlichting, 1986a; Lacey, 1995). Los estudios realizados en ese campo se han centrado en bacterias, virus, algas y en general, agentes alérgicos, como son las esporas de hongos, levaduras y polen, entre otros. En el caso de los protozoos, la información generada ha sido esporádica y muy escasa.

Por todo lo anterior y también desde el punto de vista de salud pública, es importante determinar cuáles AVL se mantienen viables en la atmósfera y qué factores meteorológicos favorecen o limitan su distribución, de manera que se aporte información que ayude a formular medidas preventivas para evitar o disminuir su dispersión, especialmente en el caso de las amibas potencialmente patógenas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Protozoos del aire

Probablemente, la primera observación de protozoos de vida libre fue realizada por Antonie van Leeuwenhoek en 1675. En 1776, el naturalista italiano Spallanzani aisló y observó por primera ocasión microorganismos del aire, al exponer un medio de cultivo estéril al aire, describiéndolas como "animáculos superiores". Goldfuss (1817) los llamó protozoos, por considerarlos organismos primitivos (Grell, 1973).

Los primeros en señalar la dispersión de microorganismos por el aire fueron Pasteur y Pouchet en 1860. En 1863, Charles Darwin publicó que una multitud de cuerpos eran transportados por el viento en forma de polvo, y que el análisis de esos sedimentos modificaría las nociones acerca de la generación espontánea y mostraría una fuente fértil donde formas híbridas no esperadas podrían surgir (Schlichting, 1961). Más tarde Miquel (1883) reportó de 0.1 a 0.2 "huevos" de protozoos/m³ de aire aislados del observatorio de Montsouris en París (Gregory, 1960).

En 1913, Puschkarew realizó el primer estudio taxonómico de los protozoos del aire utilizando cultivos vivos, reportando 13 especies de amibas pequeñas, flagelados y un ciliado, encontrando un promedio de 2.5 quistes de protozoos/m³ de aire. Entre otros investigadores, Gislen (1940) & Pennak (1953) señalaron la importancia de las corrientes de aire en la dispersión de microorganismos (Schlichting, 1961).

Posterior a estas publicaciones, los trabajos en este campo son escasos, especialmente en el caso de los protozoos.

A partir de 1960, el Dr. Harold Schlichting publicó una serie de trabajos en relación con la presencia, viabilidad y dispersión de algas y protozoos en la atmósfera, así como la instrumentación de aparatos y métodos de muestreo. En 1986, sugirió que los efectos producidos por las sustancias tóxicas atmosféricas, pueden reflejarse en los protozoos y las microalgas aéreas, por lo que el daño producido a estos microorganismos puede indicar el daño que causan estas sustancias a las plantas, a los animales y posiblemente al hombre; por lo que planteó la posibilidad de que esos microorganismos pudieran ser usados como indicadores de determinados tipos de contaminantes del aire (Schlichting, 1961, 1964, 1969, 1986a, b, c, d).

En México, el estudio de la Aerobiología se inició en 1982 en el Centro de Ciencias de la Atmósfera (UNAM) en donde se llevan a cabo estudios en relación a algas, bacterias y hongos aerotransportados (Rosas & Roy-Ocotla, 1985; Rosas *et al.*, 1987, 1989, 1993,

1994, 1995, 1997; Calderón, 1997; Calderón *et al.*, 1995, 1997). Un poco después, en la ENEP-Iztacala-UNAM se inició el estudio de los protozoos del aire, especialmente con respecto a las amibas de vida libre (Rivera *et al.*, 1987, 1992, 1994).

2.2. Amibas de vida libre

Rösel Von Rosenhof (1755) fue el primer investigador en hacer una descripción detallada, con dibujos a color de unos microorganismos ameboideos unicelulares que se podían observar a simple vista, ya que medían aproximadamente 2000 μm de longitud. Más adelante, Linneo (1758) los denominó *Volvox chaos*. En 1841, Felix Dujardin -un naturalista francés- describe por vez primera a una amiba pequeña de vida libre aislada del río Sena, de forma alargada, a la que denominó *Amoeba limax*. Penard (1890) describió otra amiba limax que Schardinger (1899) denominó *Naegleria gruberi*, la cual descubrió en las heces de un paciente con disentería. De hecho fue la primera vez que se asoció la patogenicidad de las amibas de vida libre con el hombre (Grell, 1973; Jadin, 1987).

Posteriormente y de forma esporádica, siguieron surgiendo reportes acerca de amibas de vida libre asociadas con seres humanos afectados de alguna enfermedad, principalmente con cuadros diarreicos o disentéricos. Page (1969) describió la misma amiba aislada de agua dulce y la denominó *Hartmannella limax*. En 1908, Walker realizó un estudio detallado de las AVL en el que aisló varios especímenes de heces fecales humanas y animales, como resultado describió 38 variedades de amibas de vida libre (Jadin, 1987).

No obstante lo anterior, estos hallazgos no tuvieron la suficiente trascendencia, en gran parte debido a que investigadores de gran renombre como Schaudinn sostenían que sólo existía una amiba patógena, responsable de infecciones intestinales -*Entamoeba histolytica*- y que en todos los otros casos se trataba de amibas procedentes de quistes transportados por el aire a las heces o a los cultivos, es decir, de simple contaminación aérea (Jadin, 1987). Desafortunadamente esta idea aún prevalece en gran parte de la comunidad biomédica, seguramente debido a la afirmación tan categórica de Schaudinn. Se puede atribuir a ello que durante muchos años nadie más realizara ningún estudio formal para establecer la patogenicidad de las AVL.

2.3. Especies patógenas

La mayoría de las AVL no causan enfermedad; sin embargo, como oportunistas pueden producir infecciones graves en el ojo y en el SNC. El término anfizoico fue propuesto por Page (1966), para describir la habilidad de esas amibas para vivir en dos ambientes: como organismos de vida libre y como endoparásitos. Las AVL descritas hasta hoy como patógenas son *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. y *Balamuthia mandrillaris*.

a) *Naegleria fowleri*

Fue en 1957 cuando Jahnes, Fullmer & Li, trabajando con el virus de la polio en cultivos de tejido de riñón de mono, observaron que en unas placas de lisis citopática -en principio atribuyéndolas a la acción del virus- aparecían unos microorganismos ameboides que clasificaron entonces como *Acanthamoeba*.

Más tarde, Culbertson *et al.*, (1959) observaron que una amiba aislada de un cultivo de células contaminado era capaz de producir meningoencefalitis, al inocular a las amibas directamente o a través de la nariz al cerebro de monos o ratones. Lo más significativo de esto fue el demostrar que las amibas eran capaces de llegar al cerebro a través de la mucosa nasal y producir una infección fatal del SNC (John, 1993).

La primera descripción clínica de la enfermedad debida a estas amibas fue publicada en 1965 por Fowler & Carter en Australia, con la descripción de cuatro casos de meningoencefalitis en tres niños y un adulto, los cuales murieron cuatro ó cinco días después de la aparición de los síntomas. Se propuso la ruta de invasión nasal en estos casos, debido a que observaron grandes cantidades de amibas en cortes histológicos de los pacientes de los bulbos olfatorios, de la región frontal del cerebro y en la mucosa nasal. Inicialmente la infección se atribuyó a *Acanthamoeba*. Sin embargo, al presentarse otros casos posteriores se demostró que el agente causal había sido *Naegleria fowleri*.

Un año después del primer reporte, Butt (1966) en Florida, Estados Unidos describió tres casos de infección fatal, cuya sintomatología era muy similar a la de las víctimas reportadas en Australia. Estos casos proporcionaron un panorama muy completo de las características patológicas y clínicas del padecimiento, siendo también relevante la indicación de que la infección fue adquirida por instilación nasal durante la práctica de la natación. Los tres individuos de Florida, también habían estado nadando antes de presentar los síntomas. Butt (1966) reconoció el descubrimiento de una nueva enfermedad y le dió el nombre de meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP).

Otro caso de MEAP fue reportado en Texas por Patras & Andujar, también en 1966 y fue atribuida a *Acanthamoeba*. Más tarde, pruebas de inmunoperoxidasa de secciones de tejido del paciente revelaron que la amiba causante había sido *N. fowleri* (Culbertson, 1975). Estudios retrospectivos han revelado otros casos de infección por AVL antes de 1965; por ejemplo uno ocurrido en 1909 (Symmers, 1969) y otro en Virginia, Estados Unidos, en 1939 (Dos Santos, 1970).

Cuatro casos fatales de MEAP en Nueva Zelanda fueron inicialmente atribuidos a un myxomiceto o mohó del lodo (Mandal *et al.*, 1970). Sin embargo, análisis posteriores mostraron que se trataba en realidad de *N. fowleri*.

El nombre de *Naegleria fowleri* fue propuesto por Carter en 1970 para la especie patógena de *Naegleria* en honor de Malcom Fowler, el primero en reconocer su capacidad patógena (John, 1993).

b) *Acanthamoeba* spp.

Las primeras infecciones del SNC claramente identificadas como causadas por *Acanthamoeba* fueron reportadas por Kenney, Jager & Stamm (1972) y Robert & Rorke (1973). Ya antes habían sido referidas pero como pertenecientes al género *Hartmannella*. Ahora se sabe que la amiba causante de enfermedad pertenece al género *Acanthamoeba* y hasta la fecha no ha sido descrita ninguna *Hartmannella* patógena (John, 1993), aunque en México se publicó un caso de meningoencefalitis asociado a una *Hartmannella* (Centeno *et al.*, 1996).

En contraste con la infección producida por *N. fowleri*, la cual está confinada al SNC, *Acanthamoeba* se ha aislado de otros tejidos también, como la piel, el ojo y los pulmones. La infección por *Acanthamoeba* no ha sido asociada con la natación, y la invasión del SNC es secundaria a la infección en otro sitio del cuerpo. Las amibas alcanzan el cerebro a través de la corriente sanguínea. El término **encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)** fue propuesto por Martínez (1980) para describir la infección del SNC causada por *Acanthamoeba*.

Los primeros aislamientos de *Acanthamoeba* en tejidos humanos fueron registrados por Visvesvara *et al.*, (1983). Uno fue obtenido de los pulmones de un paciente que murió de EAG, otro fue recuperado de tejido de un injerto en la mandíbula de un individuo. Ambos aislamientos se identificaron como *A. castellanii*.

Por otro lado, también pueden producir queratitis amibiana (QA), que es una infección ocular. La contaminación del ojo por agua, tierra o aire que contenga amibas, es probablemente la vía de acceso al tejido ocular. Los primeros dos casos de QA fueron registrados en la Gran Bretaña por Nagington *et al.*, (1975). Las amibas provocaron una ulceración crónica progresiva de la córnea, que en uno de los pacientes produjo la pérdida del ojo, ya que tuvieron que extirpar el ojo infectado. Las amibas fueron identificadas como *A. polyphaga* y *A. castellanii*, respectivamente. Los primeros casos de QA en Estados Unidos fueron registrados en Texas (Jones *et al.*, 1975). Dos de ellos se diagnosticaron como queratitis y un tercero como uveítis. En los tres casos, *Acanthamoeba* fue identificada como el agente etiológico (Martínez *et al.*, 1977).

c) *Balamuthia mandrillaris*

En 1993, Visvesvara, Schuster & Martínez describieron un nuevo patógeno, otra amiba de vida libre que es capaz de provocar EAG. Es habitante del suelo y muy semejante a los miembros del orden Leptomyxida, pero con diferencias importantes.

Basados en estudios de microscopía de luz y electrónica, pruebas de patogenicidad en ratones y pruebas de inmunofluorescencia, los mismos investigadores propusieron un nuevo género y una nueva especie (*Balamuthia mandrillaris*) para estos organismos. El género se denominó en honor al Profesor William Balamuth, por su contribución en el estudio de las amibas de vida libre parásitas, y el nombre de la especie para reflejar el origen de la especie tipo, la cual fue aislada del cerebro de un mandril que murió de encefalitis en el zoológico de San Diego, California, E.U.A.

Existen registros previos de casos clínicos en humanos ocasionados por las mismas amibas, anteriormente designadas como amibas leptomyxidas (Jaramillo *et al.*, 1989; Visvesvara *et al.*, 1990; Taratuto *et al.*, 1991). Con base en pruebas de inmunofluorescencia, Visvesvara *et al.*, (1993) identificaron 35 casos de EAG en humanos y tres en otros animales, cuyo agente etiológico fue *B. mandrillaris*.

2.4. Morfología y ciclo de vida

Las AVL son organismos unicelulares, asexuales, cuyas dimensiones varían de unos cuantos micrómetros hasta algunos milímetros. Pueden estar desnudas o cubiertas por una testa; móviles por medio de pseudópodos, que también usan para fagocitar. Los tiempos de generación son variables y generalmente se incrementan con la temperatura y disminuyen con el tamaño del cuerpo (Lee *et al.*, 1985; John, 1993).

Los pseudópodos muestran una considerable diversidad de estructuras y tipos que se reflejan en una gran variedad de formas. Su citoplasma está constituido por dos zonas; una capa transparente o ectoplasma y un endoplasma granular que fluye a lo largo del cuerpo hacia los pseudópodos. El ectoplasma es más visible en las puntas de los pseudópodos, donde forman zonas hialinas. El endoplasma contiene uno a varios núcleos, una o varias vacuolas, gránulos de almacenamiento de alimento, mitocondrias y otras membranas e inclusiones cristalinas (Page, 1988; Weekers, 1993).

La formación de quistes es el mecanismo de protección que presenta la mayoría de los protozoos, incluidas las AVL, para protegerse de los cambios ambientales. De esta manera pueden sobrevivir a la ausencia de humedad, cambios extremos de temperatura, presión, pH, falta de oxígeno, acumulación de desechos metabólicos, escasez de alimento o algún otro factor adverso (Schuster, 1979; Marciano-Cabral, 1988).

A continuación se describe con mayor detalle la morfología y el ciclo de vida de *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, ya que -debido a su potencial patógeno- son las que mejor y más ampliamente se han estudiado.

a) *Naegleria*

El género *Naegleria* consta de tres estadios durante su ciclo de vida en el ambiente (Page, 1988):

- trofozoíto o forma vegetativa, que es la fase del ciclo en la que se alimenta y reproduce
- quiste que es la forma de resistencia
- flagelado, estadio transitorio que no se alimenta, ni se multiplica y después de un tiempo regresa a la fase trófica.

La especie *N. fowleri*, también puede invadir al ser humano y animales. El trofozoíto es el estadio invasivo, su período de incubación varía de dos días a tres semanas, dependiendo del tamaño del inóculo y de la virulencia de las amibas. La inhalación de agua, o más raramente, de aire conteniendo amibas, pone en contacto a estos microorganismos con el neuroepitelio olfatorio por donde penetran directamente a la cavidad craneal a través del nervio olfatorio, constituyéndose de esta manera la ruta de diseminación de las amibas a otras partes del encéfalo y del espacio subaracnoideo vascular (Martínez, 1985; Martínez & Visvesvara, 1997).

Trofozoíto. Los trofozoítos de las diferentes especies son muy similares en apariencia y son conocidas como amibas limax. Son alargadas y se mueven de manera unidireccional por medio de un pseudópodo eruptivo, llamado lobópodo. El núcleo posee un denso y esférico nucleolo central o cariosoma y una membrana nuclear sin cromatina granular. El trofozoíto de *N. fowleri* en movimiento mide en promedio 22 μm de longitud (intervalo de 15 a 30 μm); en forma inactiva, redondeada, mide de 9 a 15 μm de diámetro (Carter, 1970).

Los trofozoítos de *N. fowleri* y *N. australiensis* (patógena en ratón) poseen unas estructuras fagocíticas distintivas conocidas como amebostomas, que son usadas para engullir alimento y varían en número de una a doce por amiba. Por microscopía electrónica de transmisión se ven muy granuladas, en contraste con las áreas vacuoladas de la amiba. En las especies no patógenas no son tan evidentes, como en *N. fowleri*. Aparentemente, no existe correlación entre el grado de virulencia y el número de amebostomas; sin embargo, la patogenicidad sí parece estar correlacionada con su presencia, ya que las dos únicas especies patógenas de *Naegleria* las poseen (John, 1993; John *et al.*, 1985).

La reproducción es por fisión binaria del trofozoíto. La división nuclear es promitótica, lo cual significa que el nucleolo y la membrana nuclear persisten durante la división nuclear (cariocinesis). El nucleolo se alarga formando una estructura en forma de "pesas" y se divide en dos masas polares, que más adelante se convertirán en el nucleolo de cada una de las dos nuevas amibas (Page, 1988).

Flagelado. Cuando las condiciones en el ambiente son adversas, los trofozoítos se pueden transformar en formas flageladas temporales; el mismo efecto se puede inducir experimentalmente con agua destilada o solución buffer no nutritiva. El flagelado típico es una célula de forma piriforme, con dos flagelos que emergen por debajo del *rostrum* anterior. El estadio flagelar de *N. fowleri* es muy uniforme, la mayoría presenta dos flagelos, *N. australiensis* es más diverso, pudiendo presentar hasta ocho flagelos por célula, y la especie no patógena *N. gruberi*, puede presentar de uno a cinco flagelos por célula (Page, 1988; John *et al.*, 1991).

Quiste. El quiste de *N. fowleri* es esférico, con un diámetro de 7 a 15 μm (Page, 1988). En quistes analizados con la técnica de microscopía electrónica, se observan al menos dos poros (u ostiolas) con tapón y una pared relativamente delgada, característica que hace a esta especie muy susceptible a la desecación. Los quistes de *N. australiensis* tienen pared lisa con tres a ocho poros por quiste (De Jonckheere, 1981).

b) *Acanthamoeba*

El ciclo de vida de *Acanthamoeba*, tanto en el ambiente como durante la invasión a seres vivos, consta únicamente de dos estadios (Page, 1988):

- trofozoíto o forma vegetativa
- quiste o forma de resistencia.

El periodo de incubación en el hombre y animales se desconoce, pero son necesarios semanas o meses para que la enfermedad se establezca. La puerta de entrada puede ser a través de la piel o de las mucosas, así como a través de la inhalación de agua o aire contaminados con amibas. Una vez en el organismo se establece una lesión primaria desde la cual, por vía sanguínea, las amibas alcanzan el SNC (John, 1993; Martínez & Visvesvara, 1997).

La queratitis amibiana (QA) se puede producir por el contacto directo de las amibas con la córnea o por el contacto con cuerpos extraños, traumatismos menores o líquidos contaminados (Stehr-Green *et al.*, 1989).

Trofozoíto. El rasgo más característico de los organismos de este género son los acantópodos (del griego *acanth* que significa espina) que son pseudópodos afilados como púas. *Acanthamoeba* se mueve lentamente en un frente ancho sin dirección definida. Tienen una longitud entre 24 y 56 μm . La división nuclear es metamitótica es decir, que durante la cariocinesis el nucleolo y la membrana nuclear se desintegran (John, 1993). Como *Naegleria*, los organismos de este género se caracterizan por poseer un gran nucleolo, centralmente localizado y una membrana nuclear sin cromatina granular. Díaz *et al.*, (1991), describieron estructuras similares en *Acanthamoeba*, y demostraron que también están asociadas a la actividad fagocítica.

Quiste. La morfología de los quistes de las diferentes especies es muy variable. Está compuesto por una doble pared, el ectoquiste que es la pared externa, y el endoquiste o pared interna, lo que les confiere una gran resistencia en el ambiente; además contiene celulosa en su pared (Sleigh, 1989). El ectoquiste puede ser arrugado, ondulado o liso. El tamaño del quiste se encuentra entre 11 y 25.3 μm (Page, 1988).

c) *Balamuthia*

El ciclo de vida de *Balamuthia* consta únicamente de un estadio trófico y uno quístico. Su comportamiento como organismo patógeno es muy semejante al de *Acanthamoeba*, aunque es de evolución más crónica (Visvesvara *et al.*, 1993).

Trofozoíto. Es uninucleado, ocasionalmente binucleado, con un núcleo vesicular que mide alrededor de 5 μm de diámetro y un denso nucleolo central. En estado trófico mide de 12 a 60 μm de longitud con un promedio de 30 μm . Ocasionalmente, algunas formas alargadas alcanzan a medir de 60 a 120 μm de largo y de 15 a 20 μm de ancho, con varias vacuolas contráctiles. La forma de los trofozoítos es irregular y también adopta la forma limax. Se mueve por medio de lobópodos o adoptando una forma de araña con numerosos pseudópodos no ramificados. Se divide por mitosis. Durante la primera fase de la división, el nucleolo y la envoltura nuclear permanecen intactos .

Quiste. Son redondos, aunque se pueden encontrar formas ovales, es uninucleado, ocasionalmente binucleado. En estado maduro presenta tres paredes. La pared interna (endoquiste) es densa y uniforme, rodeada por una capa delgada y ondulada. El ectoquiste es delgado, ondulado e irregular, con apariencia rugosa en los quistes maduros. Entre las dos paredes, se encuentra el mesoquiste que es un espacio de dimensiones variables ocupado por una red de fibras amorfas. El tamaño del quiste se encuentra entre 6 y 30 μm con un promedio de 15 μm . No presentan poros.

2.5. Infecciones en humanos

a) Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) o naegleriosis

Es una enfermedad aguda, rápidamente progresiva y fatal que tiene como agente causal a *Naegleria fowleri*. Debido a que la invasión es muy rápida, hay necrosis hemorrágica de gran parte del encéfalo (Martínez, 1985, 1993; Ma *et al.*, 1990).

Los signos y síntomas de la MEAP consisten en presión intracraneal elevada (náusea, vómito en proyectil y fotofobia), cefalea intensa, irritación de la mucosa nasal, fiebre, datos de irritación meníngea (rigidez de nuca) y encefalitis. El curso clínico se caracteriza por confusión mental, en algunos casos crisis convulsivas; pérdida del apetito, visión doble y/o borrosa, trastornos del gusto, del olfato y alucinaciones, coma profundo, y finalmente la muerte. La mayoría de los pacientes mueren dentro de la primera o segunda semana después de la aparición de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como de la virulencia de las amibas (Martínez & Visvesvara, 1997; Ma *et al.*, 1990).

El cuadro clínico es muy parecido a la meningitis bacteriana; sin embargo, en la infección por *Naegleria* existe el antecedente de que los pacientes, en su mayoría jóvenes y previamente sanos, nadaron en algún cuerpo de agua, así como el hecho de encontrar escaso exudado purulento y ausencia de bacterias en el líquido cefalorraquídeo (LCR). El diagnóstico se confirma con el aislamiento de amibas en forma de trofozoito (nunca quistes, ni flagelados) del LCR o del tejido de biopsia cerebral. El único fármaco de elección contra *N. fowleri* es el antimicótico Anfotericina B, pero solamente es efectivo cuando se administra al inicio de la infección (Martínez, 1985; Martínez & Visvesvara, 1997; John, 1993).

b) Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) o acantamoebosis

Las especies de *Acanthamoeba* hasta hoy asociadas a la EAG son: *Acanthamoeba polyphaga*, *A. castellanii*, *A. palestinensis*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis*, *A. culbertsoni* y *A. hatchetti*.

Es una infección subaguda o crónica. Las lesiones en la EAG se caracterizan por ser granulomatosas, encontrando en ellas tanto trofozoitos como quistes. Se presenta un largo curso clínico con crisis convulsivas y otros signos y síntomas que dependen del sitio que se encuentre irritado o dañado. Los síntomas más relevantes incluyen alteraciones del estado mental como alucinaciones, letargia, somnolencia y cambios en la personalidad (John, 1993; Martínez & Visvesvara, 1997).

Los datos clínicos, comparados con los que provoca *Naegleria*, son menos intensos y de un curso más lento. La acantamoebosis ocurre en pacientes crónicamente debilitados por otro padecimiento o inmunodeprimidos, por lo que *Acanthamoeba* se comporta como un organismo oportunista (Martínez, 1985, 1993).

El cuadro clínico puede confundirse con tuberculosis cerebral, encefalitis viral, cáncer y absceso cerebral. Sin embargo, los antecedentes del paciente, así como un cuadro respiratorio bajo y la rebeldía al tratamiento del proceso, debe hacer pensar en acantamoebosis. Un dato sugestivo para sospechar el diagnóstico, es la presencia de nódulos cutáneos. Los estudios radiológicos, así como la tomografía axial computarizada, muestran múltiples zonas con densidad disminuida, tanto en corteza como en parénquima, que corresponden a infartos cerebrales y a embolias sépticas (Martínez, 1985, 1993; John, 1993).

El aislamiento de trofozoítos o quistes de las lesiones o del LCR confirman el diagnóstico (John, 1993; Martínez, 1985, 1993). Hasta hoy, el tratamiento no ha sido exitoso, a pesar de que se han probado gran cantidad y combinaciones de fármacos. El ketoconazol y el clotrimazol han mostrado cierta efectividad contra *Acanthamoeba* en estudios *in vitro*, aunque no se ha confirmado su efectividad en humanos (Martínez, 1993). También se han utilizado con cierta efectividad itraconazol, miconazol, sulfametazina y pentamidina (Martínez & Visvesvara, 1997).

Un cuadro muy similar al descrito para *Acanthamoeba* es producido por *B. mandrillaris*, la otra especie amibiana que causa EAG (Visvesvara *et al.*, 1993). No está claro sin embargo, si *Balamuthia* se comporta como un organismo oportunista o si es un patógeno letal no dependiente de la inmunosupresión. Los casos descritos son todavía pocos y la infección se ha presentado principalmente en individuos inmunocompetentes aunque también existen reportes de casos sin esa característica, por lo que se les ha calificado como espontáneos (Martínez *et al.*, 1994; Riestra *et al.*, 1997).

c) Queratitis amibiana (QA)

Los agentes etiológicos hasta hoy descritos son *Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti* y *A. rhyssodes* (Martínez & Visvesvara, 1997). Es una infección de la córnea, crónica y poco común pero muy devastadora, que puede llevar a la pérdida del ojo. Ocurre en individuos jóvenes, sanos e inmunocompetentes y principalmente entre usuarios de lentes de contacto. Como principales factores de riesgo entre estos últimos, Stehr-Green *et al.*, (1989) han señalado los siguientes:

- i) el uso de soluciones de elaboración casera, no esterilizadas
- ii) desinfección menos frecuente que la recomendada
- iii) el uso de lentes de contacto durante la natación

Se presenta dolor ocular severo, generalmente unilateral, algunas veces con enrojecimiento, irritación, sensación de cuerpo extraño, fotofobia y una evolución crónica progresiva a pesar del tratamiento. Los análisis son negativos para bacterias, virus y hongos. Frecuentemente se confunde con queratitis micótica o causada por *Herpes simplex*.

Los hallazgos histopatológicos se caracterizan por una queratitis necrotizante aguda o subaguda, con una inflamación granulomatosa del tejido corneal y congestión conjuntival. Los trofozoítos y los quistes se localizan generalmente en el estroma de la córnea. El diagnóstico se puede confirmar con un raspado de la córnea y tiñendo el material con tinciones de Giemsa tricrómica, Wright, Hemacolor o Gram y examinando a 1000× por microscopía óptica de luz. También se han usado con buenos resultados la tinción blanco de Calcofluor y anticuerpos fluorescentes en raspados y secciones de tejido de la córnea (Silvany *et al.*, 1987; Stehr-Green *et al.*, 1989).

El tratamiento de la QA no es sencillo debido a la resistencia de estos organismos a la mayoría de los fármacos comúnmente usados contra bacterias, hongos, protozoos y virus. No obstante algunos pacientes han sido tratados con éxito usando ketoconazol, miconazol, isotionato de propamidina (Martínez & Visvesvara, 1997). En México, se trató con éxito a una paciente con Itraconazol (Omaña, 1997).

En el caso del género *Hartmannella*, no se ha demostrado de forma definitiva su carácter patógeno; sin embargo, en más de una ocasión se ha asociado a casos de meningoencefalitis (Centeno *et al.*, 1996) y queratitis amibiana (Kinnear, 1998).

En México, además de los casos claramente demostrados, se han detectado *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmannella* en pacientes asintomáticos, por lo que se deduce que se encuentran en nuestro país con relativa frecuencia (Rivera *et al.*, 1984b, 1986a). Lo mismo se puede comentar con respecto a alteraciones pulmonares y oculares, en las que no se descubre etiología amibiana, quizás por no pensar en ella.

2.6. Mecanismos de Patogenicidad

Los mecanismos de patogenicidad de las AVL patógenas aún no se conocen completamente ni tampoco los factores que determinan la susceptibilidad a las infecciones con el subsecuente desarrollo de las enfermedades que causan. La mayor parte de lo que se conoce hasta la fecha ha surgido de estudios en cultivos celulares y principalmente de estudios de *N. fowleri* en animales.

El trofozoíto es el estadio invasivo de *N. fowleri*; hasta la fecha nunca se han encontrado en tejidos o en LCR, amibas en estadio flagelar o de quiste, solamente en estado de trofozoíto. En el caso de *Acanthamoeba*, se han encontrado tanto quistes como

trofozoítos, por lo que se cree que ambos estadios están involucrados en la infección que producen (Martínez, 1985; Ma *et al.*, 1990).

Algunos de los mecanismos de patogenicidad de *N. fowleri* propuestos hasta hoy incluyen:

- a) fagocitosis,
- b) liberación de sustancias citolíticas
- c) presencia de un componente biológico activo, conocido como material citopatogénico de *Naegleria* (MCN).

Fagocitosis. Es una función básica de las amibas directamente involucrada con la patogenicidad que causa la destrucción de células, tanto en cultivo celular como en tejidos animales. A la acción que *N. fowleri* realiza al engullir alimentos (levaduras, eritrocitos, bacterias, otras células) se la conoce como trogocitosis, la cual es llevada a cabo por unas estructuras parecidas a una ventosa o chupón denominadas amebostomas (Brown, 1979; John *et al.*, 1985).

Amibas de la especie *N. fowleri* no solamente engullen, sino que destruyen a otras células a "mordidas", lo que permitiría explicar la destrucción de mucosas y otros tejidos. Tales estructuras se han observado en *N. fowleri* (John, 1985) así como en *Acanthamoeba* spp. (Díaz *et al.*, 1991).

Sustancias citolíticas. En 1978, Chang sugirió que el efecto citopático se debía a sustancias citolíticas o citotóxicas (enzimas fosfolipolíticas) liberadas por las amibas durante su crecimiento. El mismo autor reportó que el sobrenadante del cultivo de *N. fowleri* en cultivo de células de mamífero produjo lisis al adicionarse a cultivos nuevos (John, 1993).

Coursos & Brown (1978) identificaron fosfolipasa A y C, lisofosfolipasa y esfingomielinasa en medios de cultivo donde creció la misma especie. Además reportaron que la actividad de la fosfolipasa aislada de cultivo de *Naegleria* patógena fue mucho mayor que la de cultivos de *Naegleria* no patógena.

En extractos de *N. fowleri* se han identificado varias hidrolasas, fosfatasa ácida, varios glicosidasas (Marciano-Cabral *et al.*, 1987) y elastasa (Ferrante & Bates, 1988). Este último, refiere que los niveles de elastasa son muy similares entre cepas amibianas patógenas y no patógenas. Martínez & Visvesvara (1997), además de las anteriores, mencionan fosfatasa alcalina, aminopeptidasas, estererasas y deshidrogenasas.

Hysmith & Franson (1982) reportaron que los fosfolípidos de mielina humana pueden ser degradados al ponerse en contacto con medios de cultivo (sin amibas) donde creció *N. fowleri*. Las neuraminidasas presentes en el medio de cultivo hidrolizaron mielina humana y mucina, sugiriendo que quizás las enzimas que son capaces de hidrolizar glicolípidos y fosfolípidos de mielina *in vitro* son también responsables de la gran desmielinización que ocurre experimentalmente y en MEAP humana (John, 1993; Martínez

& Visvesvara, 1997). Adicionalmente, los niveles de esfingomielasa en cultivos de *N. fowleri* virulenta fueron mayores que las de *N. fowleri* poco virulenta o *N. gruberi* (Hysmith & Franson 1982).

Marciano-Cabral *et al.*, (1990), sugieren que la destrucción celular se debe a la acción conjunta de toxinas citolíticas y trogocitosis. El o los factores citolíticos presentes en amibas cultivadas axénicamente pueden ser usadas para la digestión interna de células blanco ingeridas, mientras que los factores citolíticos de amibas pasadas por ratón, lisan las células blanco antes de ingerirlas.

Por su parte, Campbell (1993) sugiere que el efecto citopático se debe a la combinación de dos mecanismos: un proceso mediante contacto más la ingestión de pedazos de alimento (trogocitosis), y la producción de hidrolasas lisosomales más una fosfolipasa que puede degradar mielina.

Por otro lado, Lowrey & McLaughlin (1985) describieron una proteína hemolítica estable al calor asociada con la membrana superficial de *N. fowleri* y aunque no se ha demostrado, se ha sugerido que desempeña un papel importante en la patogenicidad de esta especie.

Material citopatogénico de *Naegleria* (MCN). Dunnebacke & Schuster (1985) atribuyen la patogenicidad de *Naegleria* a una proteína, a la que denominaron como material citopatogénico de *Naegleria* (MCN). Es una proteína con una masa molecular de 36,000 kDa y un punto isoeléctrico de pH 4.2. De acuerdo con estos autores el MCN se localiza en las puntas de los pseudópodos y en el citoplasma periférico de las amibas, formando una estructura en forma de anillo semejante a los amebostomas que puede observarse por fluorescencia. El MCN destruye células de una variedad de líneas celulares de mamíferos y aves. El efecto citopático ha sido mantenido en cultivos celulares a través de nueve pases seriados. MCN purificado o crudo causa efecto citopático en células cultivadas (John, 1993).

Los mecanismos de patogenicidad han sido asociados con otros factores:

- Para llevarse a cabo la invasión amibiana, el primer factor es su habilidad para adherirse a la superficie del hospedero, ya que es necesario el contacto de las amibas con las células animales para que la lisis de células nerviosas se lleve a cabo (Marciano-Cabral, 1988).

- La fase de crecimiento. Se ha observado que la mortalidad es mayor entre ratones inoculados con amibas cosechadas al final de la fase de crecimiento logarítmico y al inicio de la fase estacionaria que al inicio de la fase de crecimiento logarítmico y la última parte del estado estacionario (Ferrante, 1991).

- La locomoción amibiana es otro factor importante que promueve la invasión y penetración de tejidos y mucosas. En condiciones similares, *N. fowleri* tiene tasa de migración superior que los neutrófilos y que amibas no patógenas. Paralelamente con la pérdida de virulencia, se ha observado una disminución en la tasa de locomoción (Ferrante, 1991).

- De acuerdo con Cline *et al.*, (1986), especies de *Naegleria* muestran quimiotaxis al colocarse cerca de células de mamífero, bacterias y productos celulares. Amibas muy virulentas de *N. fowleri*, recientemente recuperadas del hospedero mostraron mayor respuesta que las amibas cultivadas axénicamente. Por otro lado, se ha observado que el cultivo continuo de amibas patógenas en medio axénico conduce a la pérdida gradual de su virulencia, la cual puede ser retenida haciéndola crecer en presencia de bacterias y restaurar a los niveles originales por pases en serie en ratón o en cultivo de tejidos (John & Howard, 1993).

En el caso de la EAG causada por *Acanthamoeba* se sabe aún menos. Martínez & Visvesvara (1997) sugieren que la habilidad de las acantamoebas para producir necrosis del tejido cerebral es probablemente debida a la acción enzimática inducida por hidrolasas lisosomales y a una fosfolipasa que puede degradar fosfolípidos de la vaina de mielina.

Taylor *et al.*, (1995) realizaron un estudio con microscopía de transmisión y aunque no encontraron evidencia de fagocitosis o trogocitosis, sí observaron un contacto muy estrecho entre los acantópodos y las células blanco. Ello sugiere que el contacto de las acantamoebas con el hospedero desempeña un papel muy importante; sin embargo, se requieren más estudios en ese sentido.

Con respecto a la QA, Martínez & Visvesvara (1997) mencionan que es posible que los trofozoítos de *Acanthamoeba* produzcan enzimas colagenolíticas y proteinasas que están involucradas en la patogénesis de la QA.

En todos los casos, también es necesario tomar en cuenta el estado inmunológico del hospedero y la dosis infectiva, así como la habilidad de las amibas patógenas para evadir al sistema inmune del hospedero.

2.7. Epidemiología

La verdadera incidencia de infecciones por AVL en humanos no es conocida; sin embargo, hasta la fecha se tiene conocimiento de 180 casos de MEAP producidos por *N. fowleri*, 169 de EAG ocasionados por *Acanthamoeba* o *Balamuthia* y más de 581 casos de QA provocados por *Acanthamoeba* spp. (Visvesvara *et al.*, 1990; John, 1993; Martínez *et al.*, 1994; Martínez & Visvesvara, 1997; Riestra *et al.*, 1997) (Cuadro 1).

Aunque las infecciones producidas por las AVL todavía son consideradas raras, se han reportado casos alrededor de todo el mundo. La mayor parte de los casos proceden de países desarrollados, como Australia, la República Checa y Estados Unidos de donde se han reportado más del 65% de todos los casos de MEAP.

La mayoría de pacientes con MEAP tuvieron el antecedente de natación en cuerpos de agua artificiales y durante la estación de verano. En Richmond, Virginia (Estados Unidos), 14 de 16 casos adquirieron la infección en 2 lagos artificiales localizados a pocos kilómetros entre sí (Martínez, 1985).

En la República Checa y en un período de 3 años, 16 jóvenes murieron después de nadar en la misma piscina techada y clorada (Cerva & Novak, 1968). Casos fatales similares se han reportado, después de practicar la natación en piscinas, como en Bélgica (Jadin *et al.*, 1971), en Florida (Butt, 1966) y en canales de riego en México (Valenzuela *et al.*, 1984; Lares *et al.*, 1993).

Cuadro 1. Distribución geográfica mundial de la MEAP, EAG y QA

País	MEAP ^a	EAG ^b	QA	Total
Alemania	-	-	2	2
Argentina	-	1	-	1
Australia	19	7	>1	>27
Barbados	-	1	-	1
Bélgica	5	-	>1	6
Brasil	5*	3	>4	>12
Canada	-	5	-	5
Chile	-	1	-	1
China	-	2	-	2
Colombia	-	2	1	3
Corea del Sur	1	1	-	2
Cuba	1*	-	-	1
Estados Unidos	81	100	>500	>681
Francia	-	-	3	3
Guam	1	1	-	2
Holanda	-	-	>15	>15
Honduras	-	2	-	2
Hungría	-	-	2	2
India	9*	3	>10	>22
Italia	-	1	3	4
Japón	1	3	3	7
México	8	10	>3	>21
Nueva Guinea	1	-	-	1
Nueva Zelanda	8	-	-	8
Nigeria	4	1	-	5
Panamá	1	-	-	1
Perú	-	14	-	14
Puerto Rico	1	-	-	1
Reino Unido	5	-	>30	>35
Rep. Checa	18	2	-	19
Sudáfrica	1	1	-	2
Suiza	-	-	1	1
Tailandia	5	5	-	10
Uganda	1*	-	-	1
Venezuela	4	3	2	9
Zambia	-	1	-	1
Total	180	169	>581	>930

^a Meningoencefalitis amibiana primaria causada por *N. fowleri*.

^b Encefalitis amibiana granulomatosa causada por *Acanthamoeba* spp. o *B. mandrillaris*

* No confirmados por autopsia y/o cultivo de amibas

La infección no siempre ha sido adquirida durante la natación. En el Sur de Australia y Norte de Nigeria se registraron casos en regiones áridas; en el primer caso probablemente se debió al lavado de la cara con agua contaminada o por baño de tina; en el caso de Nigeria se asoció con la respiración de agua contaminada durante el lavado de la cara como parte de un ritual (Anderson & Jamieson, 1972a, 1972b; Lawande *et al.*, 1980). También se ha mencionado, en varias ocasiones, la inhalación de quistes adheridos a polvo (Lawande *et al.*, 1979; Rivera *et al.*, 1986a, 1987, 1994).

A diferencia de la naegleriosis, la EAG no está asociada con la natación. En este caso la infección ocurre en personas debilitadas o inmunosuprimidas. John en 1993 registró dos casos fatales ocurridos en pacientes con SIDA y en 1998, Martínez & Visvesvara mencionan que de 100 casos de EAG en Estados Unidos, aproximadamente 50 eran pacientes con SIDA o HIV positivos.

Amibas del género *Acanthamoeba* pueden producir síntomas respiratorios al establecerse en el tracto respiratorio inferior. Se han descrito reacciones inflamatorias y neumonitis alérgicas (Martínez, 1985; Martínez & Visvesvara, 1997). También, se han aislado de personas saludables (Cerva *et al.*, 1973; Rivera *et al.*, 1984b, 1986b).

Hasta la fecha no se ha reportado ningún caso de MEAP que no haya sido producida por *N. fowleri*. Sin embargo, *N. lovaniensis* -que no se considera patógena-, fue aislada de LCR de un infante con hidrocefalia y mielomeningocele y cuya presencia en ese líquido se atribuyó a una contaminación de tipo yatrogénica (Rivera *et al.*, 1989a). Por otro lado, *N. australiensis italica* es altamente virulenta en ratones, sin que hasta la fecha haya reportes de infecciones demostradas en humanos (De Jonckheere *et al.*, 1984).

La mayoría de los primeros casos de QA se asociaron con trauma del ojo o exposición a agua contaminada. A partir de 1985 se ha observado un incremento considerable en el número de casos y se ha asociado al uso de lentes de contacto, especialmente a lentes de contacto blandos. En 1994 estaban registrados 581 casos de QA en todo el mundo (Martínez *et al.*, 1994) y para 1998, el número se incrementó a alrededor de 1000 (Visvesvara & Leitch, 1998).

2.8. Ecología

Las AVL presentan en general, una distribución cosmopolita debido a su tamaño, a la facilidad de su transportación y a la formación de quistes. Estas características les permite invadir ambientes distintos del original. Las temperaturas extremas para estos microorganismos son las que están por abajo de los 4°C o por encima de los 37°C. Algunas amibas termotolerantes, como *N. fowleri*, pueden sobrevivir incluso a temperaturas mayores de 45°C. En general, las especies patógenas son termotolerantes, aunque no todas las amibas termotolerantes son patógenas (Martínez, 1985).

Generalmente habitan en ambientes húmedos como el suelo y el agua; no obstante pueden encontrarse también en el aire (Rivera *et al.*, 1987, 1994).

Suelo: Son habitantes comunes en este ambiente, se encuentran desde la superficie hasta una profundidad alrededor de 20 cm, donde tienen oxígeno suficiente, humedad, temperatura adecuada y suficiente alimento (bacterias). Se ha reportado que en este hábitat toleran amplias variaciones de pH (3.9-9.75) (Singh, 1975; Marciano-Cabral, 1988).

Los protozoos y particularmente las amibas de vida libre son los principales reguladores de las poblaciones bacterianas del suelo por lo que desempeñan un papel muy importante en el ciclo de los nutrimentos (particularmente el nitrógeno), al acelerar ese proceso por la liberación de componentes derivados de las bacterias durante el pastoreo, (Sleigh, 1989). De acuerdo a Weekers (1993) se encuentran en grandes cantidades en la zona de la rizósfera de las plantas.

El suelo en general contiene una amplia variedad de pequeñas amibas bacterívoras las cuales, generalmente evitan a las bacterias con pigmento (Weekers, 1993). En forma de quiste o de trofozoíto pueden llegar al agua arrastradas por escurrimientos o a través del aire (Kingston & Warhurst, 1969; Rivera *et al.*, 1987).

Agua. Desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento del flujo de energía y el reciclado de los nutrimentos en los ecosistemas acuáticos. Su rápido crecimiento, el uso eficiente de los recursos comparado con formas superiores de vida, así como el hecho de ser un enlace fundamental entre el nivel de los desintegradores y los niveles tróficos superiores, los convierten en un eslabón importante en las cadenas alimentarias acuáticas (Fenchel, 1987). Las amibas se encuentran en mayor proporción en la microcapa superficial, probablemente debido a la abundancia de nutrimentos y a la depositación de quistes aéreos en la superficie del cuerpo de agua; en menor proporción, también se encuentran en los sedimentos (Kyle & Noblet, 1986).

Las especies patógenas son más frecuentes en cuerpos de agua con temperatura por arriba de los 25°C y aguas naturales de los trópicos y subtropicos. Por eso, los lugares que presentan estas condiciones son ambientes adecuados para la sobrevivencia y desarrollo de las especies patógenas, ya que esa temperatura elimina a la mayoría de las especies que se reproducen más rápido a temperaturas menores de 25°C y que normalmente compiten con ellas por el alimento (Griffin, 1983).

En los países templados y fríos, las amibas patógenas proliferan mejor durante los meses más cálidos, lo que conduce a pensar en un patrón estacional; de ahí que el verano en esos países se convierte en la temporada de mayor riesgo, no sólo porque el calor favorece el crecimiento de las amibas patógenas, sino también porque en ese período se practican mucho más los deportes acuáticos. No ocurre lo mismo en los países tropicales y

subtropicales, donde las condiciones para la proliferación de las cepas patógenas son favorables durante todo el año, como ocurre en la mayor parte de nuestro país.

Los cuerpos de agua que contienen microorganismos pueden enviarlos a la atmósfera mediante la formación de aerosoles, los cuales se producen por el impacto del agua con cuerpos duros, por el estallamiento de burbujas en la superficie o por el rompimiento de las olas en el caso del mar (Gregory, 1973; Nicholson, 1988).

Aire. La atmósfera es un medio a través del cual pueden ser transportadas partículas viables de origen y naturaleza muy diversa. De esta manera se pueden encontrar estructuras biológicas de resistencia y de dispersión, así como un gran número de fragmentos de organismos. Entre estas partículas se encuentran las AVL, las que en forma de quiste, pueden ser acarreadas hacia la atmósfera mediante corrientes de convección, turbulencias, sistemas frontales, o burbujas adiabáticas de aire. En la atmósfera, estos microorganismos se pueden transportar adheridos a partículas de polvo o viajar solos, por lo que su permanencia y distribución dependerá de la forma, densidad y tamaño del quiste, así como de las características del agregado que formen (Gregory, 1973).

No se puede considerar la atmósfera como un hábitat, debido a que el tiempo de residencia de los microorganismos en ese ambiente es corto y adicionalmente el ambiente es muy hostil. Sin embargo, las condiciones que prevalecen durante su permanencia en la atmósfera son de gran importancia para su viabilidad y distribución.

El origen de los microorganismos que forman parte de la atmósfera puede ser el suelo, los cuerpos de agua, las plantas de tratamiento, los rastros, basureros e industrias, mientras que el viento, la lluvia y las corrientes de convección térmica son los principales agentes que intervienen en la transferencia de los microorganismos de aquellas fuentes hacia la atmósfera (Gregory, 1973).

Una de las principales características de las aeropartículas viables es su tamaño, ya que de ello depende en gran parte su velocidad de sedimentación. Aunque dicha velocidad se verá afectada por las características del viento. En general, las partículas con un diámetro mayor de 20 μm sedimentan casi inmediatamente y su área de distribución es aproximadamente de 100 m, mientras que las partículas de 10 a 20 μm pueden permanecer por un tiempo mayor y dispersarse mas ampliamente, lo cual depende de las condiciones atmosféricas, así como del tiempo de permanencia de las partículas (Gregory, 1973). Esto es importante, ya que la mayoría de las especies de las AVL tienen quistes que miden de 6 μm a 20 μm .

Se ha calculado que el tiempo de residencia promedio de estas partículas en la tropósfera baja (de 5 a 100 m) es de cuatro horas a dos días, mientras que en la tropósfera alta es de una semana a un mes. En la estratósfera baja es de uno a cuatro meses y en la estratósfera alta es de seis meses a un año. Por todo ello, la distancia a la que se dispersan los quistes dependerá de la altitud a la que hayan llegado y de la dinámica atmosférica que se

desarrolle en tales estratos (Nicholson, 1988). De esta manera, los quistes pueden invadir cualquier ambiente con las condiciones suficientes para desarrollarse o simplemente permanecer en estado latente.

El tracto respiratorio constituye la principal vía de entrada de muchos agentes biológicos. Aquellos de mayor tamaño son filtrados en la nariz o depositados sobre la mucosa de las membranas bronquiales, pero las partículas de 5 μm o menos pueden llegar a los alveolos, cuya superficie es de aproximadamente de 60 m^2 , lo cual significa una extensa zona de exposición para diversos agentes. De tal manera, dependiendo del tamaño y del sitio de reacción dentro del tracto respiratorio será la respuesta, que puede ser a nivel de los bronquios -con síntomas similares al asma-, o a nivel pulmonar con varios tipos de respuesta dentro de los alveolos. Según Schlichting (1969), un individuo en reposo puede inhalar alrededor de 2880 células por día.

La presencia de agentes biológicos en la atmósfera representa un riesgo no sólo para el hombre, sino también para los vegetales y animales, ya que de esta manera pueden ser dispersados masivamente organismos patógenos, pudiendo incluso ocasionar epidemias.

2.9. Distribución en el ambiente

Las AVL son ubicuas en su distribución, prácticamente se han encontrado en todo tipo de ambiente, tanto natural como artificial.

La mayor parte de los aislamientos de *Naegleria* del ambiente, han sido de hábitats acuáticos que fueron manipulados o alterados por el hombre en alguna forma y especialmente de aquéllos que han estado sujetos a calentamiento natural o artificial. Los primeros reportes de aislamientos de *N. fowleri* del ambiente fueron en 1972 en Australia, donde se aislaron de la tubería de agua potable, en la India de lodos de aguas residuales y de un estanque artificial en Richmond, Virginia en Estados Unidos (John, 1993).

Naegleria se ha aislado del suelo, cuerpos de agua dulce naturales y artificiales, abastecimientos y red de agua potable, aguas minerales embotelladas, aguas térmicamente contaminadas y torres de enfriamiento, piscinas con o sin cloro, aguas residuales, piscinas y tinas para uso terapéutico, acuarios, sistemas humidificadores, cultivos celulares, cavidad nasal y garganta de niños y adultos sanos, canales de riego y del aire (Rivera *et al.*, 1981, 1987; Martínez, 1985; Visvesvara & Stehr-Green, 1990; John, 1993). También se han recuperado de las branquias y contenido estomacal de peces, de heces de víboras (Kingston & Taylor, 1976; John, 1993) y de un tapir (Martínez & Visvesvara, 1998).

Acanthamoeba spp. se ha aislado del suelo, cuerpos de agua dulce, aguas minerales embotelladas, hongos y vegetales, agua salobre y marina, sedimentos oceánicos, torres de enfriamiento de plantas eléctricas y nucleares, piscinas y tinas de hidroterapia, sistemas de aire acondicionado y ventilación, sistemas de calefacción, unidades de diálisis, lavados gastrointestinales, unidades dentales, aguas residuales, cultivos celulares. De soluciones conservadoras y limpiadoras de lentes de contacto, de dispositivos anticonceptivos intrauterinos, heces fecales, quemaduras de piel infectada (John, 1993; Martínez, 1985; Rivera *et al.*, 1981, 1987; Visvesvara & Stehr-Green, 1990).

También se han aislado de una gran variedad de animales: ovejas, monos, caballos, peces, reptiles, toros, vacas, perros, conejos, pavos y búfalos (Martínez & Visvesvara, 1998). Por último, de hongos comestibles, verduras (Marciano-Cabral, 1988; Visvesvara & Stehr-Green, 1990; John, 1993).

B. mandrillaris ha sido aislada del suelo y de los siguientes animales: monos, gibón, mandril, gorila, orangután, ovejas y de caballos (Martínez & Visvesvara, 1998).

2.10. Ubicación taxonómica

En las últimas décadas, se ha producido un extraordinario desarrollo en el conocimiento de los organismos como consecuencia del enorme avance científico en el campo de la microscopía electrónica, inmunología, biología celular y biología molecular. Todo esto hace que la clasificación e identificación de los organismos sea cada vez más completa, aunque también más complicada.

En el caso de los protozoos, en los últimos años se han publicado varias propuestas para reclasificarlos entre las que destacan las de Corliss (1994a) y las de Cavalier-Smith (1981; 1993). Sin embargo, debido a los continuos hallazgos especialmente en el campo de la biología molecular, aún no se han establecido criterios generales y definitivos.

Debido a lo anterior, en el presente trabajo se siguió la clasificación propuesta por el Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoólogos, el cual está constituido por un grupo de especialistas en el campo cuya autoridad es reconocida por la comunidad científica. Hasta la fecha, esta Sociedad ha publicado dos clasificaciones de los protozoos (Honigberg *et al.*, 1964; Levine *et al.*, 1980), y una guía ilustrada editada por Lee *et al.*, (1985) en la que los autores retoman la clasificación de 1980.

El Comité de Levine (1980) describió a los protozoos como un grupo heterogéneo de organismos eucariontes unicelulares, no conformados por un grupo natural, que fueron colocados juntos por conveniencia ya que aunque las relaciones son completamente claras entre algunos de los organismos, entre otros aún son oscuras.

Bajo este criterio, los protozoos pueden ser considerados como un subreino del reino Protista. El grupo de las amibas se encuentra incluido en el Phylum Sarcomastigophora, subphylum Sarcodina, superclase Rhizopoda, la cual está constituida por 8 clases: Lobosea, Acarpomyxea, Acrasea, Eumycetozoea, Plasmodiophorea, Filosea, Granuloreticulosea, Xenophyophorea.

Levine *et al.*, (1980) describen al subphylum Sarcodina como organismos con pseudópodos, o con flujo protoplásmico de locomoción; cuando presenta flagelos, están restringidos a estados temporales; con cuerpo desnudo o con testa interna o externa o esqueleto, reproducción asexual por fisión; la sexualidad, si está presente, se halla asociada con gametos flagelares o, raramente con gametos ameboides; la mayoría de las especies son de vida libre.

Durante mucho tiempo se dieron diferentes nombres a una misma especie amibiana y frecuentemente las descripciones eran incompletas y erróneas, ya que estaban basadas principalmente en la morfología. Page, uno de los más importantes estudiosos de las gimnamebas (amibas desnudas) desde el punto de vista morfológico, en 1974 describió 8 especies nuevas; en 1976 sintetizó los datos disponibles hasta esa fecha y elaboró una clave taxonómica para gimnamebas del suelo y agua dulce. En 1988 publicó una nueva versión de la misma y, aunque es muy completa, es conveniente mencionar que en el desarrollo de la clave no siguió fielmente los criterios taxonómicos expresados por la Sociedad de Protozoólogos (1980).

Han sido muchos los investigadores que han contribuido al conocimiento de las amibas de vida libre. Entre ellos se puede destacar a Cervia (1968, 1969, 1971, 1973, 1977), y Willaert *et al.*, (1974, 1976), quien propone el estudio inmunológico de las membranas como criterio confiable para la identificación a nivel de especie (John, 1993). En 1977, Pussard & Pons proponen una clave taxonómica para el género *Acanthamoeba* basado en la morfología de la pared del quiste y en análisis serológicos.

La microscopía de luz transmitida sigue siendo una herramienta básica, pero la microscopía electrónica ha contribuido de manera muy importante en la taxonomía e identificación de las AVL. En este campo, John (1993) destaca por su importancia, los trabajos de Vickerman (1962), Schuster (1969, 1975, 1977), Willaert & Le Ray (1973), Visvesvara & Callaway (1974), Lastovica (1975) y Rondanelli *et al.*, (1976).

El análisis de isoenzimas es todavía en la actualidad el mejor método existente y el más ampliamente utilizado (De Jonckheere, 1987; Rondanelli, 1987; John, 1993). Mediante esta técnica, se han logrado detectar patrones enzimáticos distintivos de cada especie, especialmente para *Naegleria* y *Acanthamoeba*, debido al potencial patógeno de algunas de sus especies. De Jonckheere (1983) señala que los análisis isoenzimáticos son una técnica refinada de gran precisión; sin embargo, admite que se requieren más estudios para decidir adoptar una sola técnica de identificación. Mientras tanto no se pueden excluir los criterios de identificación previos.

Debido precisamente a que los progresos en la taxonomía y filogenia de las AVL son lentos es que aún no existen criterios definitivos para la definición de especies. El uso de métodos modernos, como análisis bioquímicos y fisiológicos tienen relativamente poco tiempo de haber comenzado, y las relaciones inmunológicas y serológicas aún están siendo establecidas. Es por todo esto que actualmente la taxonomía e identificación de las AVL dependen del uso de criterios previos combinados con otros más recientes.

En el esquema 1 se muestra la ubicación taxonómica de las amibas de vida libre patógenas, de acuerdo con la clasificación más reciente publicada por El Comité de Sistemática y Evolución de la Sociedad de Protozoología (Levine *et al.*, 1980). Para la descripción de las familias se siguió la clasificación de Lee *et al.*, (1985) y Page (1976, 1988).

Las amibas patógenas pertenecen a los géneros *Entamoeba*, *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Balamuthia*, ésta última descrita por Visvesvara *et al.*, (1993). *Entamoeba histolytica* es un parásito entérico obligado que puede invadir a otros tejidos, mientras que *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Balamuthia* son organismos de vida libre. Hasta la fecha se han descrito seis especies del género *Naegleria* (John, 1993):

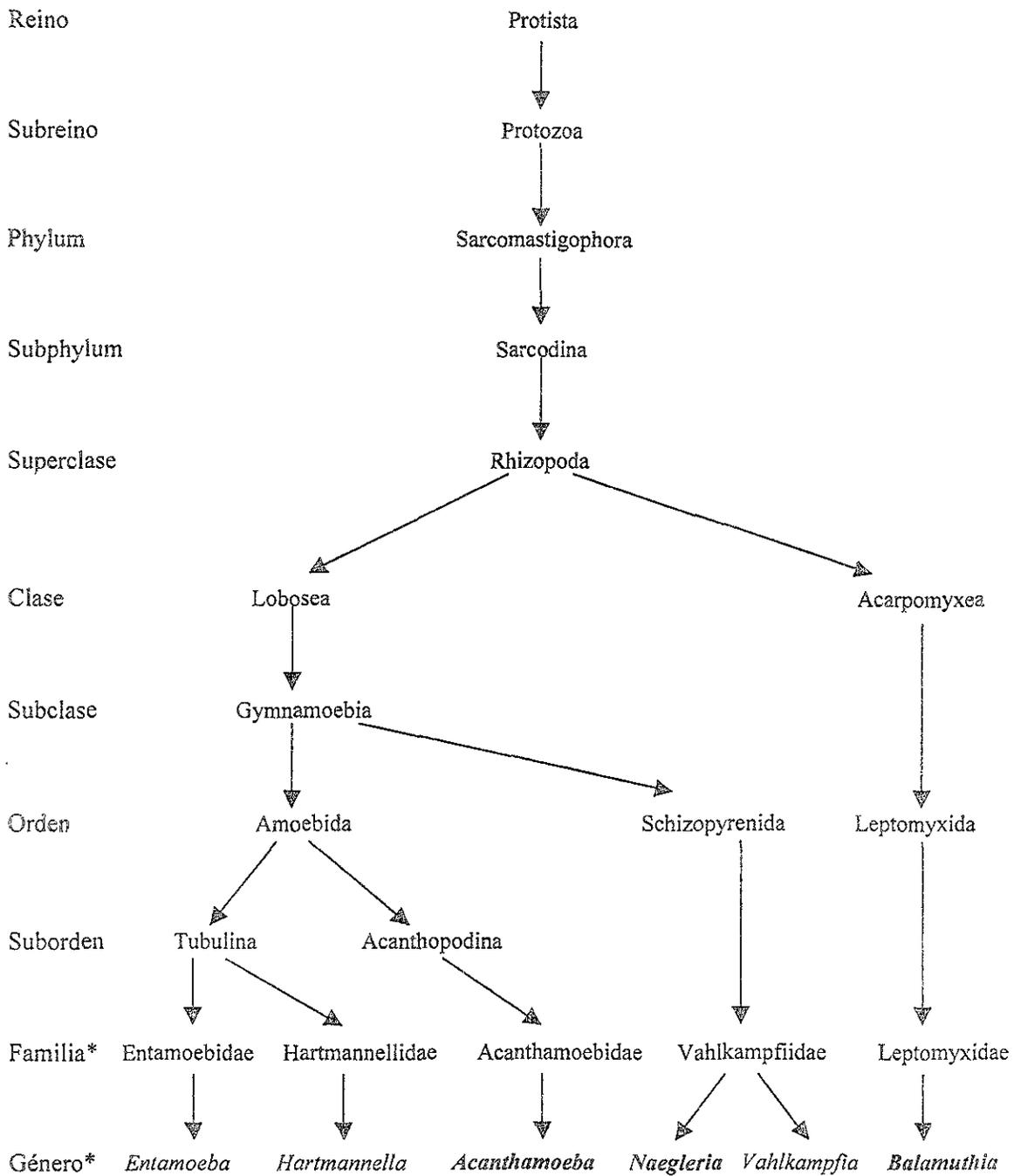
- N. gruberi* Schardinger, 1899
- N. fowleri* Carter, 1970
- N. jadini* Willaert & Le Ray, 1973
- N. lovaniensis* Stevens, De Jonckheere & Willaert, 1980
- N. andersoni* De Jonckheere, 1981
- N. australiensis* De Jonckheere, 1981

De todas ellas sólo *N. fowleri* es patógena en humanos (Martínez, 1985; Visvesvara & Stehr-Green, 1990; John, 1993) y *N. australiensis* es patógena únicamente en ratón (De Jonckheere, 1981).

Aunque el género *Acanthamoeba* es fácilmente reconocible por sus pseudópodos característicos (acantópodos) y por la estructura de su quiste, la identificación de las especies es difícil. Los criterios tradicionales están basados en la morfología del quiste. Los estudios más recientes utilizan el análisis de isoenzimas (Costas & Griffiths, 1985; De Jonckheere, 1982, 1983). Hasta la fecha, se han descrito siete especies del género como causantes de infección humana (John, 1993):

- A. polyphaga* Puschkarew, 1913
- A. castellanii* Douglas, 1930
- A. palestinensis* Reich, 1933
- A. rhyssodes* Singh, 1952
- A. astronyxis* Ray & Hayes, 1954
- A. culbertsoni* Singh & Das, 1970
- A. hatchetti* Sawyer, Visvesvara & Harke, 1977

Esquema 1. Posición taxonómica de las AVL patógenas para el hombre: *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* (Levine *et al.*, 1980)



*De acuerdo a Lee *et al.*, 1985 y Page, 1976, 1988.

A. royreba y *A. lugdunensis* causan la enfermedad solamente cuando se inoculan intracerebralmente. *A. lenticulata* causa la muerte si se inoculan, tanto intracerebral como nasalmente.

Además de las anteriores, Page (1988) en su clave taxonómica, describe a las siguientes especies como no patógenas:

- A. tubiashi* Lewis & Sawyer, 1979
- A. comandoni* Pussard, 1964
- A. mauritaniensis* Pussard & Pons, 1977
- A. griffini* Sawyer, 1971
- A. quina* Pussard & Pons, 1977
- A. divionensis* Pussard & Pons, 1977
- A. tringularis* Pussard & Pons, 1977

2.11. Filogenia

Corliss (1994b) señala que una buena clasificación debería reflejar la historia evolutiva de los organismos y que eso puede lograrse mediante estudios ultraestructurales, bioquímicos, ecológicos y de comportamiento, los cuales aportarán una caracterización más completa, ya que estará basada en varios caracteres con significado evolutivo.

En el caso de las amibas, Anderson (1987) dice que aunque su origen aún es incierto, es probable que sea polifilético; sin embargo existen varias teorías al respecto. El autor señala que los estados flagelados de algunas amibas pueden representar un carácter primitivo que ha persistido hasta la fecha y si eso es correcto, refuerza la hipótesis de que las amibas posiblemente surgieron de ancestros flagelados. Con base en esas semejanzas y posibles afinidades filogenéticas entre las amibas y los flagelados, los subphylum Sarcodina y Mastigophora fueron agrupados en el Phylum Sarcomastigophora por algunos taxónomos como Levine *et al.*, (1980).

Sleigh (1989) dice que algunas especies de amibas pudieron haber surgido de flagelados sin color a través de la pérdida gradual de los flagelos, junto con la obtención de propiedades amibianas. Otras pudieron haber surgido separadamente, junto a una o más líneas paralelas de evolución, en un modelo polifilético. Las evidencias más recientes, señalan que el origen del grupo es polifilético (Page, 1988; Weekers, 1993; Brown & De Jonckheere, 1999).

2.12. Antecedentes en México

Rico-Ferrat & López-Ochoterena (1976), aislaron amibas de los géneros *Acanthamoeba*, *Mayorella*, *Pelomyxa*, *Vahlkampfia* y amibas testadas entre otros protozoos de aguas negras de la zona metropolitana de la Ciudad de México. En 1979, Tomasini & López-Ochoterena aislaron *Naegleria* y *Vahlkampfia* de tinacos de casas-habitación del Distrito Federal.

Posteriormente, Coronado & López-Ochoterena (1980) realizaron un estudio protozoológico en agua de piscinas de la Ciudad de México y del Estado de Morelos, registrando entre otros protozoos a los géneros *Amoeba*, *Vahlkampfia*, *Naegleria* y *Acanthamoeba*. Más adelante, Rico-Ferrat (1980), en un estudio de suelo del Estado de Morelos, registró a *Acanthamoeba*, *Amoeba*, *Naegleria* y amibas testadas.

El estudio formal de las AVL en México fue iniciado en 1978 por Rivera *et al.*, (Rivera *et al.*, 1978, a, b, c). A partir de entonces, las han aislado de diferentes ambientes: de piscinas del D.F. en 1978b, 1983 y 1993; de agua de grifo en el Distrito Federal (D.F.) en 1979; de aguas minerales embotelladas en 1981; de sistemas de tratamiento en 1982, 1986b, 1995; de centros recreativos alimentados con aguas termales del Estado de México en 1983 y del Estado de Hidalgo en 1989; del noreste del Estado de Michoacán en 1990 (en este estudio se describió una nueva subespecie *Naegleria lovaniensis tarasca* y una variedad morfológica de la misma especie, la cepa purépecha); de piscinas de aguas naturales y termales de la zona de la Huasteca Potosina y de tinas de hidroterapia (Rivera *et al.*, 1978b, 1981, 1983, 1989b, 1990, 1993; Bonilla *et al.*, 1999). En 1995 de suelo subterráneo hasta 100 m de profundidad, en el acuífero de la ciudad de León Guanajuato (Campoy *et al.*, 1996).

Rivera *et al.*, realizaron el primer estudio protozoológico del aire en la zona sur de la Ciudad de México. Los resultados de ese estudio demostraron la presencia de las AVL en la atmósfera de la Ciudad de México (Rivera *et al.*, 1987). En 1992, reportaron un estudio sobre la distribución estacional, especialmente de flagelados y ciliados, de la atmósfera de la Ciudad de México y sus alrededores (Rivera *et al.*, 1992). Posteriormente, se obtuvieron AVL de la atmósfera de la ciudad de San Luis Potosí (Rodríguez *et al.*, 1993).

Por otro lado, también fueron aisladas de pacientes odontológicos de ambos sexos, asintomáticos en el D.F. (Rivera *et al.*, 1984b, 1986b), de pacientes con quemaduras infectadas y rinitis (Rivera *et al.*, 1989c); *Naegleria lovaniensis* no patógena del líquido cefalorraquídeo (LCR) de un infante con mielomeningocele e hidrocefalia (Rivera *et al.*, 1989a); *Hartmannella* de LCR asociado a un caso de meningoencefalitis (Centeno *et al.*, 1996); también se detectaron 3 casos de queratitis por *Acanthamoeba* (Omaña, 1997).

En México, hasta la fecha se han reportado 8 casos comprobados de MEAP. El primero fue reportado en Mexicali B.C. (Valenzuela *et al.*, 1984), en un adolescente varón de 16 años. El paciente ingresó al hospital con un intenso dolor de cabeza con el antecedente de que siete días antes había nadado en un canal de riego de poca profundidad. El paciente

murió tres días después de haber sido hospitalizado. La observación del LCR mostró formas amebianas activas. La tinción con inmunoperoxidasa para las amebas aisladas del tejido cerebral fue positiva para *N. fowleri*.

El segundo caso de MEAP debido a *N. fowleri* ocurrió en Monterrey N.L. (Rodríguez, 1984). El diagnóstico de este caso se realizó por observación de preparaciones en fresco y teñidas del LCR del paciente, con lo que demostraron que la infección fue producida por *N. fowleri*. Es importante señalar que, debido a que el diagnóstico se realizó oportunamente, el paciente recibió tratamiento a base de anfotericina B, gracias al cual, sobrevivió.

El tercer caso descrito en México ocurrió en la zona de Huetamo, Michoacán (López Corella *et al.*, 1989). En este caso se reportó la muerte de un joven de 13 años por meningoencefalitis con necrosis parenquimatosa y destrucción del cerebelo. Las muestras de las lesiones del tejido nervioso tomadas *post-mortem*, mostraron numerosos trofozoítos de amebas, posteriormente identificados por inmunoquímica como *N. fowleri*.

Los cinco casos restantes, ocurridos en Mexicali, B.C., fueron reportados por Lares *et al.*, (1993). Corresponden a cinco varones con MEAP que habían nadado en canales de riego unos días antes de presentar los primeros síntomas. Todos los pacientes fallecieron de dos a siete días después de iniciarse los primeros síntomas y en todos los casos se aisló *N. fowleri* de LCR. Además, amebas de la misma especie se aislaron de muestras de agua tomadas del lugar donde habían nadado los jóvenes.

El reporte en nuestro país de sólo ocho casos de MEAP puede deberse en gran parte a que el médico general y el personal de laboratorio no están entrenados para diferenciar una meningoencefalitis viral o bacteriana de una infección por amebas, y -como se consideran raras- no existe la información suficiente y accesible para el personal biomédico.

En el Hospital Regional de Ciudad Valles, S.L.P., se seleccionaron y revisaron 100 historias clínicas de pacientes con diagnóstico inicial de meningitis, encefalitis y meningoencefalitis que acudieron al mencionado hospital entre 1991 y 1992. En el 17% de los casos revisados es muy posible que las AVL fueran el agente etiológico de la enfermedad, ya que -en la mayoría, además de los signos y síntomas de meningitis-, existía el antecedente de la natación y la evolución de la enfermedad fue muy rápida (1-5 días). Además, el personal de laboratorio reportó ausencia de bacterias o cualquier otro microorganismo, por lo que varios de los casos fueron registrados como causados por un agente etiológico desconocido. Desafortunadamente, la mayoría de esos pacientes murieron y no se conservaron muestras histológicas para confirmar o descartar a las AVL como al agente causante de la enfermedad. Sin embargo, no es posible descartar esa posibilidad ni que lo mismo pueda haber ocurrido en otros casos.

Por otro lado, en la Ciudad de México, Becerra *et al.*, (1994) registraron un caso fatal de encefalitis atribuido en ese entonces a la amiba leptomyxida (ahora *B. mandrillaris*). En 1995, se reportó el caso de una infante con síndrome hemofagocítico asociado con AVL de la familia Leptomyxidae (Álvarez *et al.*, 1995).

En Guadalajara, Jalisco, recientemente se registraron cuatro casos de EAG causadas por *B. mandrillaris*. El diagnóstico de estos casos se confirmó *post mortem* usando la técnica de inmunoperoxidasa y por su reactividad con suero anti-*Balamuthia* (Riestra *et al.*, 1997). Más recientemente, en febrero de 1998, en la ciudad de Puebla ocurrió otro caso fatal causado por *B. mandrillaris* (Martínez, 1998, com. pers.).

Uno de los mayores problemas para identificar a las infecciones causadas por las AVL patógenas, es que su detección inicial no es sencilla. Para una persona no entrenada, las amibas pueden ser confundidas con leucocitos o pasar desapercibidas como simples artefactos o partículas de sedimento del mismo fluido o medio de cultivo. Y aun después ya en cultivo, su identificación no es fácil, ya que sólo se pueden diferenciar morfológicamente entre sí hasta nivel de género, y en muchos casos con cierta reserva.

Entre las técnicas confirmativas más confiables están la inmunoperoxidasa en tejido de casos *post mortem* y la inmunofluorescencia. Actualmente, en diferentes partes del mundo se han venido desarrollado técnicas inmunológicas y de biología molecular con el propósito de que el diagnóstico sea confiable y en menor tiempo.

4. ÁREA DE ESTUDIO

La Ciudad de México se localiza en el borde sur de la Mesa Central, entre los meridianos 98° 15' y 99° 30' y los paralelos 19° 00' y 20° 15'. Al norte, oriente y poniente colinda con el Estado de México y al sur con el Estado de Morelos. Se encuentra rodeada y limitada al norte por las sierras de Tezontlalpan, Tepozotlán y Pachuca con alturas máximas que no sobrepasan los 3000 m; al sur, por las sierras de Cuatzin y Chichinautzin que no rebasan los 3900 m; al poniente, por las sierras del Ajusco, Las Cruces, Monte Alto y Monte Bajo con una altitud máxima de 3600 m y al oriente, por las formaciones montañosas que se desprenden de la sierra de Pachuca y que dan origen a las antiguas lagunas de Tecocomulco, Tochac y Apan hasta las sierras de Chapulalpan, Río Frío y Nevada, de esta última sobresalen por su altitud los picos nevados del Popocatepetl y del Iztaccíhuatl con 5747 y 5286 m respectivamente. En el interior de la cuenca destacan las sierras de Santa Catarina, de Guadalupe y la Caldera al oriente, en las cuales sobresalen el volcán de Xu y el cerro del Pino, existen también prominencias aisladas como el Peñón de los Baños, el Peñón del Marqués y el Cerro de la Estrella (Moreno & Noreña, 1986).

La población de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM) en 1990 era de 14 millones 987 mil habitantes. El 55% viviendo en el Distrito Federal y el 45% en los municipios conurbados del Estado de México (PICA, 1990)

La Ciudad de México se encuentra a una altitud de 2240 m sobre el nivel del mar, aunque hay montañas con elevaciones que sobrepasan los 5000 m. La cuenca ocupa una superficie de 9600 km². La Ciudad de México es una de las áreas urbanas más grandes del mundo, está situada en la parte sur-poniente de la cuenca del Valle de México y abarca una superficie de 1200 km², equivalente al 15% del área total de la cuenca (Moreno & Noreña, 1986).

La mayor parte de la ZMCM se caracteriza por tener un clima templado. La temporada de lluvias inicia en el mes de mayo por la entrada de vientos húmedos del Golfo de México y del océano Pacífico y termina en octubre (Jáuregui, 1987). Aproximadamente el 92% del total de lluvias ocurre en ese período y un 2.9% durante el invierno. La precipitación media anual varía de 749 a 1128 mm. La temperatura oscila entre 10 y 23°C en la Ciudad de México, solamente el área del ex lago de Texcoco tiene un clima seco estepario donde la temperatura alcanza hasta 35° C en verano (PICA, 1990).

Normalmente las condiciones meteorológicas presentan variaciones dentro del Valle de México, generalmente se registran valores más altos de lluvia en las zonas montañosas y los más bajos en el noreste; la humedad relativa es mayor en las áreas periféricas, especialmente en lugares donde se conservan áreas lacustres (PICA, 1990; RAMA, 1996).

La situación geográfica del Valle de México favorece la formación de inversiones térmicas a nivel de superficie, debido a la presencia de masas de aire frío estacionarias y como consecuencia, los contaminantes se acumulan en una capa de aire poco profunda. Durante la estación fría, hay una entrada de viento continental seco que ocasionalmente está asociado con corrientes de aire polar que limpian temporalmente la contaminación del aire de la Ciudad de México. La ventilación se favorece por el calentamiento solar del suelo que produce movimientos verticales del aire que producen vientos moderados y fuertes. Estos fenómenos disminuyen el efecto de las inversiones térmicas (SEDUE, 1986; Rosas *et al.*, 1995).

Durante el verano la calidad del aire mejora notablemente por el lavado de la atmósfera causado por las lluvias. Los vientos dominantes durante el día y a lo largo del año llegan del noreste, con velocidades medias superficiales de 2 m/s. Durante la noche, los vientos fríos de las montañas descienden hacia el valle (SEDUE, 1986; PICA, 1990).

La creciente urbanización del área urbana y el consumo de energéticos, han modificado notablemente el microclima de la Ciudad de México, especialmente el régimen de lluvias, el patrón de circulación del viento y la temperatura. Las islas de calor de la ciudad registran diferencias de hasta 12°C entre la ciudad y las áreas suburbanas y rurales de los alrededores. Este fenómeno provoca movimientos ascendentes de aire contaminado del centro de la ciudad, que después se dispersan o descienden en los alrededores inmediatos de la ciudad (PICA, 1990).

El problema de la contaminación del aire de la ZMCM por el polvo de las tolveneras, es un problema antiguo que se ha agudizado en los últimos 50 años. Con el propósito de frenar el crecimiento de la contaminación del aire, en 1990 por instancia gubernamental, se creó el Programa Integral contra la Contaminación Atmosférica (PICA). Una de sus primeras acciones fue evaluar la calidad del aire que permitiera contar con un inventario actualizado de las emisiones contaminantes. Actualmente, la red consta de 32 estaciones de monitoreo automático y una red manual con 19 estaciones más. La red manual mide contaminantes gaseosos; mientras que la manual mide partículas y metales pesados (PICA, 1990; RAMA, 1995, 1996).

En el presente estudio, con el propósito de cubrir los cuatro puntos cardinales de la ZMCM, se seleccionaron las siguientes estaciones de la Red de monitoreo atmosférico (fig.1):

- Zona Noroeste (NO) Tlalnepantla
- Zona Suroeste (SO) Pedregal
- Zona Noreste (NE) Xalostoc
- Zona Sureste (SE) Cerro de la Estrella

De acuerdo a las modificaciones a la clasificación de Köppen realizadas por García (1988), las estaciones NE y SE están caracterizadas por tener el mismo tipo de clima Cb (wo)(w)(i)g o sea templado subhúmedo (el más seco de los subhúmedos) con lluvias en verano. La estación NO tiene un clima Cb (wo)(w)(i)gw", es decir templado subhúmedo (uno de los más secos de los subhúmedos), con verano fresco y lluvioso y con la estación más seca en invierno. La estación SO localizada en el Pedregal tiene un clima Cb (w2)(w)(i) o sea templado subhúmedo (el más húmedo de los subhúmedos), con un verano largo, fresco y lluvioso.

Debido a la heterogeneidad de la Ciudad de México (clima, densidad de población, uso de la tierra, etc.); Rapoport *et al.*, (1983) calcularon por delegación política los índices de urbanización (I_U) de acuerdo a la fórmula:

$$I_U = \text{área urbanizada} / \text{área total}$$

Este índice representa el porcentaje de espacio construido. En algunas zonas de la Ciudad de México como es el caso del centro histórico, el 100% está construido, por lo que el I_U de la zona es 1.0.

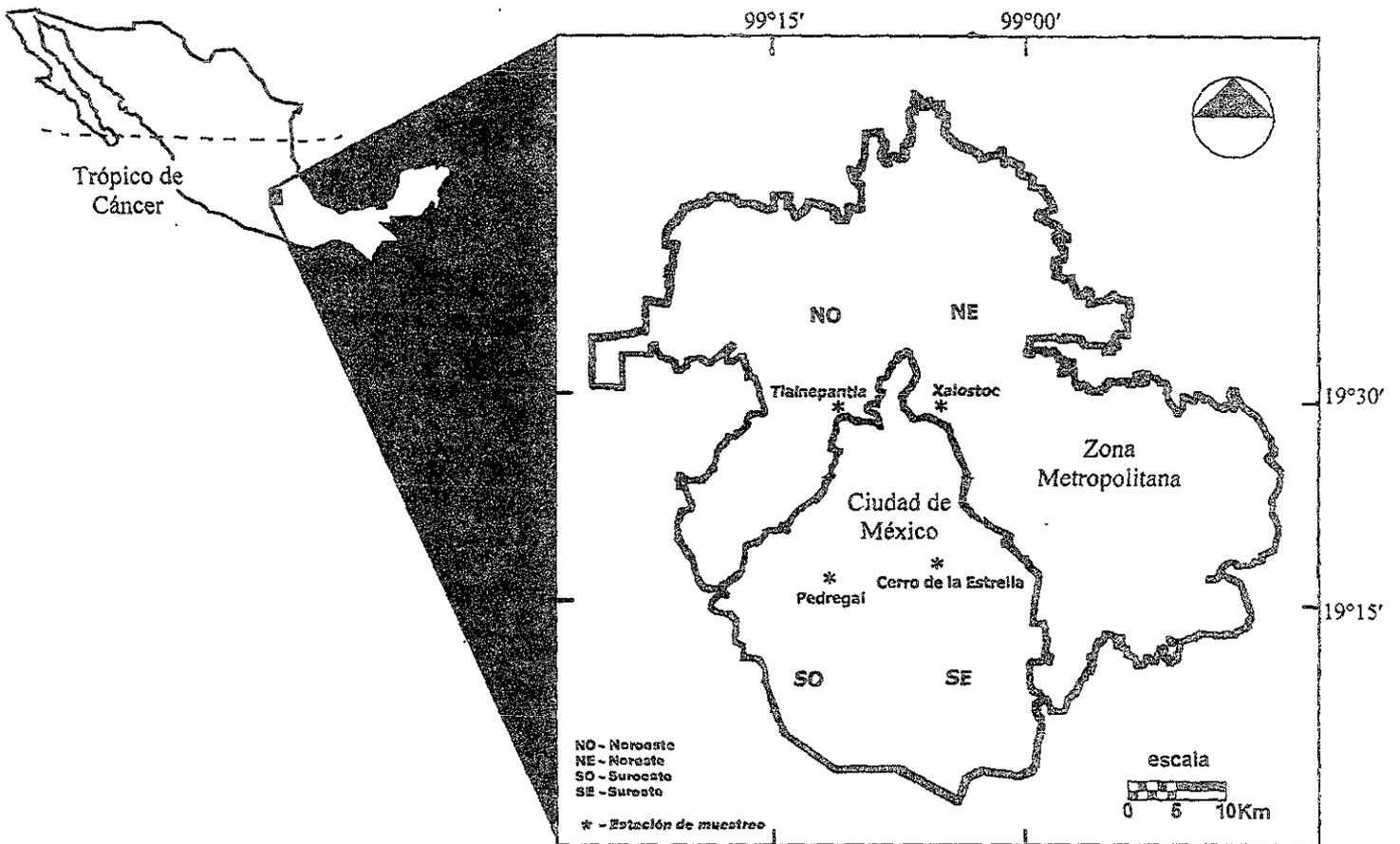


Fig. 1 Ubicación de las estaciones de muestreo

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el aislamiento de amibas de vida libre de la atmósfera de la ZMCM, se realizaron 12 muestreos mensuales de febrero de 1988 a enero de 1989 para lo cual, se ubicaron cuatro estaciones de muestreo junto a estaciones de monitoreo atmosférico, por lo tanto, se realizaron 48 muestreos en total. Los parámetros ambientales considerados para este estudio fueron: temperatura del ambiente, humedad relativa, velocidad del viento y partículas suspendidas totales (PST). Estos datos fueron proporcionados por la SEDUE (hoy SEMARNAP).

Se utilizaron los índices de urbanización (I_U) calculados por Rapoport *et al.*, (1983).

5.1. Muestreo de aire

Para recolectar las amibas (quistes y/o trofozoítos) del aire se utilizó un muestreador volumétrico "burbujeador" (fig. 2) con medio basal de Bold (MBB)(Bold & Wynne, 1978) (Anexo A). Se utilizó una bomba de succión de ½ HP con flujo de 19.6 L/min durante una hora. Los muestreadores se colocaron sobre una torre a 5 y 2 m sobre el nivel del suelo de las 11:00 a las 12:00 horas.

En el caso de que lloviera durante el muestreo, el agua de lluvia se recolectó en matraces Erlenmeyer de 1 litro, previamente esterilizados. Con ayuda de un soporte universal, el matraz se mantuvo suspendido a una altura aproximada de 30 cm, con el propósito de evitar que se introdujeran partículas del suelo como producto del choque de la lluvia contra el mismo. Las muestras se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente.

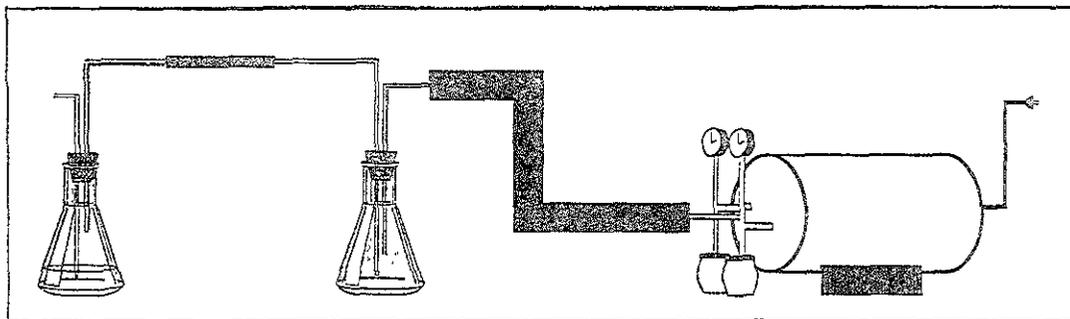


Fig 2. Muestreador volumétrico "burbujeador"
(Rivera *et al.*, 1987)

Una vez en el laboratorio las muestras se mantuvieron en el MBB, a temperatura ambiente durante 7 días antes de la siembra en medio de cultivo monoxénico, con el propósito de favorecer la rehidratación de los quistes y la recuperación de los trofozoítos. Al final de este capítulo se incluye un diagrama que muestra de forma resumida los métodos empleados en este estudio (esquema 2).

5.2. Aislamiento y cultivo

Cultivo monoxénico. Después del período de rehidratación, cada una de las muestras se centrifugó a 2 000 rpm durante 10 minutos (Centrífuga Beckman TJ-6), se desechó el sobrenadante y se concentró el sedimento en 2 ml, los cuales se agitaron para homogeneizarlos y se distribuyeron en la superficie de dos placas conteniendo medio agar no nutritivo con *Escherichia coli* muerta (NNE) (De Jonckheere, 1977; Page, 1988) (Anexo A).

Las placas se guardaron en forma invertida en bolsas de plástico y se incubaron durante 24 horas a temperatura ambiente (20-22°C) y a 37°C respectivamente. Esta última temperatura tuvo el propósito de favorecer a las amibas patógenas, ya que se desarrollan mejor a temperaturas altas. Al mismo tiempo, como testigo se prepararon dos cajas Petri con medio NNE y dos con medio basal de Bold, y se incubaron en las mismas condiciones a las diferentes temperaturas.

Después de la incubación, las placas se observaron diariamente durante 15 días con un microscopio invertido (Zeiss, Mod. D, con oculares 10× y objetivos 10× y 20×). De cada placa se separaron las colonias de amibas, se subcultivaron nuevamente en medio NNE y se incubaron a la misma temperatura a la que se aislaron. Posteriormente, para mantener las amibas aisladas se hicieron subcultivos semanales. El manejo de las muestras se llevó a cabo con material previamente esterilizado y en una campana con flujo laminar.

Cultivo Axénico. De los cultivos monoxénicos se seleccionó una zona con abundante crecimiento amibiano en estado de trofozoíto; se cortaron bloques de medio NNE de aproximadamente 1 cm² y se transfirieron a tubos de cultivo conteniendo medio PBSGM (Chang modificado por Rivera *et al.*, 1987) (Anexo A). Los cultivos en este medio se incubaron a 30°C en posición inclinada. El crecimiento de las amibas se observó con el microscopio invertido.

Debido a que algunas amibas no se desarrollaron en el medio PBSGM se probaron los siguientes medios de cultivo axénicos: medio bactocasitona (BC) al 2%, medio de infusión cerebro y corazón (0.38 g/100 ml de agua destilada) con 10% de suero de bovino y en medio líquido de Ringer con *E. coli* inactivada (Cerva, 1969; Page, 1988; Martínez, 1985).

5.3. Determinación taxonómica

a) Morfológica

La determinación morfológica de las amibas se realizó con ayuda de un microscopio de contraste de fases (Zeiss Mod. III), mediante la observación tanto de trofozoítos como de quistes en diferentes fases de maduración. Se realizaron preparaciones *in vivo* a partir de cultivos axénicos o de placas de agar NNE por barrido con solución salina de Page y utilizando las claves taxonómicas de Pussard & Pons (1977), Page (1976, 1988) y la guía ilustrada de Lee *et al.*, (1985).

- **Morfometría.** Se hicieron preparaciones en fresco en laminillas de vidrio y se observaron en contraste de fases a un aumento de 40×. Se registró la medida de 50 trofozoítos (largo, ancho y diámetro del núcleo) y de 50 quistes (diámetro, largo y ancho si es el caso), incluyendo el promedio. Se registraron las diferentes formas del trofozoíto, así como cualquier característica relevante (Page, 1988).

- **Transformación ameboflagelar.** Esta prueba se realiza como parte de la determinación taxonómica, cuando se sospecha que alguna amiba pertenece a alguno de los géneros con fase flagelada en su ciclo de vida (*Naegleria*, *Willaertia*, *Adelphamoeba*, *Tetramitus* o *Tetramastigamoeba*). Esta prueba se realizó con todas las amibas aisladas, excepto las que evidentemente pertenecían al género *Acanthamoeba*. La prueba consiste en colocar aproximadamente ½ ml de agua destilada o solución Page (Page, 1988) en la superficie de una placa de NNE con abundante crecimiento amibiano en estado de trofozoíto, la cual se incubó a 37°C. Con la ayuda de un microscopio invertido se procede a observar las placas cada ½ hora, por lo menos, durante 8 horas, o hasta que se observen formas flageladas.

- **Tolerancia a la temperatura.** Esta prueba se realiza para conocer la temperatura máxima y óptima de crecimiento de las amibas aisladas. Cada uno de los aislamientos se sembró por cuatuplicado en medio NNE y se incubó a temperatura ambiente (20-22°C), 37, 42 y 45°C. En esas condiciones las placas se observaron con el microscopio invertido durante una semana para verificar el desarrollo amibiano.

b) Análisis de isoenzimas y proteínas totales

Esta prueba se utiliza para verificar el diagnóstico morfológico de las amibas y así, establecer un diagnóstico más preciso que permita ubicarlas a nivel de especie. Se basa en la comparación de los patrones enzimáticos de las amibas en estudio con amibas de referencia.

Para realizar este análisis se usa la técnica de isoelectroenfoque (IEF) (Anexo B), la cual consiste en la separación de los componentes de una enzima presentes en el extracto crudo de cada amiba sobre un sustrato de agarosa con un anfolito. Al hacer pasar una corriente eléctrica de alto voltaje sobre dicho sustrato con el extracto amibiano, debido a las

propiedades del anfólito, se genera un gradiente de pH sobre la agarosa y las proteínas de las amibas migran hasta alcanzar su punto isoeléctrico. Con el revelador específico se hacen visibles las bandas enzimáticas que responden a un sustrato específico, de manera que las enzimas de cada microorganismo problema puedan ser comparadas con las enzimas de las cepas amibianas de referencia.

Siguiendo el procedimiento descrito por De Jonckheere (1982, 1983), la técnica se llevó a cabo con un equipo para isoelectroenfoque (Pharmacia Fine Chemicals), compuesto por una base para corrimiento con placa refrigerada de 250 × 250 mm (Mod. FBE 3000), fuente de poder constante (ECPS 3000/150), tabla de nivelación, un integrador de voltaje (VH-1) y marcos de acrílico para formar geles con sujetadores. Se determinaron las siguientes enzimas:

- Propionil esterasa (PE) pH 4-6.5
- Propionil esterasa (PE) pH de 3-10
- Malato deshidrogenasa (MDH) pH 3-10
- Proteínas totales (PT) pH 3-10

Debido a que esta prueba es muy sensible, sólo se realizó con los aislamientos que lograron axenizarse, ya que las proteínas de las bacterias de los cultivos monoxénicos podrían interferir y de esa manera, incurrir en resultados falsos.

Para realizar el análisis de isoenzimas se utilizaron las siguientes cepas de referencia obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) y del Catálogo de Colección del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) de la ENEP-Iztacala-UNAM.

<u>Cepa</u>	<u>Clave de catálogo</u>
<i>A. castellanii</i>	A-C
<i>A. castellanii</i>	Neff
<i>A. divionensis</i>	AA-1
<i>A. griffini</i>	S-7
<i>A. hatchetti</i>	BH2
<i>A. lugdunensis</i>	García
<i>A. lugdunensis</i>	SH-565
<i>A. mauritaniensis</i>	1652
<i>A. mauritaniensis</i>	SH-197
<i>A. palestinensis</i>	2802
<i>A. polyphaga</i>	queratitis
<i>A. polyphaga</i>	polyphaga
<i>A. polyphaga</i>	P-23
<i>A. quina</i>	Ll-a
<i>A. rhyodes</i>	R4C

5.4. Prueba de Patogenicidad

Esta prueba se usa para determinar si una amiba es capaz de provocar enfermedad en animales de laboratorio, con el fin de hacer inferencias de su posible patogenicidad en los humanos, para lo cual se utilizó el método descrito por Cerva (1971).

La patogenicidad de las amibas aisladas se determinó primero por inoculación intracerebral (IC), para lo cual se utilizó un cultivo amibiano axénico en fase exponencial, concentrado por centrifugación a 2 500 rpm durante 10 min, debiendo alcanzar una concentración de 10 000 a 1 000 000 células amibianas en 0.02 ml de medio.

El concentrado se tomó con una aguja para insulina y se inoculó a un grupo de cinco ratones (CD-1) -machos, blancos, recién destetados y de tres semanas de edad-, por cada aislamiento amibiano a probar. A cada ratón se le inoculó un volumen de 0.02 ml del concentrado. La aplicación por vía IC se realizó a través de los huesos parietales o de la articulación interparietal, hacia la línea media del cráneo o a la altura de las orejas. De forma paralela, como testigo se inoculó un lote de cinco ratones con medio de cultivo sin amibas

Los ratones inoculados se observaron durante 21 días y se registraron los cambios en su comportamiento, así como la fecha y el número de ratones muertos. Los ratones que sobrevivieron los 21 días, así como los ratones testigo, se sacrificaron y se les extrajo el cerebro, se colocó en medio NNE y se incubaron a 30°C, con el propósito de determinar si hubo desarrollo amibiano en ese órgano.

Las amibas consideradas como patógenas por inoculación IC, se probaron por vía nasal (IN), utilizando el mismo procedimiento para la concentración de las amibas. Con una jeringa de 1 ml se colocaron dos gotas (0.02 ml) de la suspensión amibiana en las fosas nasales del ratón. Paralelamente, y siguiendo el mismo procedimiento se inocularon ratones testigo. Se extrajeron porciones de cerebro, corazón, pulmón, hígado y riñón, tanto de los ratones muertos como de los sacrificados, y se colocaron en medio NNE .

Esta prueba se realiza utilizando cultivos axénicos, sin embargo, debido a que -a excepción de las acantamebas-, las especies restantes no se desarrollaron en los medios axénicos probados, se procedió a realizar lo siguiente:

Cada uno de los aislamientos amibianos se sembró por quintuplicado o sextuplicado en medio NNE, se incubó a la temperatura de aislamiento original y 24 horas más tarde, o al observarse el máximo desarrollo de trofozoítos, se concentraron agregando 1 ml de agua destilada estéril en cada una de las cajas Petri. Con una pipeta Pasteur previamente esterilizada, los trofozoítos se pasaron a un tubo de cultivo también esterilizado.

Con el propósito de eliminar el mayor número de bacterias procedentes del medio NNE, cada uno de los tubos se centrifugó a 2 000 rpm durante 5 min, se desechó el sobrenadante, se agregó agua destilada esterilizada y se repitió el proceso dos veces más. Después del último lavado se extrajo el sobrenadante. A partir de este concentrado se procedió a continuar con el mismo procedimiento de los cultivos axénicos.

5.5. Análisis estadístico

Debido a que los datos biológicos no mostraron una distribución normal, se aplicaron métodos no paramétricos usando el paquete estadístico Statgraph (Steel & Torrie, 1988).

Para establecer si existían diferencias significativas en el número de aislamientos amibianos, entre:

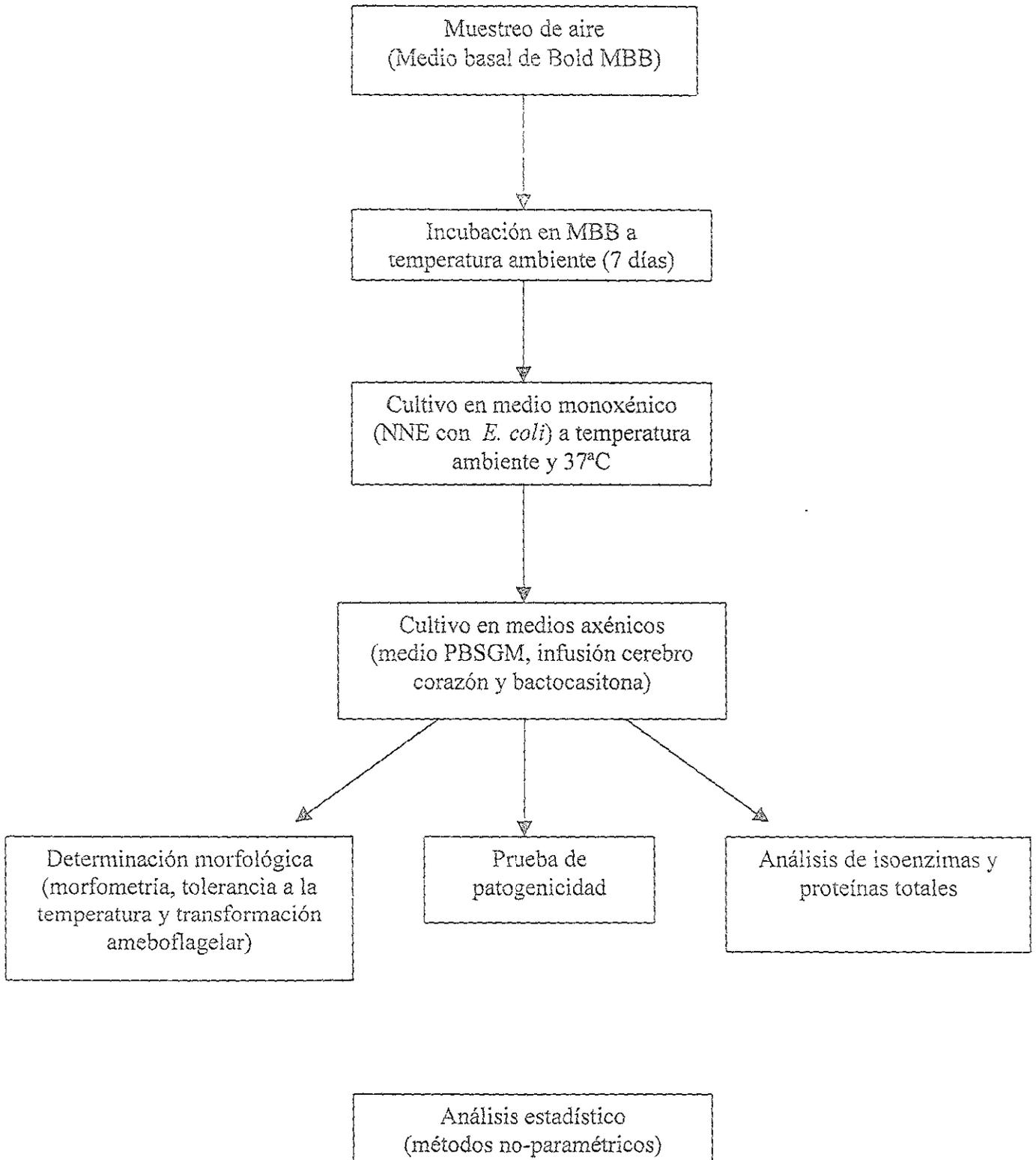
- las temporadas de lluvia y secas
- las dos temperaturas de incubación
- las dos alturas de muestreo

se realizó un análisis de U-Mann-Whitney (Steel & Torrie, 1988) con un nivel de confianza del 95%.

Con el mismo propósito, se realizó un análisis de Kruskal-Wallis (Steel & Torrie, 1988) entre las cuatro estaciones de muestreo. Adicionalmente se realizó un análisis de caja y bigote entre los aislamientos amibianos de las 4 estaciones de muestreo para establecer los grupos de datos diferentes.

Para conocer la relación entre las amibas aisladas y las aeropartículas (PST) y la temperatura, se determinaron coeficientes de correlación de Spearman (Steel & Torrie, 1988). Se realizó un análisis global y uno por estación de muestreo.

Esquema 2. Métodos empleados



6. RESULTADOS

De los 48 muestreos totales de aire que se realizaron en la zona metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM), se obtuvieron 108 aislamientos de AVL (tabla 2).

Los 108 aislamientos de AVL se encuentran agrupados en 12 géneros y distribuidos en 29 especies. A excepción de la especie *Mastigamoeba reptans* (ubicada transitoriamente en la clase Eumycetozoea por Lee *et al.*, 1985), todas las AVL aisladas pertenecen a la clase Lobosea. Su ubicación taxonómica se muestra en la tabla 1.

La frecuencia y heterogeneidad de las AVL aisladas fue muy semejante en los dos niveles muestreados. A 2 m sobre el nivel del suelo se obtuvo el 53.7 % de los aislamientos, el 45.3 % a 5 m y el 0.03 % de agua de lluvia (tabla 2). El análisis estadístico U-Mann-Whitney mostró que no hubo diferencias significativas ($Z = 0.47$, $p > 0.05$) entre los dos niveles.

Con respecto a la temperatura de incubación, el 60.2 % de los aislamientos se obtuvo a temperatura ambiente y el 39.8 % por incubación a 37°C (tabla 2). El análisis estadístico U-Mann-Whitney mostró que no hubo diferencias significativas ($Z = 1.55$, $p > 0.05$) entre ambas temperaturas.

La frecuencia de aparición de las AVL considerando todas las estaciones de muestreo, fue mayor en la época de sequía (63.9 %) que en la de lluvia (36.1 %). El análisis U-Mann-Whitney mostró que entre las dos épocas sí hubo diferencias significativas ($Z = 2.09$, $p < 0.05$). En la época de secas, se obtuvo una mayor heterogeneidad de especies, y la de géneros al contrario, resultó ser un poco menor (tabla 3).

Con respecto a los parámetros meteorológicos, las temperaturas del aire más altas se registraron en los meses de abril, mayo y junio y las más bajas de noviembre a febrero. En promedio, los valores más altos se registraron en la estación NO (31°C la máxima) y los más bajos en la estación SO (14.6° C la mínima) (tablas 4-5; fig. 3).

Los datos de humedad relativa y velocidad del viento están incompletos por lo que no fue posible realizar un análisis estadístico que aportara información con respecto a una posible correlación con las amibas aisladas. No obstante lo anterior, se puede observar que en la estación NE (Xalostoc), se registraron los valores más bajos de humedad relativa (tablas 5-8).

El I_U de cada estación de muestreo, es el siguiente (Rapoport *et al.*, 1983):

Tlalnepantla (NE) = 0.65

Cerro de la Estrella (SE) = 0.53

Xalostoc (NO) = 0.65

Pedregal (SO) = 0.25

Los valores registrados de las aeropartículas (PST) fueron muy altos, especialmente en las estaciones NE y SE, es decir en el oriente de la ZMCM. La estación NE durante todo el período de muestreo excedió la Norma Oficial Mexicana ($275 \mu\text{m}/\text{m}^3$ promedio de 24 horas hasta 1994 y $260 \mu\text{g}/\text{m}^3$ a partir de 1995) (RAMA, 1996). Únicamente en la estación SO, en ninguno de los 12 muestreos se excedió la norma oficial (tablas 4-5; fig. 3).

Por estación de muestreo, entre las variables ambientales (PST, temperatura) y el número de aislamientos y especies, el coeficiente de correlación de Spearman mostró que no hubo correlación significativa ($p > 0.05$).

Considerando los datos totales de las estaciones de muestreo, el análisis de correlación de Spearman mostró relación entre el número de aislamientos y las PST (0.54, $p < 0.05$), así como entre el número de especies y las PST (0.53, $p < 0.05$). Utilizando el mismo método estadístico se demostró que no hubo correlación significativa entre los aislamientos ambientales y la temperatura (tabla 6).

En general, la frecuencia de aparición de AVL fue mayor de diciembre a febrero, y la menor de marzo a agosto. En febrero se obtuvo el mayor número de aislamientos (17) y el menor en agosto (4). Asimismo, en la estación NE se obtuvo la mayor frecuencia de AVL, durante todos los meses del año. La menor frecuencia se observó en la estación NO y únicamente durante febrero y enero (fig. 3).

Con respecto a los aislamientos totales, el género mejor representado fue *Acanthamoeba* con 51, seguido por *Vahlkampfia* con 23, *Hartmannella* con 11 y *Filamoeba* con 9, los restantes con 3 o menos (figs. 4, 10, 11).

Por estación de muestreo, la frecuencia de aislamientos en orden decreciente fue; NE (Xalostoc) con 59, SE (Cerro de la Estrella) con 31, NO (Tlalnepantla) con 10 y SO (Pedregal) con 8 (figs. 4-5; tabla 7). Mediante el análisis de Kruskal-Wallis, se corroboró que la diferencia entre las cuatro estaciones de muestreo fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

En la estación NE, se obtuvo la mayor frecuencia y heterogeneidad de géneros. La menor frecuencia se registró en la estación SO y la menor heterogeneidad en la estación NO (fig. 4; tabla 7).

Con respecto a la distribución de los géneros ambientales obtenidos en cada una de las estaciones de muestreo, en la figura 7, se observa que *Acanthamoeba* y *Vahlkampfia* estuvieron presentes en las cuatro estaciones. *Filamoeba* y *Hartmannella* en tres, *Echinamoeba*, *Naegleria* y *Platyamoeba* en dos y *Adelphamoeba*, *Dactylamoeba*, *Mastigamoeba*, *Mayorella* y *Rosculus* únicamente en una.

Las especies de los géneros *Acanthamoeba*, *Filamoeba*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia* se presentaron prácticamente durante todo el año de muestreo; aunque a excepción de *Hartmannella*, la mayor frecuencia se registró durante la época de sequía (fig. 6).

En el caso de *Adelphamoeba*, *Dactylamoeba*, *Echinamoeba*, *Mastigamoeba* y *Naegleria* no es posible hablar de un patrón estacional, debido al escaso número de aislamientos durante el año de estudio; no obstante, es interesante señalar que se aislaron únicamente en la época húmeda del año, así como *Mayorella* y *Rosculus* solamente en la época de sequía (fig. 6).

Acanthamoeba rhyodes con 24 aislamientos, fue la especie que se aisló con mayor frecuencia, seguida por *A. polyphaga* y *Filamoeba nolandi* con 9, después *A. divionensis* y *H. cantabrigiensis* con 6, *H. vermiformis* con 5 y las restantes con menos de 4 (tabla 7).

En la prueba de patogenicidad de las amibas pertenecientes al género *Acanthamoeba* se observaron diferentes grados de virulencia e incluso algunas mostraron no ser patógenas (tabla 8). Se considera patógeno un aislamiento amibiano, cuando la mortalidad de los ratones inoculados vía IC, alcanza el 50 % o más (De Jonckheere, 1980). De acuerdo a este criterio, el 51 % de las acantamebas probadas durante este estudio, resultaron ser patógenas, lo cual significa que el 24 % del total de aislamientos son potencialmente patógenos para el hombre.

En el caso de las amibas diferentes a *Acanthamoeba*, -a las que también se les practicó la prueba de patogenicidad-, en todos los casos el resultado fue negativo, es decir, ninguna mostró ser patógena.

La identificación por isoenzimas se llevó a cabo únicamente con las amibas pertenecientes al género *Acanthamoeba*, ya que la técnica es muy sensible y para evitar resultados falsos por la bacteria de los cultivos monoxénicos, solamente se utiliza con las amibas en cultivo axénico.

Con el propósito de seleccionar a los aislamientos de *Acanthamoeba* que fueran diferentes entre sí, se realizó un análisis preliminar de proteínas totales y la enzima propionil esterasa con los 51 aislamientos identificados morfológicamente como pertenecientes a ese género. Como resultado de este análisis se seleccionaron 15 aislamientos y junto con las amibas de referencia se llevó a cabo la comparación de proteínas totales (PT) (pH 3-10), malato deshidrogenasa (MDH) (pH 3-10) y propionil esterasa (PE) (pH 3-10 y 4-6.5) (figs. 8-9).

Tabla 1. Ubicación Taxonómica de las AVL aisladas de la atmósfera de la ZMCM (Levine *et al.*, 1980)

- Reino Protista Haeckel, 1866
 Subreino Protozoa Goldfuss, 1818 emend. von Siebold, 1846
 Phylum Sarcomastigophora Honigberg & Balamuth, 1963
 Subphylum Sarcodina Schmarda, 1871
 Superclase Rhizopoda von Siebold, 1845
 Clase Lobosea Carpenter, 1861
 Subclase Gymnamoebia Haeckel, 1862
 Orden Amoebida Ehrenberg, 1830
 Suborden Tubulina Bovee & Jahn, 1966
 *Familia Hartmannellidae Volkonsky, 1931; emend. Page, 1974
 Género *Hartmannella* Alexeiff, 1912; emend. Page, 1974
H. cantabrigiensis Page, 1974
H. vermiformis Page, 1974
 Suborden Thecina Bovee & Jahn, 1966
 Familia Discamoebidae Jahn, Bovee & Griffith, 1974
 Género *Platyamoeba* Page, 1968
P. placida (Page, 1968)**
P. stenopodia Page, 1969
 Suborden Flabellina Page, 1976
 Familia Flabellulidae Bovee, 1970
 Género *Rosculus* Hawes, 1963
R. ithacus Hawes, 1963**
 Suborden Conopodina Bovee & Jahn, 1966
 Familia Mayorellidae Schaeffer, 1926
 Género *Mayorella* Schaeffer, 1926
M. spatula Bovee, 1970**
 Género *Dactylamoeba* Korotneff, 1880
D. stella (Schaeffer, 1926)**
 Suborden Acanthapodina Page, 1976
 Familia Acanthamoebidae Sawyer & Griffin, 1975
 Género *Acanthamoeba* Volkonsky, 1931; emend. Page, 1967
A. castellanii (Douglas, 1930)
A. culbertsoni (Singh & Das, 1970)

A. divionensis Pussard & Pons, 1977**
A. hatchetti Sawyer, Visvesvara & Harke, 1977**
A. polyphaga (Puschkarew, 1913)
A. quina Pussard & Pons, 1977**
A. rhysodes (Singh, 1952)

Familia Echinamoebidae Page, 1975

Género *Filamoeba* Page, 1967

F. nolandi Page, 1967**

Género *Echinamoeba* Page, 1975

E. exundans (Page, 1967)

Orden Schizopyrenida Singh, 1952

Familia Vahlkampfiidae Jollos, 1917; Zulueta, 1917

Género *Naegleria* Alexeiff, 1912; emend. Calkins, 1913

N. gruberi Schardinger 1899

Género *Adelphamoeba* Napolitano, Wall & Ganz, 1970

A. galeacystis Napolitano, Wall & Ganz, 1970

Género *Vahlkampfia* Chatton & Lalung-Bonnaire; 1912
emend. Page, 1967

V. aberdonica Page, 1974**

V. avara Page, 1967**

V. debilis Jollos, 1917

V. enterica Page, 1974**

V. inornata Page, 1967**

V. jugosa Page, 1976

V. lobospinosa (Craig, 1912)**

V. russelli (Singh, 1952)

V. ustiana Page, 1974

V. vahlkampfi (Chatton, 1910)**

Clase Eumycetozoa Zopf, 1884

Género *Mastigamoeba* Schulze, 1875**/ ***

M. reptans Stokes

* Para la descripción de las familias, se siguió la clasificación de Lee *et al.*, (1985), y la de Page (1976, 1988)

** Especies que se citan por primera vez de la atmósfera de la República Mexicana

*** Lee *et al.*, (1985) incluyeron transitoriamente a este género en la clase Eumycetozoa y Cortliss (1994a), lo ubicó como sigue:

Reino Arquezoa

Phylum Archamoebae Cavalier-Smith, 1983

Clase Pelobiontea Page, 1976

Tabla 2. Frecuencia de aparición de las AVL de acuerdo a la altura de muestreo y temperatura de incubación

Muestreo No.	Estación de muestreo	Aislamiento	Altura de muestreo (m)	Temperatura de incubación (°C)	
I (Febrero)	NE	<i>Acanthamoeba divionensis</i>	5	ta*	
		<i>A. polyphaga</i>	5	37	
		<i>A. polyphaga</i>	2	ta	
		<i>A. quina</i>	2	ta	
		<i>A. rhyodes</i>	2	ta	
		<i>A. rhyodes</i>	2	37	
		<i>A. rhyodes</i>	5	ta	
		<i>Filamoeba nolandi</i>	2	ta	
		<i>Mayorelia spatula</i>	2	ta	
		<i>Vahikampfia debilis</i>	2	37	
		<i>V. jugosa</i>	2	ta	
	SE	<i>A. rhyodes</i>	2	ta	
		<i>A. rhyodes</i>	2	ta	
		<i>A. rhyodes</i>	2	ta	
NO	<i>A. rhyodes</i>	2	ta		
	<i>A. rhyodes</i>	5	37		
II (Marzo)	NE	<i>F. nolandi</i>	5	ta	
		<i>V. ustiana</i>	5	ta	
		<i>A. polyphaga</i>	5	ta	
		<i>A. quina</i>	2	ta	
		<i>A. rhyodes</i>	5	37	
		<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	2	37	
		<i>H. cantabrigiensis</i>	5	ta	
		<i>V. vahlkampfi</i>	2	37	
		SE	<i>A. polyphaga</i>	2	ta
			<i>A. rhyodes</i>	5	ta
			<i>A. rhyodes</i>	5	ta
	<i>A. rhyodes</i>		5	ta	
	<i>A. rhyodes</i>		5	37	
	SO	<i>A. rhyodes</i>	2	ta	
III (Abril)	NE	<i>A. castellanii</i>	2	ta	
		<i>A. castellanii</i>	2	ta	
		<i>A. hatchetti</i>	2	ta	
		<i>A. hatchetti</i>	2	37	
	SO	<i>A. rhyodes</i>	2	ta	
		<i>H. cantabrigiensis</i>	5	ta	
		<i>V. aberdonica</i>	5	ta	
	<i>V. vahlkampfi</i>	2	ta		

IV (Mayo)	NE	<i>A. divionensis</i>	5	ta
		<i>A. hatchetti</i>	2	ta
		<i>A. rhysodes</i>	2	37
		<i>Echinamoeba exundans</i>	5	37
	SE	<i>A. polyphaga</i>	5	ta
		<i>A. rhysodes</i>	5	37
	SO	<i>V. vahlkampfi</i>	5	ta
V (Junio)	NE	<i>A. quina</i>	2	ta
		<i>Mastigamoeba reptans</i>	2	ta
		<i>M. reptans</i>	2	ta
	SE	<i>A. rhysodes</i>	2	ta
<i>A. rhysodes</i>		2	37	
VI (Julio)	NE	<i>A. polyphaga</i>	5	ta
		<i>Naegleria gruberi</i>	2	37
		<i>V. lobospinosa</i>	5	37
		<i>V. russelli</i>	2	ta
		<i>V. russelli</i>	2	ta
VII (Agosto)	NE	<i>H. cantabrigiensis</i>	5	ta
	SE	<i>E. exundans</i>	5	ta
		<i>N. gruberi</i>	5	ta
	SO	<i>Dactylamoeba stella</i>	lluvia	ta
VIII (Septiembre)	NE	<i>F. nolandi</i>	5	ta
		<i>F. nolandi</i>	5	37
		<i>Platyamoeba placida</i>	5	37
		<i>V. enterica</i>	2	ta
		<i>V. inornata</i>	2	37
	SE	<i>E. exundans</i>	2	ta
		<i>P. stenopodia</i>	2	37
IX (Octubre)	NE	<i>V. lobospinosa</i>	2	37
		<i>H. cantabrigiensis</i>	2	ta
		<i>H. vermiformis</i>	2	ta
		<i>H. vermiformis</i>	2	37
		<i>H. vermiformis</i>	2	37
	SE	<i>V. enterica</i>	5	37
		<i>A. divionensis</i>	5	ta
		<i>A. polyphaga</i>	2	ta
		<i>Adelphamoeba galeacystis</i>	5	37
		<i>H. vermiformis</i>	2	37
		<i>V. enterica</i>	2	37

X (Noviembre)	NE	<i>A. rhyodes</i>	5	ta	
		<i>Rosculus ithacus</i>	5	ta	
		<i>V. enterica</i>	5	ta	
	SE	<i>A. castellanii</i>	5	37	
		<i>A. polyphaga</i>	5	37	
		<i>P. stenopodia</i>	5	37	
XI (Diciembre)	NE	<i>A. culbertsoni</i>	5	37	
		<i>A. divionensis</i>	5	37	
		<i>A. divionensis</i>	2	ta	
		<i>A. hatchetti</i>	2	37	
		<i>A. rhyodes</i>	2	ta	
		<i>A. rhyodes</i>	5	ta	
		<i>A. rhyodes</i>	5	ta	
	SE	<i>V. aberdonica</i>	5	ta	
		<i>F. nolandi</i>	2	37	
		<i>F. nolandi</i>	5	ta	
		<i>F. nolandi</i>	5	37	
XII (Enero)	NE	<i>V. enterica</i>	2	37	
		<i>V. inornata</i>	5	37	
		<i>A. polyphaga</i>	5	37	
			<i>H. cantabrigiensis</i>	2	37
			<i>H. vermiformis</i>	2	ta
			<i>V. lobospinosa</i>	2	37
		SE	<i>F. nolandi</i>	2	ta
			<i>F. nolandi</i>	2	37
		NO	<i>A. divionensis</i>	2	37
			<i>A. quina</i>	2	ta
			<i>A. rhyodes</i>	2	ta
<i>A. rhyodes</i>			2	37	
<i>V. avara</i>			5	37	
<i>V. lobospinosa</i>	5		ta		
	<i>V. lobospinosa</i>	5	ta		

*ta = temperatura ambiente

NE = Xalostoc

NO = Tlalnepantla

SE = Cerro de la Estrella

SO = Pedregal

Tabla 3. Frecuencia de aparición de las especies de AVL en las diferentes épocas del año*

Aislamiento	Lluvias	Secas
<i>Acanthamoeba castellanii</i>		3
<i>A. culbertsoni</i>		1
<i>A. divionensis</i>	2	4
<i>A. hatchetti</i>	1	3
<i>A. polyphaga</i>	3	6
<i>A. quina</i>	1	3
<i>A. rhyodes</i>	4	20
<i>Adelphamoeba galeacystis</i>	1	
<i>Dactylamoeba stella</i>	1	
<i>Echinamoeba exundans</i>	3	
<i>Filamoeba nolandi</i>	2	7
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>	2	4
<i>H. vermiformis</i>	4	1
<i>Mastigamoeba reptans</i>	2	
<i>Mayorella spatula</i>		1
<i>Naegleria gruberi</i>	2	
<i>Platyamoeba placida</i>	1	
<i>P. stenopodia</i>	1	1
<i>Rosculus ithacus</i>		1
<i>Vahlkampfia aberdonica</i>		2
<i>V. avara</i>		1
<i>V. debilis</i>		1
<i>V. enterica</i>	3	2
<i>V. inornata</i>	1	1
<i>V. jugosa</i>		1
<i>V. lobospinosa</i>	2	3
<i>V. russelli</i>	2	
<i>V. ustiana</i>		1
<i>V. vahlkampfi</i>	1	2
Total de aislamientos	39	69
Géneros aislados	10	7
Especies aisladas	20	22

Z = 2.09

p < 0.05

*Época de lluvia de mayo a octubre y de secas de noviembre a abril (Jáuregui, 1987)

Tabla 4. Parámetros meteorológicos y aeropartículas durante el período de muestreo en la zona sur

SE (Cerro de la Estrella)

Muestreo No.	Temp. (°C)			Hum. rel (%)			Vel. v. (m s ⁻¹)			No. aislam.	No. esp.	PST µg m ⁻³
	Máx.	Mín.	Prom.	Máx.	Mín.	Prom.	Máx.	Mín.	Prom.			
I	21.2	16.8	19.4	52.2	39.2	45.7	2.3	1.2	1.7	2	1	260.5
II	20.9	18.4	19.7	53.1	43.9	48.5	3.4	1.3	2.3	5	2	216.5
III	26.4	23.1	24.8	28.1	23.1	25.6	1.2	0.6	0.9	0	0	891.0
IV	25.1	21.8	23.5	45.9	36.5	41.2				2	2	374.0
V	21.0	19.0	20.0	50.2	39.3	44.8				2	1	392.0
VI	22.2	19.0	20.6	89.6	65.3	77.5				0	0	243.0
VII	19.5	15.8	17.7			84.7				2	2	237.0
VIII	22.5	18.3	20.4	85.8	61.9	73.9				3	3	393.0
IX	20.1	15.7	17.6							5	5	253.0
X	19.3	15.8	17.6				4.2	3.7	4.0	3	3	494.0
XI	20.4	16.2	18.3				4.0	2.1	3.1	5	3	282.0
XII	19.2	15.0	17.1	40.3	30.2	35.6	4.2	2.7	3.5	2	1	430.0

SO (Pedregal)

Muestreo No.	Temp. (°C)			Hum. rel (%)			Vel. v. (m s ⁻¹)			No. aislam.	No. esp.	PST µg m ⁻³
	Máx.	Mín.	Prom.	Máx.	Mín.	Prom.	Máx.	Mín.	Prom.			
I	19.4	16.4	17.9	42.8	32.5	37.7	0.6	0.5	0.6	1	1	142.0
II	19.6	17.3	18.4	43.8	36.2	40.0	0.4	0.4	0.4	1	1	106.0
III	25.9	21.5	23.7	18.9	11.8	15.3				4	4	246.0
IV	23.7	21.4	22.6	33.2	24.9	26.9				1	1	197.0
V	21.0	19.0	20.0	50.2	39.3	44.8				0	0	121.0
VI	21.5	18.5	20.0	77.3	43.9	60.6				0	0	110.0
VII	18.9	15.3	17.1			63.2				1	1	52.0
VIII	20.7	18.3	19.5	58.1	39.9	49.0				0	0	148.0
IX	17.7	14.7	16.2				4.0	3.5	3.8	0	0	92.0
X	19.2	15.7	17.5	37.2	21.9	20.1	4.1	3.5	3.8	0	0	166.0
XI	16.9	15.2	16			28.8				0	0	165.0
XII	16.2	14.6	15.4			38.9				0	0	142.0

Temp = temperatura Hum. rel. = humedad relativa Vel. v.= velocidad del viento

Máx. = máximo Mín. = mínimo

Prom. = promedio

No. aislam. = número de aislamientos

No. esp.= número de especies

PST = partículas suspendidas totales

Tabla 5. Parámetros meteorológicos y aeropartículas durante el período de muestreo en la zona norte

NO (Tlalnepantia)

Muestreo	Temp. (°C)			Hum. rel (%)			Vel. v. (m s ⁻¹)			No. aislam.	No. esp.	PST µg m ⁻³	
	No.	Máx.	Mín	Prom.	Máx.	Mín.	Prom.	Máx.	Mín.				Prom.
I		24.0	22.1	23.0	39.4	36.0	37.7				3	3	210.0
II		23.5	21.7	22.6	60.4	49.9	55.2	0.9	0.8	0.8	0	0	104.0
III		31.0	29.1	30.1	17.9	17.2	17.6				0	0	487.0
IV		29.0	27.5	28.3	32.1	29.9	31.0				0	0	343.0
V		28.4	26.8	27.6	33.5	30.3	31.9				0	0	175.0
VI		27.0	22.9	25							0	0	202.0
VII											0	0	151.0
VIII		25.5	23.6	24.5							0	0	261.0
IX		18.9	15.3	17.1							0	0	256.0
X		20.4	17.4	18.9	79.2	70.3	74.8	3.4	0.1	1.7	0	0	347.0
XI		18.8	16.4	17.6				5.4	3.5	4.4	0	0	314.0
XII		17.8	15.0	16.4	38.5	31.9	35.2	6.8	4.8	5.8	7	5	253.0

NE (Xalostoc)

Muestreo	Temp. (°C)			Hum. rel (%)			Vel. v. (m s ⁻¹)			No. aislam.	No. esp.	PST µg m ⁻³	
	No.	Máx.	Mín	Prom.	Máx.	Mín.	Prom.	Máx.	Mín.				Prom.
I		20.7	18.0	19.4	26.7	20.1	23.5	4.8	3.8	4.3	11	8	503
II		21.1	18.6	19.9	32.1	28.8	30.4	6.7	4.7	5.7	6	5	680
III		26.9	24.7	25.8	9.3	6.0	7.6	5.2	4.1	4.7	4	2	857
IV		25.4	22.7	24.1	21.3	14.1	17.7	9.4	5.0	7.2	4	4	499
V		22.2	19.8	21.0	31.6	24.7	28.2	7.3	5.6	6.5	3	2	269
VI		20.3	18.5	19.4			58.9				5	4	576
VII											1	1	324
VIII		21.8	18.7	20.3	46.6	35.1	40.9	5.3	5.1	5.2	5	4	612
IX		19.5	17.8	18.7	28.8	23.4	26.1	5.3	4.5	4.9		3	377
X		20.1	17.7	18.9	34.8	32.6	33.7	5.8	4.2	5.0	3	3	562
XI		20.7	17.3	19.0	35.3	32.2	33.8	4.4	3.0	3.7	8	5	603
XII											4	4	602

Temp. = temperatura Hum. rel. = humedad relativa Vel. v. = velocidad del viento

Máx. = máximo Mín. = mínimo Prom. = promedio

No. aislam. = número de aislamientos No. esp. = número de especies

PST = partículas suspendidas totales

Tabla 6. Coeficiente de correlación de Spearman entre los parámetros ambientales (PST y temperatura) y los aislamientos y especies de las AVL totales

	PST	Temperatura máxima	Temperatura mínima
No. de aislamientos	0.54* n=48	-0.15 n=43	-0.19 n=43
No. de especies	0.53* n=48	-0.13 n=43	-0.18 n=43

* $p < 0.05$

PST = partículas suspendidas totales

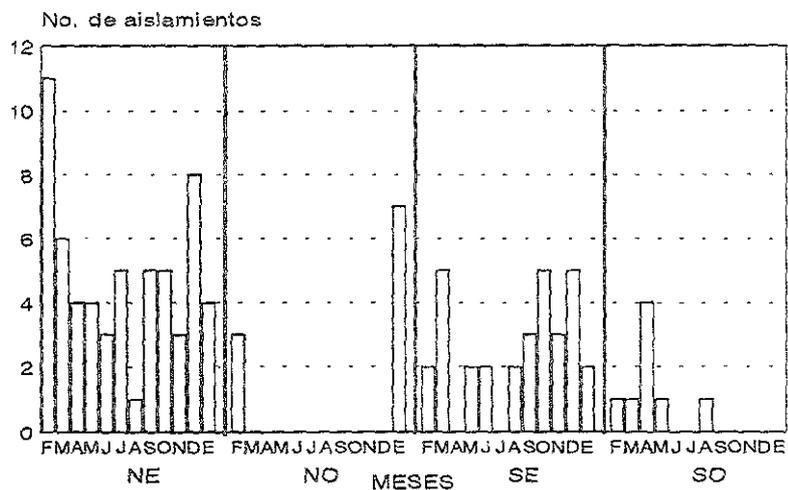
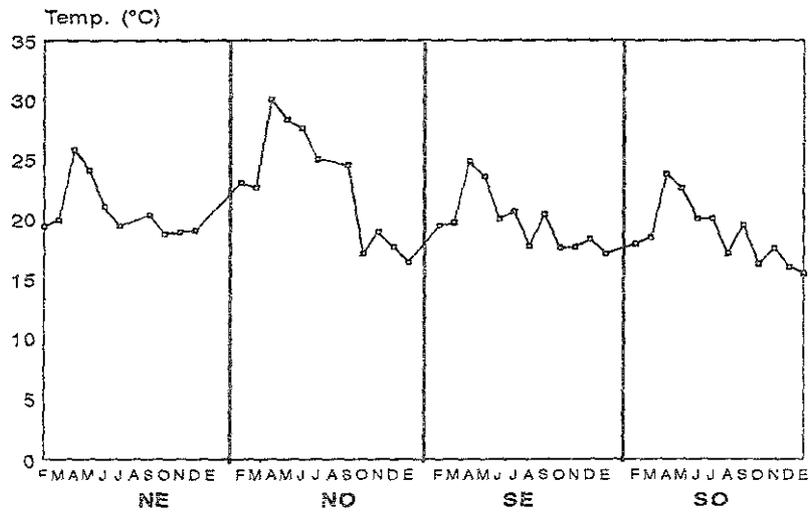
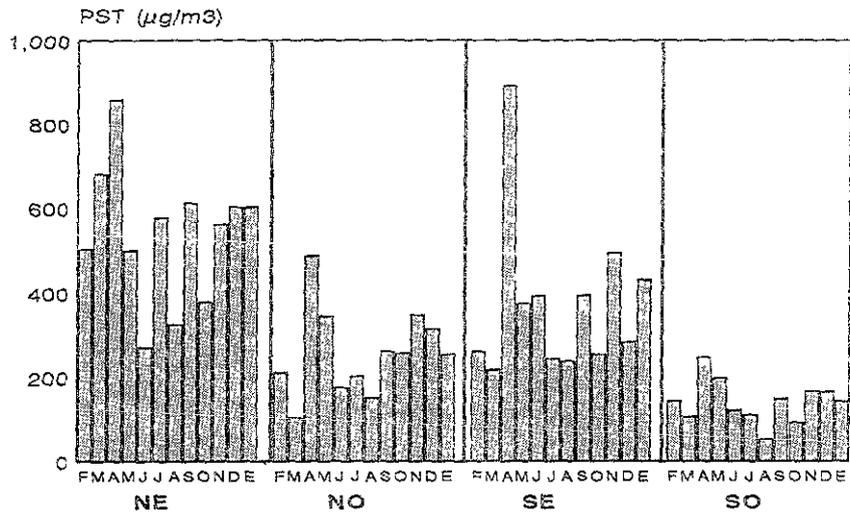


Fig. 3. Variación mensual de las PST, temperatura del aire y aislamientos de AVL por estación de muestreo

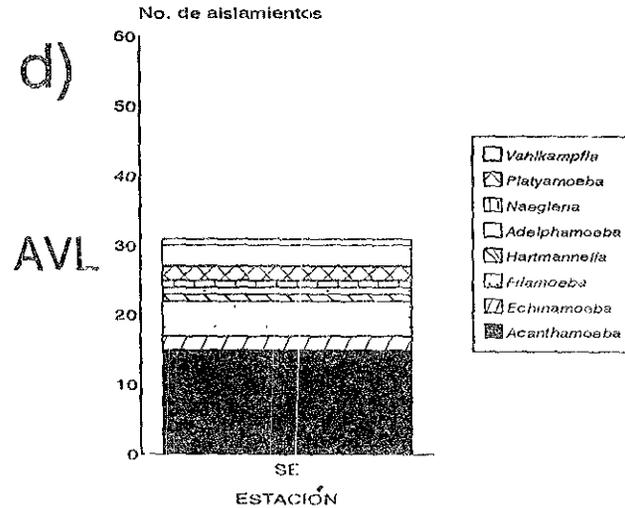
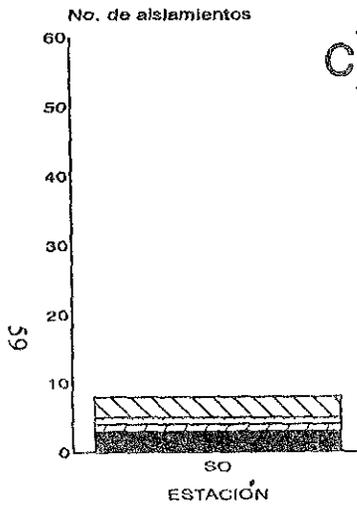
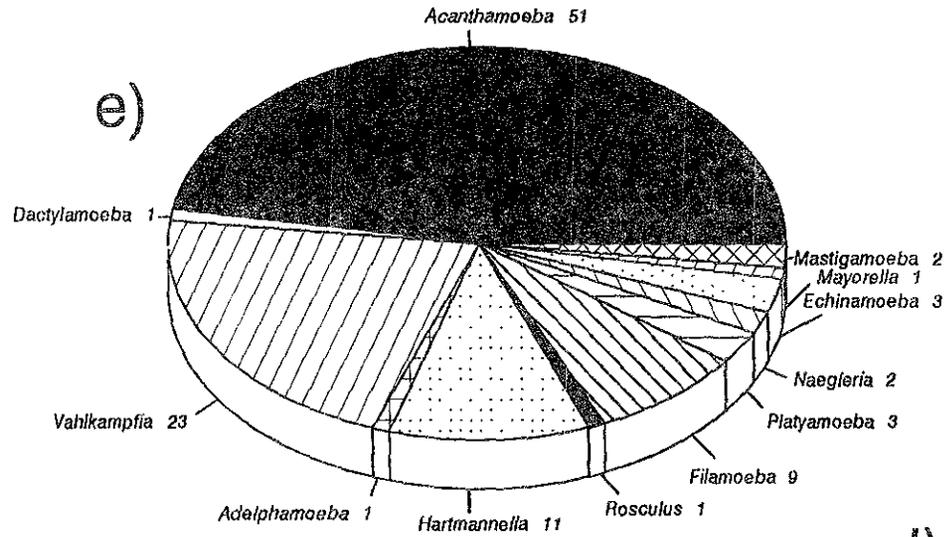
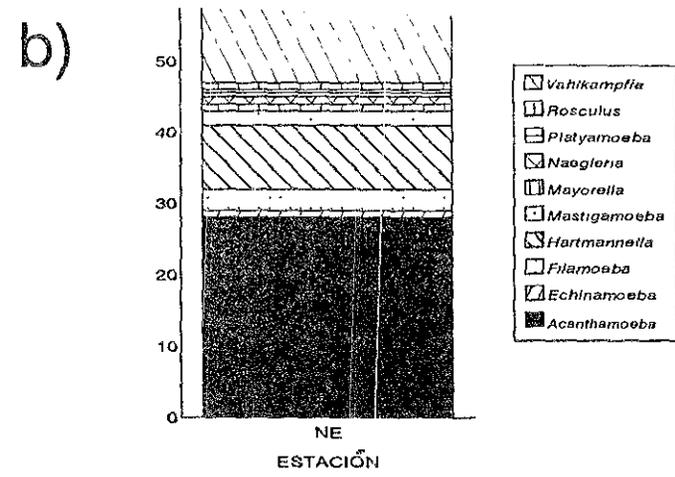
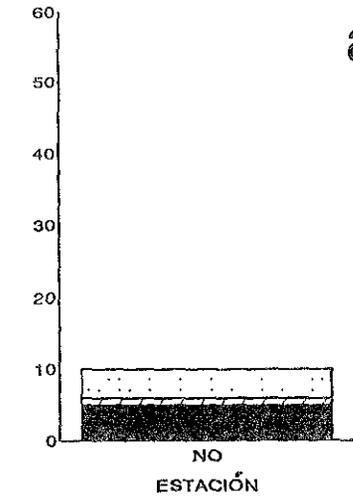


Fig. 4 Número de aislamientos de AVL por género: a-d) por estación de muestreo, e) respecto al total de aislamientos

Tabla 7. Frecuencia de aparición de las especies de AVL en las diversas estaciones de muestreo

n = 12	Estación de muestreo			
	NO	NE	SO	SE
Aislamiento				
<i>Acanthamoeba castellanii</i>		2		1
<i>A. culbertsoni</i>		1		
<i>A. divionensis</i>	1	4		1
<i>A. hatchetti</i>		4		
<i>A. polyphaga</i>		5		4
<i>A. quina</i>	1	3		
<i>A. rhyodes</i>	3	9	3	9
<i>Adelphamoeba galeacystis</i>				1
<i>Dactylamoeba stella</i>			1	
<i>Echinamoeba exundans</i>		1		2
<i>Filamoeba nolandi</i>	1	3		5
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>		5	1	
<i>H. vermiformis</i>		4		1
<i>Mastigamoeba reptans</i>		2		
<i>Mayorella spatula</i>		1		
<i>Naegleria gruberi</i>		1		1
<i>Platyamoeba placida</i>		1		
<i>P. stenopodia</i>				2
<i>Rosculus ithacus</i>		1		
<i>Vahlkampfia aberdonica</i>		1	1	
<i>V. avara</i>	1			
<i>V. debilis</i>		1		
<i>V. enterica</i>		3		2
<i>V. inornata</i>		1		1
<i>V. jugosa</i>		1		
<i>V. lobospinosa</i>	2	2		1
<i>V. russelli</i>		2		
<i>V. ustiana</i>	1			
<i>V. vahlkampfi</i>		1	2	
Total de aislamientos	10	59	8	31
Géneros aislados	3	10	4	8
Especies aisladas	7	24	5	13

p < 0.05

Fig. 5. Distribución del número de aislamientos de AVL asociadas a las aeropartículas

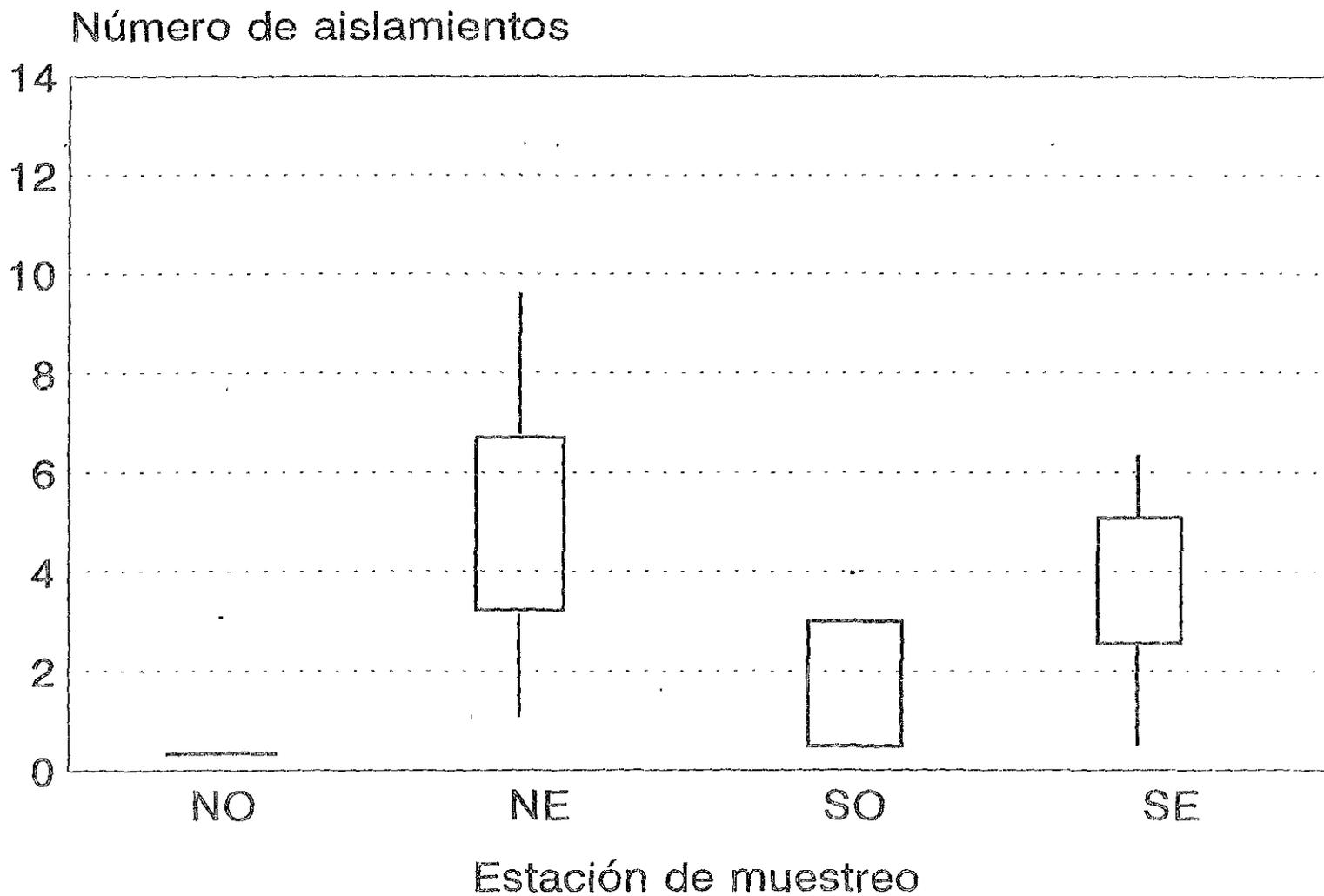


Fig. 6. Frecuencia de aparición de géneros de AVL por época del año

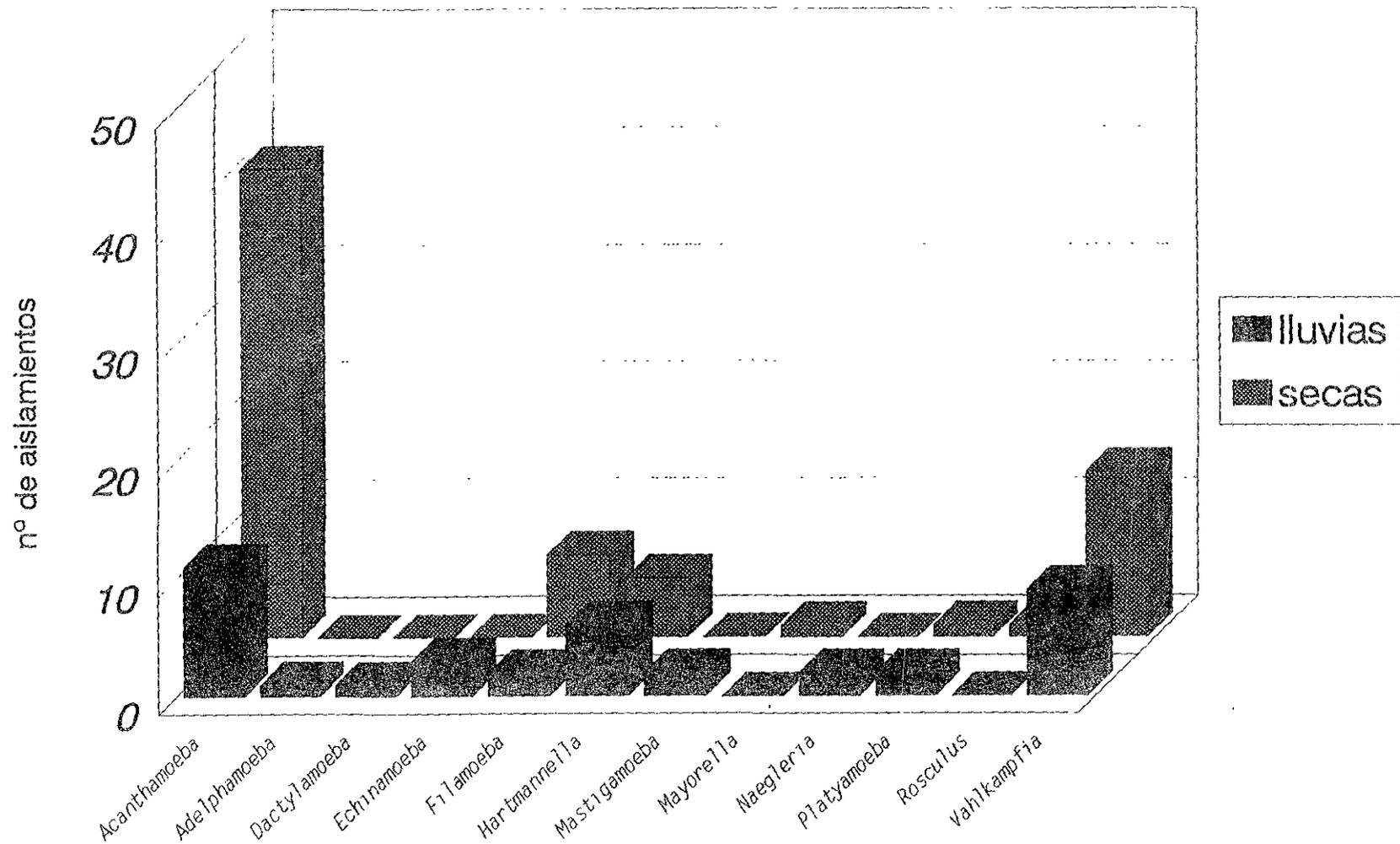


Fig. 7. Frecuencia de aparición de los géneros de AVL por estación

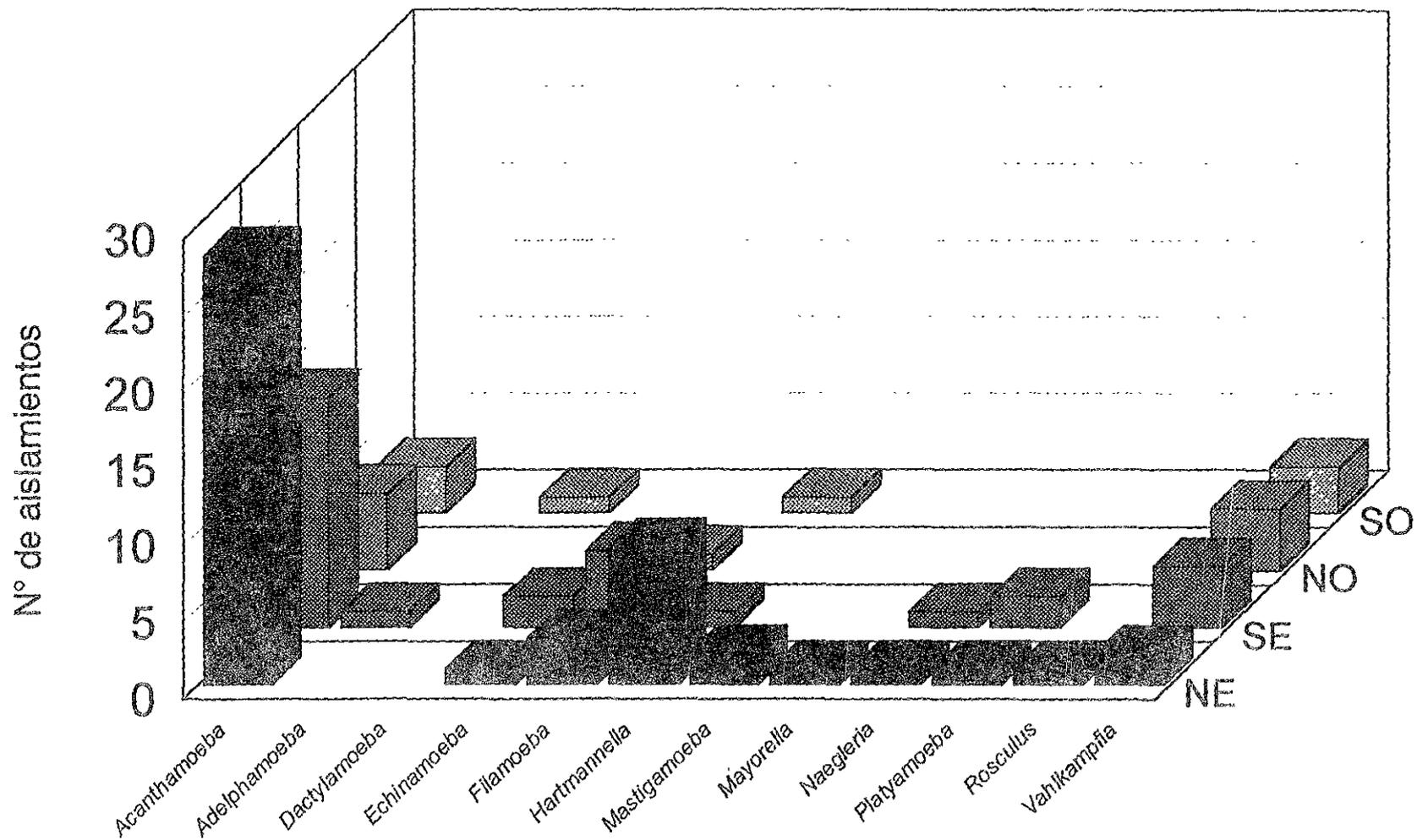


Tabla 8. Prueba de patogenicidad de los aislamientos del género *Acanthamoeba*

Muestreo No.	Estación de muestreo	Aislamiento	% mortalidad		Recuperación de las amibas en diferentes órganos			
			IC*	IN**	c	p	r	h
I	NE	<i>A. polyphaga</i>	100 ^a	0	-	-	-	-
		<i>A. rhysodes</i>	60 ^a	100	+	+	+	-
		<i>A. quina</i>	0					
		<i>A. rhysodes</i>	100 ^a	40	+	+	-	-
		<i>A. rhysodes</i>	80 ^a	20	-	+	-	+
		<i>A. divionensis</i>	20					
		<i>A. polyphaga</i>	80 ^a	40	+	+	+	-
	SE	<i>A. rhysodes</i>	20					
		<i>A. rhysodes</i>	20					
	SO	<i>A. rhysodes</i>	20					
NO	<i>A. rhysodes</i>	60 ^a	0	-	-	-	-	
II	NE	<i>A. polyphaga</i>	0					
		<i>A. rhysodes</i>	60 ^a	100	+	+	-	-
		<i>A. quina</i>	40					
	SE	<i>A. polyphaga</i>	0					
		<i>A. rhysodes</i>	0					
		<i>A. rhysodes</i>	0					
		<i>A. rhysodes</i>	0					
SO	<i>A. rhysodes</i>	60 ^a	0					
III	NE	<i>A. castellanii</i>	100 ^a	60	+	+	+	+
		<i>A. castellanii</i>	20					
		<i>A. hatchetti</i>	0					
	SO	<i>A. hatchetti</i>	0					
		<i>A. rhysodes</i>	0					
IV	NE	<i>A. hatchetti</i>	100 ^a	20	+	-	-	-
		<i>A. rhysodes</i>	100 ^a	0	-	-	-	-
		<i>A. divionensis</i>	0					
	SE	<i>A. polyphaga</i>	60 ^a	80	+	+	+	+
		<i>A. rhysodes</i>	80 ^a	0	-	-	-	-
V	NE	<i>A. quina</i>	0					
	SE	<i>A. rhysodes</i>	80 ^a	80	+	+	+	+
		<i>A. rhysodes</i>	80 ^a	20	+	+	-	-
VI	NE	<i>A. polyphaga</i>	100 ^a	60	+	+	-	+
IX	SE	<i>A. polyphaga</i>	0					
		<i>A. divionensis</i>	40	20	-	+	-	-

X	NE	<i>A. rhyodes</i>	60 ^a	20	+	+	-	-
	SE	<i>A. castellanii</i>	60 ^a	40	+	+	+	+
		<i>A. polyphaga</i>	60 ^a	20	+	+	+	+
XI	NE	<i>A. rhyodes</i>	80 ^a	0	-	-	-	-
		<i>A. divionensis</i>	0					
		<i>A. hatchetti</i>	20					
		<i>A. rhyodes</i>	80 ^a	20	-	-	-	+
		<i>A. rhyodes</i>	0					
		<i>A. divionensis</i>	100 ^a	0	-	-	-	-
XII	NE	<i>A. polyphaga</i>	80 ^a	80	-	+	-	-
	NO	<i>A. quina</i>	40					
		<i>A. rhyodes</i>	0					
		<i>A. divionensis</i>	80 ^a	100	+	+	+	+
		<i>A. rhyodes</i>	100 ^a	40	-	+	-	+

*IN = nasal

**IC = intracerebral

a = mortalidad > 50% de ratones inoculados IC

c = cerebro p = pulmón h = hígado r = riñón

8. Zimogramas de: a) Proteínas Totales (PT) y b) Malato Deshidrogenasa (MDH) en amibas de referencia y de los aislamientos ambientales de *Acanthamoeba* spp.

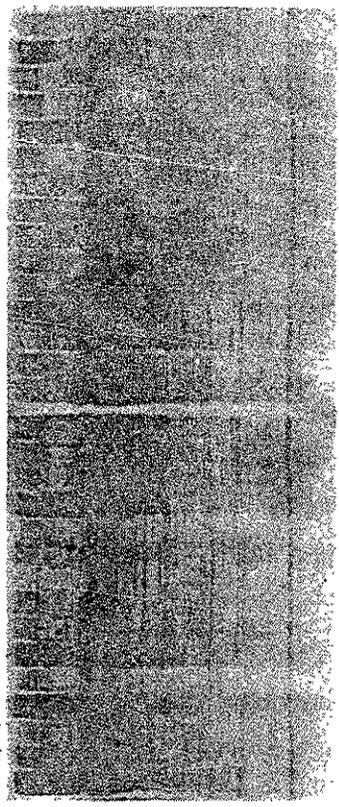
a) PT pH 3-10

REFERENCIA

- A. divionensis*
- A. palestinesis*
- A. lugdunensis*
- A. lugdunensis*
- A. rhyssodes*
- A. griffithii*
- A. castellanii*
- A. castellanii*
- A. hatchetti*
- A. guinea*
- A. polyphaga*
- A. polyphaga*
- A. polyphaga*
- A. mauritanensis*
- A. mauritanensis*

AMBIENTALES

- A. polyphaga*
- A. polyphaga*
- A. polyphaga*
- A. rhyssodes*
- A. polyphaga*
- A. rhyssodes*
- A. rhyssodes*
- A. rhyssodes*
- A. rhyssodes*
- A. polyphaga*
- A. rhyssodes*
- A. rhyssodes*
- A. castellanii*
- A. castellanii*
- A. hatchetti*



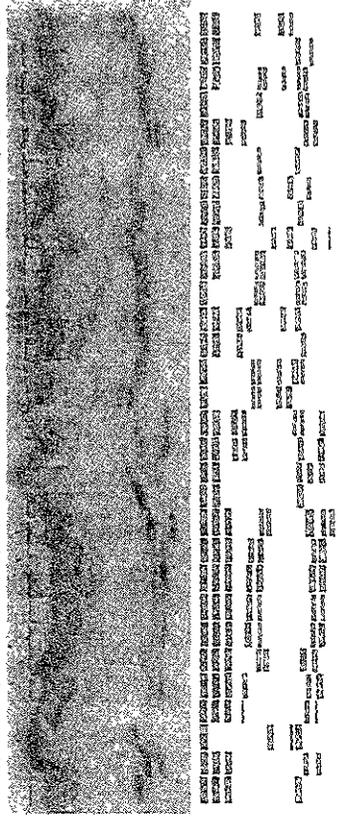
b) MDH pH 3-10

REFERENCIA

- A. divionensis*
- A. palestinesis*
- A. lugdunensis*
- A. lugdunensis*
- A. rhyssodes*
- A. griffithii*
- A. castellanii*
- A. castellanii*
- A. hatchetti*
- A. guinea*
- A. polyphaga*
- A. polyphaga*
- A. polyphaga*
- A. mauritanensis*
- A. mauritanensis*

AMBIENTALES

- A. polyphaga*
- A. polyphaga*
- A. polyphaga*
- A. polyphaga*
- A. rhyssodes*
- A. polyphaga*
- A. rhyssodes*
- A. rhyssodes*
- A. castellanii*
- A. castellanii*
- A. hatchetti*



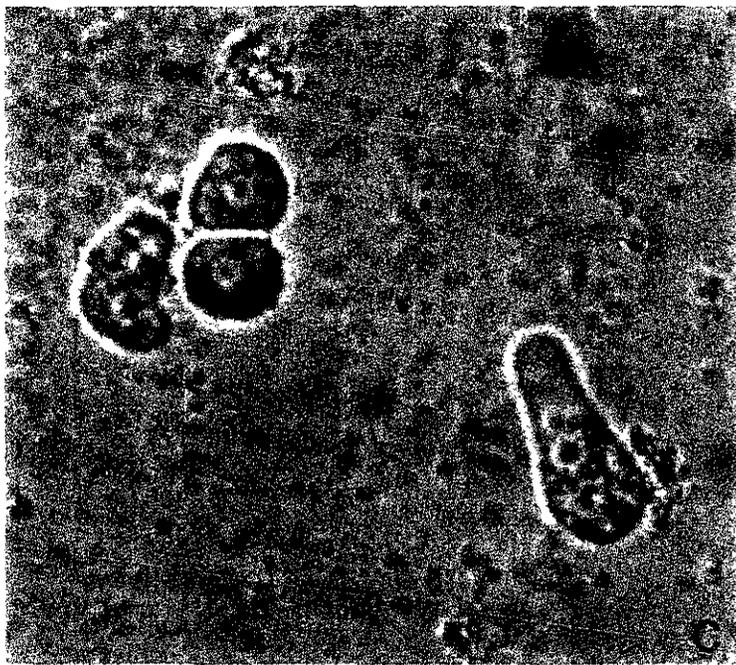
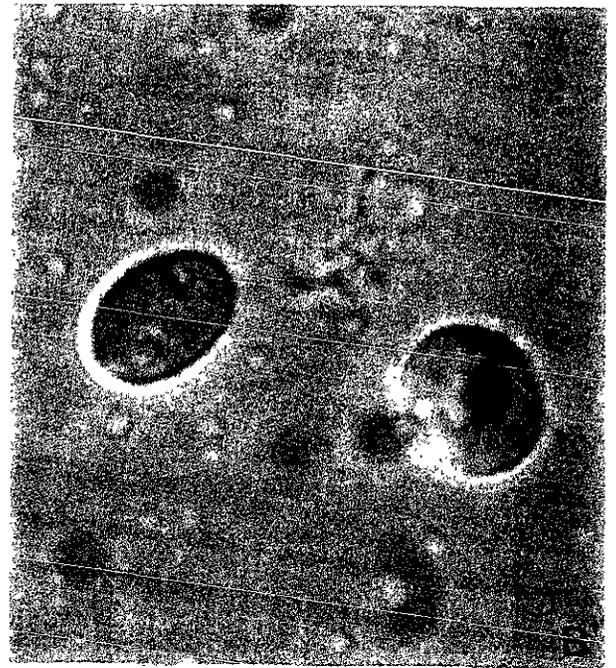


Fig. 10. A-B, *Filamoeba nolandi*; A, trofozoito. B, quiste. C, *Naegleria gruberi*, trofozoitos y quistes. D, *Platyamoeba placida*, trofozoitos (A, 800×; B, 600×; C, 400×; D, 500×). A, D, en contraste de fases; B, C, óptica de Nomarski.

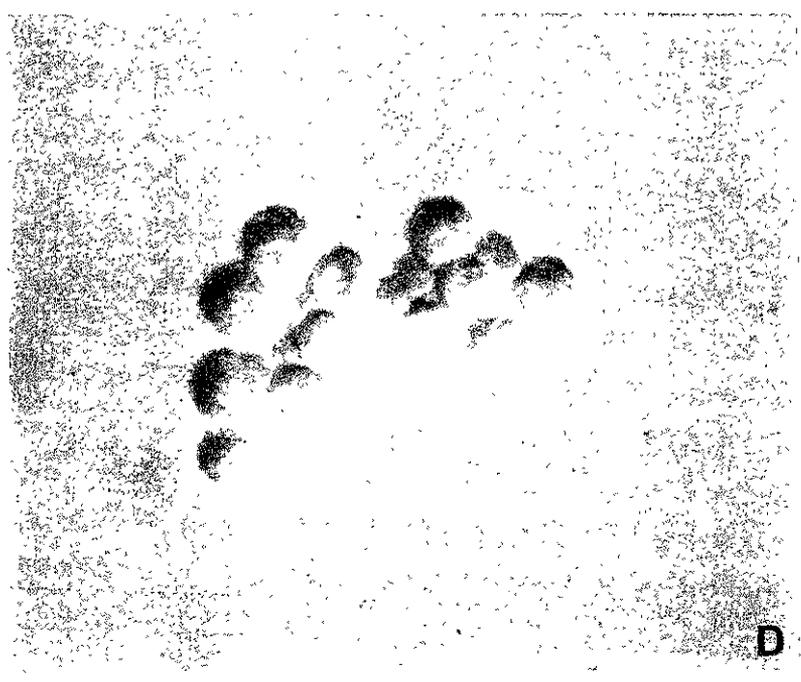
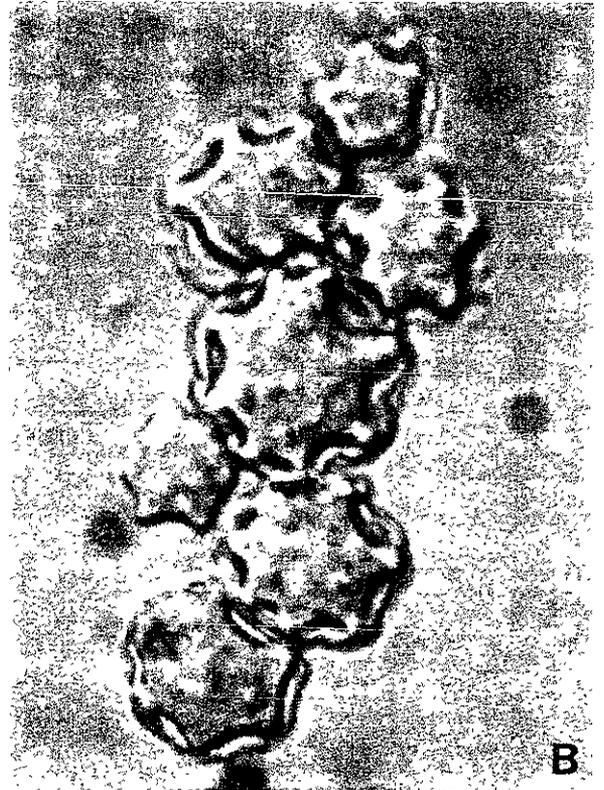


Fig. 11. A-B, *Acanthamoeba astronyxis*; A, trofozoíto; B, quistes. C-D, *Vahlkampfia avara*; C, trofozoíto; D, quistes. (A-D, 600×) A-D, óptica de Nomarski.

7. DISCUSIÓN

Las AVL habitan tanto en ambientes acuáticos como terrestres. De acuerdo con Singh (1975), el suelo es su hábitat principal, donde existen en grandes cantidades en forma activa. Las amibas desnudas constituyen entre el 50 y el 90 % de los protozoos del suelo y basuras, en gran parte debido a que poseen pseudópodos y cuerpos flexibles que les permite penetrar en espacios diminutos no disponibles para otros microorganismos del suelo. Las amibas liberan más del 35% del material ingerido como nutrimentos solubles, lo cual a su vez, estimula la actividad bacteriana (Bamforth, 1980).

Entre los protozoos más comunes del suelo, se encuentran los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Hartmannella*, o sea el grupo en donde se encuentran las AVL más pequeñas. En este ambiente, de acuerdo con Sleigh (1989), las AVL pequeñas son más importantes que las de mayor tamaño, ya que pueden invadir y colonizar espacios que otros organismos de mayor tamaño no pueden.

Campbell (1987) & Weekers (1993) mencionan que los protozoos del suelo son semejantes a los acuáticos, aunque las especies más pequeñas, o incluso los individuos más pequeños de una especie dada, tienden a ser más comunes. En este sentido es conveniente mencionar que durante este estudio, la talla de las AVL aisladas en general fue menor que la descrita en las claves taxonómicas de Page (1976, 1988) y la guía ilustrada de Lee *et al.*, (1985). Esto sugiere que conforme el ambiente es más adverso, además de los individuos más resistentes, tienden a predominar los individuos de menor tamaño.

En los cuerpos de agua, las AVL viven principalmente en la superficie, adheridos a las partículas flotantes, en menor cantidad se encuentran en la columna de agua y en los sedimentos, especialmente en forma de quiste (Kyle & Noblet, 1986).

Desde el agua y el suelo pueden ser introducidas a la atmósfera por diferentes mecanismos (Edmonds, 1979). En el aire, las amibas se pueden transportar adheridas a restos de plantas, a partículas de polvo y otros agentes (Schlichting, 1961).

La frecuencia de las AVL obtenidas durante este estudio fue semejante en los dos niveles muestreados (tabla 2), lo cual quedó confirmado por el análisis estadístico realizado. La distribución uniforme en ambos niveles, pudo estar determinada por las burbujas de aire y las corrientes turbulentas que no permiten un gradiente de sedimentación de las partículas suspendidas. La presencia de estos organismos en esos niveles es de gran importancia, ya que a través del aire pueden invadir el tracto respiratorio humano (Abraham & Lawande, 1982).

Como ya se mencionó, las AVL más comunes del suelo de acuerdo a Sleigh (1989) corresponden a los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Hartmannella*. En el presente estudio, los géneros más frecuentes fueron *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Hartmannella* (fig. 4). Si se considera que el muestreo de las amibas de la atmósfera fue al azar, cabría esperar que las AVL más comunes del suelo, también fueran las más comunes en la atmósfera, sin embargo, se registraron algunas diferencias, las cuales pudieron deberse a la capacidad de sobrevivencia de cada organismo y a su habilidad individual para formar quistes, de tal manera que algunas de las especies se ven favorecidas durante el proceso de aerosolización, así como a las condiciones micrometeorológicas de cada sitio de muestreo.

Del total de AVL obtenidas, la mayor frecuencia corresponde al género *Acanthamoeba* (fig. 4), lo que coincide con lo antes reportado por Rivera *et al.*, (1987, 1992, 1994), Rodríguez *et al.*, (1993) y lo señalado por Page (1988) en relación a que las especies de este género son probablemente el protozoo de vida libre más común en la naturaleza. Esto es importante, porque a *Acanthamoeba* pertenecen varias especies patógenas oportunistas que pueden producir EAG, principalmente en personas inmunosuprimidas tales como individuos con terapia inmunosupresora para trasplante de órganos, con desnutrición, alcohólicos crónicos, mujeres embarazadas, pacientes con SIDA, con lupus eritematoso sistémico o con cualquier otro tipo de supresión provocada por quimioterapia (Martínez & Visvesvara, 1997).

Además, se han descrito algunos casos de EAG sin evidencia de inmunosupresión (Cerva *et al.*, 1973; Rivera *et al.*, 1984b, 1986b). Se sugiere que la puerta de entrada es el tracto respiratorio o alguna ulceración en la piel, llegando al SNC por vía sanguínea y produciendo finalmente la muerte (Gullet *et al.*, 1979; John, 1993; Martínez & Visvesvara, 1997).

Hasta 1998, se habían reportado 169 casos de EAG alrededor del mundo, 72 de los cuales se citaron en Estados Unidos (Martínez & Visvesvara, 1998). Esto no necesariamente significa que el número de casos sea mucho mayor en ese país, sino más bien, que el personal médico y de laboratorio tiene un mayor conocimiento acerca de las enfermedades causadas por las AVL, haciendo que su detección sea más eficiente, por lo que aparentemente el número de casos es más alto.

Otra infección -menos grave, pero cada vez más frecuente-, es la QA causada por *Acanthamoeba* spp. El número de casos se ha incrementado notablemente a nivel mundial en los últimos años. En 1994, Martínez registró alrededor de 500 y en 1998, Visvesvara & Leitch mencionan un poco más de 1 000. Durante muchos años, la QA estuvo asociada con trauma corneal, pero se sabe ahora que entre los factores de riesgo se encuentra el contacto con aire que las contenga (Martínez & Visvesvara, 1997).

Durante el presente estudio precisamente *Acanthamoeba* fue la amiba de vida libre más común en el aire de la ZMCM (fig. 4). Por lo anterior, se podría esperar que el número de casos de EAG y QA en México fuera más alto, sin embargo no es así, debido probablemente entre otras razones, a que gran parte del personal biomédico y de laboratorio desconoce a este grupo de organismos y las patologías que producen y por otro lado, existen casos no registrados (Omaña, 1997).

Todos los casos de QA registrados hasta la fecha, han tenido como agente causal a *Acanthamoeba* spp. Sin embargo, recientemente Kinnear (1998) demostró que amibas pertenecientes a los géneros *Vahlkampfia* y *Hartmannella* son capaces de producir un efecto citopático en la córnea humana. Por lo anterior, es conveniente tenerlas en cuenta como un riesgo potencial.

Por otro lado, la mayoría de las AVL producen quistes resistentes dentro de los cuales pueden permanecer en estado latente durante los periodos en que las condiciones ambientales son hostiles (Singh, 1975; Anderson, 1987; Sleight, 1989).

En el caso de *Acanthamoeba* spp., al principio se produce una retracción de la célula y una degradación masiva de los componentes celulares. A continuación se sintetiza una capa externa fosfoprotéica y después una capa interna de celulosa (Page, 1966; Sleight, 1989). Este último componente es muy resistente a la desecación, lo que les permite mantenerse viables en la atmósfera mucho mayor tiempo que al resto de las AVL, por lo que su frecuencia se vio favorecida en los meses de menor humedad relativa.

La especie más abundante durante este estudio fue *Acanthamoeba rhysodes* (tabla 3). Según Bhattacharya *et al.*, (1987), *A. rhysodes* forma parte del grupo dominante de las gimnamebas del suelo de mangiar, lo cual significa que esta especie es capaz de soportar condiciones ambientales extremas (alta salinidad, alternancia de periodos de sequía y humedad, alta concentración de materia orgánica). De acuerdo a los mismos autores, su abundancia puede estar relacionada con la importancia de su papel como bacterívoros en el sistema suelo-basura. Estas observaciones explican la resistencia de las amibas de esta especie y en consecuencia, su sobrevivencia y abundancia en la atmósfera de la ZMCM.

La capacidad de formar quistes de la mayoría de las especies aisladas durante el presente estudio (excepto *Mayorella spatula* y *Dactylamoeba stella*), fue una característica muy importante, ya que gracias a eso pudieron sobrevivir a las condiciones atmosféricas, como las temperaturas altas, la deshidratación, la acción biocida de la luz ultravioleta del sol, así como la presencia de gases contaminantes, que son los principales factores de riesgo para los microorganismos en la atmósfera (Mandrioli, 1998).

Adicionalmente, los quistes son un excelente medio de dispersión, lo que explica su amplia distribución, pues de esa manera pueden ser transportados a grandes distancias por el viento o adheridos a partículas de polvo y al cuerpo de animales (Sleigh, 1989; Schlichting, 1961, 1969).

Es notable el aislamiento obtenido de *Mayorella spatula* (estación NE), debido a que es una especie que no forma quistes, por lo que es más susceptible a ser destruida en condiciones ambientales desfavorables, además, se aisló en uno de los meses más secos del año (febrero) (tabla 2). La presencia de estas amibas en la atmósfera pudo deberse a que hayan sido recientemente aerosolizadas del área cercana a la estación de muestreo, permitiendo así el aislamiento de este organismo, pues como señaló Edmonds (1979), la viabilidad de los microorganismos en la atmósfera depende de la distancia de su origen y el tiempo transcurrido desde su introducción en la atmósfera.

Page en su clave taxonómica de 1988, describe a *Dactylamoeba stella* como organismos de agua dulce, y aunque esta especie tampoco produce quistes, su presencia es más comprensible, ya que el aislamiento se realizó de agua de lluvia durante el muestreo de agosto (tabla 2), por lo que en este caso, las condiciones ambientales eran menos desfavorables, y probablemente su frecuencia en el ambiente es mayor durante los meses húmedos del año.

Las especies del género *Vahlkampfia* tienen un quiste con pared gelatinosa (Page, 1988), característica que puede disminuir la velocidad de desecación, permitiéndoles un tiempo de viabilidad mayor durante el transporte aéreo. La frecuencia de aparición de los especímenes de este género fue mayor, durante el período de sequía (14 de 23) (tabla 3). Las especies del género *Hartmannella* producen un quiste con doble pared resistente a la desecación (la pared interna más gruesa que la externa) (Page, 1988) y seguramente gracias a ello, sobrevivieron y se aislaron también durante los meses de sequía.

El quiste de *Filamoeba nolandii* está formado por una pared gruesa y muy resistente (Page, 1988) como quedó demostrado en este estudio, ya que fue una de las especies más frecuentes (tabla 3, fig. 4) aún en las condiciones ambientales más hostiles.

A diferencia de las anteriores, las amibas pertenecientes al género *Naegleria* tienen un quiste de pared delgada, poco resistente a la desecación (John, 1993), lo que hace que su permanencia en la atmósfera sea corta, ya que la falta de humedad influye negativamente sobre su viabilidad en el aire. Dicho efecto se vió claramente reflejado en la baja frecuencia de aislamientos obtenidos (tabla 3, fig. 4). Los dos aislamientos realizados se hicieron en julio y agosto, es decir, durante la época de lluvia. Otra probable explicación puede ser la existencia de densidades poblacionales muy bajas en las zonas adyacentes a los sitios de muestreo. Al género *Naegleria* pertenece también la especie altamente virulenta, *N. fowleri*; sin embargo, ninguno de los dos aislamientos obtenidos durante este estudio resultó patógeno. Esto puede explicar también, la baja incidencia de casos de MEAP en humanos en la ZMCM.

Las especies restantes mostraron frecuencia de aislamiento muy bajas (fig. 4). La experiencia en el laboratorio con estas amibas, demostró que tienen un quiste poco resistente ante la desecación. *Platyamoeba* spp. es más frecuente en ambiente marino que en suelo o agua dulce, su quiste está conformado por dos paredes. *Rosculus ithacus* produce quistes lisos, cuya habilidad para enquistarse en cultivo se pierde en unos meses (Page, 1988). De manera general, la presencia de estas amibas en la atmósfera coincidió con los meses de lluvia y los posteriores inmediatos, lo que indica que son más frecuentes en ambiente húmedo, por lo que esta época es la más favorable para su sobrevivencia.

En los meses siguientes e inmediatos a la época de lluvia, se aislaron organismos pertenecientes a los géneros de *Naegleria*, *Echinamoeba*, *Mastigamoeba*, *Dactylamoeba* y *Platyamoeba*. Considerando que estos organismos son normalmente poco resistentes a la desecación, su presencia pudo deberse a la presencia de aire húmedo, lo que disminuye los efectos dañinos de la radiación solar y de esa manera, los organismos pudieron permanecer viables durante su transporte por el aire. No obstante la importancia del quiste en el transporte aéreo, no se puede olvidar que la proporción de especies aisladas pudo deberse también a la abundancia de cada una de ellas en su ambiente inmediato.

La mayor frecuencia de AVL en general, se obtuvo durante la época de secas (tabla 3). Este patrón coincide con lo reportado por Rivera *et al.*, (1987, 1992, 1994).

Durante los meses de lluvia, las especies más frecuentes pertenecen a los géneros *Echinamoeba*, *Mastigamoeba*, *Naegleria*, *Dactylamoeba*, *Platyamoeba* y *Adelphamoeba* (tabla 3), los cuales se aislaron únicamente en la época de lluvia y en los meses inmediatos a ésta, lo que permite sugerir que son más sensibles a la desecación. Las amibas pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Harimannella* y *Filamoeba* no mostraron un patrón estacional, ya que se aislaron indistintamente en lluvias y secas, aunque *Acanthamoeba* y *Filamoeba* fueron un poco más frecuentes durante la época de secas (fig. 6).

Uno de los problemas más antiguos de la ZMCM es la contaminación del aire debido a las tolveneras, problema que se ha agudizado en los últimos 50 años como consecuencia del crecimiento de la población, la reducción de áreas verdes, el incremento de la industria y del transporte (PICA, 1990). Entre las aeropartículas (PST) se encuentran numerosos microorganismos como bacterias, hongos, virus y protozoos (Gregory, 1973). Si bien no todas las especies de estos grupos biológicos son patógenos para el hombre, su capacidad de sobrevivencia y transportación por el aire hacia la piel, aparato respiratorio y digestivo, alimentos y depósitos de agua potable pone en evidencia el riesgo de provocar enfermedades en la población expuesta, así como en animales y plantas.

En el presente estudio, hubo una correlación significativa entre las aeropartículas y el número de aislamientos y especies de AVL (tabla 6), lo cual confirma que su presencia está asociada a las partículas suspendidas. Esto era de esperarse, ya que junto con la resuspensión de las partículas del suelo, también se suspenden microorganismos habitantes del mismo (Rivera *et al.*, 1987, 1992, 1994). Adicionalmente, las partículas pueden actuar como sustrato y como protección a los microorganismos ante las condiciones atmosféricas (Edmons, 1979).

El mayor número de aislamientos se obtuvo en las estaciones del oriente de la zona metropolitana, es decir en la estación de Xalostoc (NE), y en la estación de Cerro de la Estrella (SE), coincidiendo con las estaciones de muestreo donde se registraron los valores más altos de PST (tablas 4-5, figs. 3-4), lo cual reafirma la estrecha asociación de la aeropartículas con la presencia de AVL.

Durante los meses de febrero, marzo y abril la concentración de aeropartículas en la atmósfera del Valle de México, se incrementa como consecuencia de las tolvaneras generadas por los vientos dominantes y que suspenden partículas de todo tipo. Este problema es aún mayor en el oriente, debido a que en esa zona se encuentra gran parte de las áreas más erosionadas de la ZMCM, entre las que se encuentran el lecho seco del ex-lago de Texcoco y Ciudad Netzahualcóyotl. Esta última caracterizada por tener grandes extensiones de suelo desnudo, gran cantidad de calles sin pavimentar y escasas áreas verdes. Una fuente adicional son las áreas de barbecho cercanas a la ciudad. De tal manera que los vientos dominantes del norte y que fluyen de manera natural hacia el sur, acarrearán y resuspenden diversos materiales en su trayectoria (SEDUE, 1986; RAMA, 1995, 1996).

Durante muchos años, el lecho seco del antiguo Lago de Texcoco ha representado una de las principales fuentes naturales de polvo y a pesar de que hace más de dos décadas se instrumentó el Programa de Restauración del Lago de Texcoco, no se han alcanzado los objetivos propuestos, por lo que en las áreas de los alrededores se continúan registrando los valores más altos de PST (RAMA, 1995).

Los vientos dominantes durante el día y a lo largo del año provienen del NE, con velocidades superficiales de 2 m/s y, durante la noche, los vientos fríos de las montañas descienden hacia el Valle de México (PICA, 1990). Durante esos eventos, los organismos son fácilmente introducidos a la atmósfera por la acción del viento, las corrientes turbulentas y de convección para después regresar al suelo por efecto de corrientes descendentes o por la lluvia. Esto último ocurre especialmente en los meses de junio, julio y agosto, cuando se presentan precipitaciones intensas y casi diarias que contribuyen a la limpieza de la atmósfera. Por otro lado, es necesario tener en cuenta que durante el impacto de la lluvia sobre las superficies (agua, tierra, plantas, animales y construcciones en general), se producen salpicaduras capaces de resuspender una vez más a las partículas.

Entre las cuatro estaciones de muestreo se encontraron diferencias significativas con respecto al número de aislamientos (fig. 5, tabla 7). Ésto es comprensible si se considera que la ZMCM ocupa una gran extensión, por lo que cada zona tiene características diferentes en cuanto a niveles de contaminación, características climatológicas y orográficas (SEDUE, 1986; PICA, 1990) e índices de urbanización también diferentes (I_U = porcentaje de área construida) (Rapoport *et al.*, 1983).

Es muy útil conocer el I_U de cada zona, pero en este caso fue más importante aún saber como se encuentra constituido el espacio restante de cada zona, es decir, si se trata de suelo desnudo o cubierto (pavimento, basura, áreas verdes, agua, etc.), ya que de acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, estas características son las que en realidad señalan a las posibles fuentes de AVL.

Estación NE (Xalostoc)

Esta estación fue la única en la que se obtuvieron aislamientos amibianos durante todos los meses del año de estudio (fig. 3), y aunque hubo una ligera disminución durante los meses de lluvia, fue donde se registró la mayor frecuencia y heterogeneidad de AVL. Esto puede atribuirse a varios factores:

- El índice de urbanización (I_U) de esta zona es de 0.65 (Rapoport *et al.*, 1983), el espacio restante está constituido por terrenos baldíos, calles sin pavimentar y escasas áreas verdes (RAMA, 1996) es decir, que hay numerosas áreas de suelo desnudo que es una de las fuentes más importantes de las AVL (Sleigh, 1989; Bamforth, 1980).

- Se estima que el 95% de las partículas suspendidas son de origen natural y el resto lo constituyen las emisiones generadas por actividades antropogénicas como son los procesos industriales, la quema de residuos, la quema de combustibles fósiles en la industria, servicios, casas y los medios de transporte (PICA, 1990; RAMA, 1995). Y como ya se mencionó antes, las AVL se pueden transportar por el aire, adheridas a otras partículas. Dentro del área de influencia de esta estación de muestreo, existe uno de los complejos industriales más grandes de la ZMCM, los cuales emiten gran cantidad de partículas hacia la atmósfera.

- La estación de muestreo estaba ubicada muy cerca de un basurero a cielo abierto, lo cual representa una fuente continua de materia orgánica que favorece el desarrollo de AVL, entre otros organismos.

- En esta zona se registraron las velocidades del viento más altas (tabla 5), por lo que fue la estación más expuesta a corrientes de aire, las cuales generan tormentas de polvo (SEDUE, 1986; PICA, 1990). Ésto se vió reflejado en las altas concentraciones de PST registradas en esta estación de muestreo.

- El tráfico vehicular en la zona es muy intenso y se ha demostrado que junto con el tráfico peatonal, producen turbulencia que provoca la resuspensión de las partículas del suelo (Nicholson, 1988), llevando consigo numerosos microorganismos.

Estación SE (Cerro de la Estrella)

En esta estación de muestreo se obtuvo el segundo lugar en cuanto a frecuencia de aislamientos amibianos (fig. 4), lo que puede atribuirse a los siguientes factores:

- Esta estación de muestreo tiene un I_U de 0.53 (Rapoport *et al.*, 1983), lo que significa que el 47% del área no está urbanizada. Este porcentaje está constituido por suelos erosionados por la agricultura y la extracción de minas, así como áreas urbanas sin pavimentar (SEDUE, 1986), por lo que una de las principales fuentes de AVL es muy amplia en esta zona.

- Debido a que esta estación de muestreo se encuentra en la ruta natural de los vientos que llegan del norte y noreste del valle de México, además de las emisiones locales, también recibe partículas generadas en las zonas industriales del norte y del lecho seco del ex lago de Texcoco (RAMA, 1995; SEDUE, 1986). Todas estas características explican las altas concentraciones registradas de PST en esta estación de muestreo (tabla 4).

- Otra posible fuente de AVL, fue una planta de tratamiento de aguas residuales ubicada a menos de 1 000 m de distancia, las cuales también han sido reportadas como una fuente de microorganismos hacia la atmósfera (Schlichting, 1969; Rivera *et al.*, 1986a; Curds, 1992). De acuerdo con Curds (1992), los protozoos en general son abundantes en todos los procesos de tratamiento de aguas residuales (más de 400 especies). Entre las amibas comúnmente encontradas están *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Naegleria*. Según el mismo autor, es común encontrar concentraciones de 50 000 células por ml de agua de una planta de lodos activados, es decir que aproximadamente el 5% de peso seco de los sólidos suspendidos en un tanque de aereación.

Estación NO (Tlalnepantla)

En esta estación de muestreo se obtuvo una frecuencia y heterogeneidad muy baja de AVL (fig. 4), lo cual puede atribuirse a:

- El I_U de la zona es de 0.65 y la mayor parte del área restante está pavimentada o cubierta por áreas verdes, por lo que una de las principales fuentes de AVL está limitada.

- Aunque escasos, los valores sobre la velocidad del viento (tabla 5) muestran que en esta zona, la velocidad del viento fue menor que en las otras estaciones de muestreo, es decir, que uno de los principales mecanismos de resuspensión de partículas estuvo limitado.

◦ Esta estación de muestreo se encuentra ubicada en una zona industrial, y frecuentemente las concentraciones de los principales contaminantes atmosféricos (partículas, óxidos de nitrógeno y azufre, monóxido de carbono) rebasaron los límites establecidos por la SEDUE (1986), especialmente durante la época fría cuando se producen inversiones térmicas de mayor duración, lo cual provoca una mayor concentración de contaminantes (PICA, 1990).

Precisamente durante esta época (febrero y enero) (tabla 2) fue cuando se obtuvieron los únicos aislamientos de la zona. Es probable que los altos niveles de esos contaminantes en la atmósfera durante esos periodos, hayan afectado negativamente la viabilidad de las AVL menos resistentes, y solo fuera posible aislar a los más resistentes como los de *Acanthamoeba*, *Valhkampfia* y *Filamoeba*. Es la primera vez que se reportan representantes del género *Filamoeba* en condiciones ambientales tan adversas.

◦ Por otro lado, Schlichting (1986a) dice que en las áreas industriales, los periodos de muestreo no deben exceder de dos horas, ya que junto con las partículas viables también se concentran partículas tóxicas que pueden dañar a los organismos. En el presente estudio, el tiempo de muestreo fue de una hora, pero con el propósito de favorecer la rehidratación de los quistes amibianos, las aeropartículas permanecieron en el medio líquido (MBB) durante una semana, por lo que especialmente en esta estación, el tiempo de exposición sí pudo haber afectado la viabilidad de algunas AVL, contribuyendo de esa manera, a que la frecuencia de aislamientos fuera tan baja en esta estación de muestreo.

Estación SO (Pedregal)

En esta estación se registró el menor número de aislamientos de AVL (8) (fig. 4), lo que se puede atribuir a lo siguiente:

◦ El I_U de la zona es de 0.25 (Rapoport *et al.*, 1983; Rosas *et al.*, 1993). En esta zona se encuentra una de las áreas verdes más grandes de la ZMCM, donde la cubierta vegetal reduce significativamente la suspensión del polvo (Salazar *et al.*, 1992). La superficie restante está cubierta por pavimento y rocas volcánicas. Debido a lo anterior, las áreas de suelo desnudo son escasas, y por lo tanto, también una de las principales fuentes de AVL.

◦ Las emisiones locales de aeropartículas son escasas, ya que la estación de muestro está ubicada en el jardín de una escuela cubierto por pasto, árboles y rocas volcánicas. Todas esas características se vieron claramente reflejadas en la baja concentración de aeropartículas registradas, durante todo el año de estudio (tabla 4). De hecho, fue la única estación en la que las concentraciones de PST, siempre estuvieron por debajo de los límites establecidos por las normas oficiales mexicanas (RAMA, 1995, 1996).

◦ Por otro lado, la dirección predominante de los vientos ocasiona que los contaminantes generados en las zonas norte y centro sean distribuidos en su camino hacia el sur. En ese trayecto, algunos contaminantes como las aeropartículas tienden a diluirse, disminuyendo gradualmente su concentración (PICA, 1990; RAMA, 1996).

◦ Los hidrocarburos y óxidos de nitrógeno (en presencia de energía solar), durante su transporte hacia el sur van reaccionando entre sí, dando lugar a la formación de ozono (O_3) (entre otros contaminantes). Ésto, junto con las emisiones locales y la acumulación por efecto de la barrera natural que forma la sierra del Ajusco, provocaron que la concentración de O_3 en esta estación de muestreo, rebasara durante todo el año los límites establecidos por las normas oficiales mexicanas (0.11 ppm en 1 hora, una vez al año, en un período de tres años) (RAMA, 1995, 1996).

Debido a las altas concentraciones de O_3 y a su alto poder oxidante, es probable que las AVL menos resistentes sean dañadas e incluso, muchas de ellas eliminadas. Por lo anterior, es posible que las altas concentraciones de este compuesto sean un factor adicional en la eliminación de AVL de la atmósfera en esta estación de muestreo.

Con respecto a la ubicación taxonómica de las AVL, aún existen muchas incógnitas por aclarar. El método de identificación más sencillo y más ampliamente usado es el criterio morfológico. Las claves taxonómicas de Page (1976, 1988), la de Pussard & Pons (1977) y la guía ilustrada de los protozoos de Lee *et al.*, (1985) están basadas en ese criterio. Sin embargo, debido al potencial patógeno de *Naegleria* y *Acanthamoeba* se han propuesto e instrumentado otros criterios de identificación para este grupo. Hasta la fecha, la comparación de patrones enzimáticos continúa siendo la más utilizada (De Jonckheere, 1980, 1982, 1983; John, 1993). Esta prueba se utiliza con fines de identificación, especialmente para los géneros que contienen especies patógenas.

De Jonckheere (1980; 1983) dice que la comparación de isoenzimas es una herramienta útil para identificar *Acanthamoeba* y *Naegleria* a nivel de especie; sin embargo, admite que una misma especie puede mostrar diferentes zimogramas. El mismo autor realizó la comparación de 30 cepas de referencia de *Acanthamoeba* procedentes de diferentes ambientes, demostrando que organismos identificados como de la misma especie mostraron diferencias en los zimogramas, tanto en posición como en número y grosor de las bandas. Semejantes observaciones registraron Visvesvara *et al.*, (1983), Costas & Griffiths (1984) y Weekers (1993), así como durante el presente estudio (figs. 8-9).

Los análisis de isoenzimas normalmente se realizan a partir de AVL cultivadas en medios axénicos. Sin embargo, en ambientes naturales las amibas consumen principalmente bacterias, pero también restos de otros organismos, algas, etc. (Fenchel, 1987). Un estudio comparativo de isoenzimas realizado por Weekers (1993) con amibas cultivadas en medios axénicos y monoxénicos, mostró diferencias entre los zimogramas, lo cual sugiere, que así como un cambio de la fuente de alimento induce cambios importantes en su patrón enzimático, es muy probable que existan otros factores que actúen de forma semejante.

Según Jacobson & Bond (1987), las poblaciones naturales de *Acanthamoeba* tienen una mayor diversidad genética que las poblaciones cultivadas axénicamente, debido a que en los cultivos axénicos se da una selección genética. Basados en sus resultados, estos autores señalaron que cepas de la misma especie pueden mostrar una gran heterogeneidad, debido a que se reproducen asexualmente y en ausencia de recombinación genética normal, la dispersión de nuevos elementos genotípicos dentro de la población puede ser inhibido. Ello previene la creación de nuevas especies y en consecuencia, existe una mayor heterogeneidad dentro de las especies originales. Esto conduce a pensar que lo mismo puede ocurrir con todas las AVL, ya que su forma de reproducción es la misma.

Las observaciones de Weekers (1993) y Jacobson & Bond (1987) explican las diferencias observadas entre los zimogramas de las cepas de referencia y los zimogramas de los aislamientos realizados durante el presente estudio (figs. 8-9).

Como se puede ver, el uso de zimogramas es muy útil, pero no es posible utilizarlo como herramienta única para ubicar taxonómicamente a las AVL. De Jonckheere (1983) y Page (1988) entre otros, recomiendan tomar en cuenta otros elementos como: características morfológicas, hábitat de donde proceden, tolerancia a la temperatura y capacidad patógena.

Con respecto a la prueba de patogenicidad (tabla 8), se ha demostrado ampliamente que la virulencia de las AVL patógenas disminuye significativamente cuando se mantiene prolongadamente a las amibas patógenas en cultivo axénico, sin embargo, también es posible restaurar la virulencia a los niveles originales haciendo pases en serie por ratón (John & Howard, 1993). Debido a lo anterior, De Jonckheere (1980), entre otros autores, recomienda realizar la prueba de patogenicidad lo más pronto posible después de obtener el cultivo axénico.

En el presente estudio no fue posible realizar la prueba de patogenicidad inmediatamente; en primer lugar, debido a que no todas las AVL se axenizan al mismo tiempo; además, por la gran cantidad de ratones y espacio que se hubieran requerido simultáneamente. Ésta es una de las probables explicaciones de la no-patogenicidad de algunas acantamebas probadas, ya que -aunque algunas de ellas fueron ubicadas como pertenecientes a especies definidas como patógenas-, en la prueba de patogenicidad no mostraron ningún grado de virulencia. Éste pudo ser el caso, por ejemplo, de dos de las cuatro *A. hatchetti* aisladas (tabla 8).

El 51% de los aislamientos de *Acanthamoeba* mostró patogenicidad con diferentes grados de virulencia (tabla 8). Este porcentaje representa el 24% del total de aislamientos, lo que - desde el punto de vista de salud pública- es de especial importancia, ya que a través del aire se pueden depositar en la piel y mucosas del cuerpo, y en algunos casos, producir infecciones como EAG, queratitis, otitis y uveítis. De la misma manera pueden contaminar todo tipo de agua y en general, pueden colonizar casi cualquier hábitat. Asimismo, es

necesario recordar que *Acanthamoeba* es un organismo oportunista, por lo que es necesario que incidan varios factores al mismo tiempo para que se produzca la infección:

- que el individuo esté inmunocomprometido,
- que el inóculo amibiano sea alto,
- que las amibas tengan cierto grado de virulencia

Con respecto a la concentración del inóculo necesario para producir alguna de las infecciones que causan las AVL, Siclet & Bard (1996) dicen que en el caso de la MEAP, el riesgo es de 1 caso en 2.6 millones de nadadores, en agua contaminada con AVL a una concentración de 1-10 células de *Naegleria fowleri* por litro.

A excepción de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, el resto de las especies aisladas en este estudio, no han sido reportadas como patógenas, lo cual no descarta que en determinadas circunstancias algunas de ellas puedan serlo, como ocurrió con *B. mandrillaris*, que era considerada inocua hasta que se descubrió su capacidad patógena (Visvesvara *et al.*, 1990). Debido a lo anterior, la prueba de patogenicidad también se realizó en las amibas diferentes al grupo *Naegleria-Acanthamoeba*, sin embargo, en ese caso ninguno de los aislamientos resultó patógeno en ratón.

Un riesgo adicional desde el punto de salud pública, es el hallazgo de que existen varias bacterias patógenas capaces de sobrevivir dentro de algunas AVL. Hasta hoy, se han identificado a los siguientes géneros como portadores de bacterias patógenas: *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Willaertia*, *Vannella*, *Vexillifera* y *Echinamoeba* (Wadowsky *et al.*, 1991; West *et al.*, 1991; Baker & Brown, 1994; Yasuda *et al.*, 1996).

Baker & Brown (1994) mencionan que las bacterias internalizadas se encuentran en alguno de los siguientes grupos:

a) las que se multiplican y causan lisis de la célula amibiana, liberándose en el ambiente, como en el caso de *Legionella pneumophila* (produce la enfermedad de los legionarios, una forma seria de neumonía atípica).

b) las que se multiplican sin causar lisis celular como *Vibrio cholerae*. Esta bacteria sobrevive dentro de los quistes de *Naegleria* y se puede recuperar después de que la amiba exhista. Las AVL en este caso, ayudan a mantener a *V. cholerae* en aguas naturales en partes del mundo donde no hay asociación evidente con casos de cólera clínico.

c) Aquellas que sobreviven sin multiplicarse. Algunas bacterias coliformes, *Mycobacterium avium*, *M. leprae*.

De esta manera, el quiste amibiano no sólo ofrece a las bacterias un mecanismo de protección para evadir ambientes hostiles, sino que también les provee un medio para transportarse y colonizar nuevos hábitats aprovechando la dispersión de las AVL por el aire.

8. CONCLUSIONES

- Se identificaron en total 29 especies de AVL de la atmósfera de la ZMCM, de las cuales, 15 son nuevos registros con respecto a la literatura revisada.

- Por primera vez, se evaluó el potencial patógeno de las AVL aisladas de la atmósfera.

- Es el primer estudio en el que se describe la presencia de las AVL en la atmósfera durante un ciclo anual.

- La mayor parte de las amibas aisladas durante este estudio, son habitantes comunes del suelo, por lo que se sugiere que la principal fuente de AVL de la atmósfera de la ZMCM fue el suelo.

- La habilidad de las AVL para formar quistes es fundamental para su sobrevivencia y dispersión en la atmósfera.

- Amibas pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba*, *Valhkampfia*, *Hartmannella* y *Filamoeba* se aislaron durante todo el año de muestreo, lo que confirma su resistencia en condiciones ambientales extremas.

- Las AVL más frecuentes en la atmósfera de la ZMCM (47.2 %), fueron las pertenecientes al género *Acanthamoeba*, lo que confirma su ubicuidad, abundancia en el ambiente y resistencia de su quiste.

- La presencia de amibas patógenas del género *Acanthamoeba* en el aire de la ZMCM, representa un importante factor de riesgo para los seres humanos, especialmente para los más debilitados o inmunosuprimidos.

- Para ubicar taxonómicamente a las AVL, no es suficiente el análisis de isoenzimas como herramienta única, es necesario tomar en cuenta otras características como morfología, tolerancia a la temperatura, capacidad patógena así como el hábitat de donde proceden.

- Para determinar el origen de las AVL en la atmósfera, es útil conocer el IU de cada zona, pero es más importante conocer las características del espacio restante, es decir si se trata de suelo desnudo o cubierto.

- Las principales fuentes de aeropartículas de la atmósfera de la ZMCM, son el suelo, la suspensión de polvo de áreas pavimentadas y sin pavimentar, la industria, los tiraderos a cielo abierto y el uso intenso de automóviles.

- El patrón natural de los vientos (de norte a sur) en la ZMCM, es determinante en la distribución de las aeropartículas, incluyendo a las AVL.

- Entre 5 y 2 m de altura no hubo diferencias significativas, en relación a la frecuencia y heterogeneidad de las AVL.

- Entre las temperaturas de incubación probadas (37°C y temperatura ambiente), no hubo diferencias significativas en relación a la frecuencia y heterogeneidad de las AVL.

- La diferencia en el número de aislamientos entre las cuatro estaciones de muestreo sí fue significativa. La abundancia en orden decreciente resultó como sigue: NE > SE > NO > SO.

- La diferencia en frecuencia y heterogeneidad de las AVL, entre las cuatro estaciones de muestreo, se vió favorecida por la considerable distancia entre ellas, lo que permite que cada estación tenga características muy particulares, así como a la capacidad de sobrevivencia de cada una de las AVL. Esto último debido a las características de cada especie en relación a su fisiología, morfología y a su capacidad para producir estructuras de resistencia.

- En general, las AVL fueron más abundantes en el oriente del Valle de México, lo que permite sugerir que el lecho seco del Lago de Texcoco es una de las fuentes más importantes de aeropartículas de la ZMCM.

- Existe una correlación directa entre las aeropartículas y el número de aislamientos y de especies de AVL.

- La mayor frecuencia y heterogeneidad de las AVL ocurre en la época de sequía.

- Amibas pertenecientes a los géneros *Naegleria*, *Echinamoeba*, *Mastigamoeba* y *Dactylamoeba* se obtuvieron únicamente durante la época de lluvia, lo que sugiere que son poco resistentes a la desecación.

◦ Son muy escasos los estudios enfocados en determinar la importancia de las AVL del aire en relación con algunos problemas prácticos que surgen de su dispersión, tales como la contaminación de agua potable, de aguas recreativas, así como la colonización e invasión de individuos tanto sanos como enfermos por estos microorganismos. Por todo lo anterior es importante conocer los factores que determinan su presencia en la atmósfera.

9. REFERENCIAS

- Abraham, S.N. & Lawande, R.V. 1982. Incidence of free-living amoebae in the nasal passages of local population in Zaria, Nigeria. *Journ. Trop. Med. Hyg.* 85: 217-222.
- Álvarez, F.J., Méndez, R.M., Rivera, F., Ramírez, E. & Bonilla, P. 1995. Síndrome hemofagocítico relacionado con septicemia por amibas de vida libre de la familia Leptomyxidae. *Rev. de Salud del Distrito Federal.* 3(5-6): 93-95.
- Anderson, K. & Jamieson, A. 1972a. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet.* 1: 902-903.
- Anderson, K. & Jamieson, A. 1972b. Primary amoebic meningoencephalitis. *Lancet.* 2: 379.
- Anderson, O.R. 1987. Comparative Protozoology. Ecology, Physiology, Life History. Springer-Verlag. New York, U.S.A. 482 pp.
- Baker, J. & Brown, M.R.W. 1994. Trojan horses of the microbial world: protozoa and the survival of bacterial pathogens in the environment. *Microbiol.* 140: 1253-1259.
- Bamforth, S.S. 1980. Terrestrial Protozoa. *J. Protozool.* 27(1): 33-36.
- Becerra, M.M., Martínez, J.A., Visvesvara, G.S., Olvera, J.E., Alvarado, I. & Lemus, R.M. 1994. Granulomatous amebic encephalitis caused by a newly recognized opportunistic pathogen leptomyxid ameba. *Arch. Med. Res.* 25(1): 76.
- Bhattacharya, A., Ghosh, M. & Choudhury, A. 1987. Seasonal abundance of *Acanthamoeba rhyodes* (Singh, 1952) (Protozoa: Gymnamoebia) in a mangrove litter-soil ecosystem of Gangetic-estuary, India. *J. Protozool.* 34(4): 403-405.
- Bold, H.C. & Wynne, M.J. 1978. Introduction to the algae Structure and Reproduction. Prentice Hall. Englewood Cliffs, N. J. U.S.A. 706 pp.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderón, A., Gallegos, E. & Hernández, D. 1999. Occurrence of pathogenic and free-living amoebae in aquatic systems of the Huasteca Potosina, Mexico. *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope. Ecovision World Monograph Series.* Backhuys Publishers. Leiden. The Netherlands. En prensa.
- Brown, S. & De Jonckheere, J. 1999. A reevaluation of the amoeba genus *Vahlkampfia* based on SSUrDNA sequences. *Europ. J. Protistol.* 35: 49-54.

Brown, T. 1979. Observations by immunofluorescence microscopy and electron microscopy on the pathogenicity of *Naegleria fowleri* in mouse embryo cell cultures. *Journ. Med. Microbiol.* 12: 396-398.

Brown, T.J., Cursons, R.T. & Keys, E.A. 1982. Amoebae from Antarctic soil and water. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 491.

Butt, C.G. 1966. Primary amebic meningoencephalitis. *N. Engl. J. Med.* 274: 1473-1476.

Butt, C.G., Baro, C. & Knorr, R.W. 1968. *Naegleria sp.* identified in amebic encephalitis. *Am. J. Clin. Pathol.* 50: 568-574.

Calderón, C. 1997. Estudio aerobiológico de propágulos fúngicos en la atmósfera de una región tropical de altura: Ciudad de México. Tesis de Doctorado en Ciencias (Biología). Fac. de Ciencias-UNAM. México. 104 pp.

Calderón, C., Lacey, J., McCartney, A. & Rosas, I. 1995. Seasonal and diurnal variation of airborne basidiomycete spore concentrations in Mexico City. *Grana.* 34: 260-268.

Calderón, C., Lacey, J., McCartney, A. & Rosas, I. 1997. Influence of urban climate upon distribution Deuteromycete spore concentrations in Mexico City. *Int. J. Biometeorol.* 40: 71-80.

Campbell, R. 1987. Ecología microbiana. Ed. Limusa. México. 268 pp.

Campbell, S. 1993. Amebic brain abscess and meningoencephalitis. *Seminars in Neurol.* 13(2): 153-160.

Campoy, E., Gallegos, E., Robles, E., Calderón, A., Ramírez, E. & Warren, A. 1996. Estudio microbiológico del acuífero de la Cd. de León, Guanajuato, México. Memorias del XVI Coloquio de Investigación. ENEP Iztacala-UNAM. México. pp. 309.

Carter, R.F. 1968. Primary amoebic meningo-encephalitis: Clinical, pathological and epidemiological features of six fatal cases. *J. Pathol. Bacteriol.* 96: 1-25.

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 meningo-encephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 66:193-213.

Cavalier-Smith, T. 1981. Eukaryotic kingdoms: seven or nine? *BioSystems*. 14: 461-481.

Cavalier-Smith, T. 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol. Rev.* 57: 953-994.

Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, V., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R., Bonilla, P., Ramírez, E. & Suárez, 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. Experimental infection of laboratory animals by the pathogenic *Naegleria gruberi*, strain Vitek. *Folia Parasitol.* 18: 171.

Cerva, L. 1977. The influence of temperature on the growth of *Naegleria fowleri* and *N. gruberi* in axenic culture. *Folia Parasitol.* 24: 221-228.

Cerva, L. & Novak, K. 1968. Amoebic meningoencephalitis. Sixteen fatalities. *Science*. 160: 92

Cerva, L., Serbus, C. & Skocil, V. 1973. Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitol.* 20: 97-103.

Cline, M., Carchman, R. & Marciano-Cabral, F. 1986. Movement of *Naegleria fowleri* stimulated by mammalian cells *in vitro*. *J. Protozool.* 33: 10-13.

Corliss, J.O. 1994a. An interim utilitarian ("user-friendly") hierarchical classification and characterization of the protists. *Acta Protozoologica*. 33: 1-35.

Corliss, J.O. 1994b. The place of the protists in the microbial world. *USFCC Newsletter*. 24: 1-6.

Coronado-Gutiérrez, R. & López-Ochoterena, E. 1980. Análisis protozoológico de diez piscinas localizadas en el Distrito Federal y en el Estado de Morelos, México. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 22: 157-160.

Costas, M. & Griffiths, A.J. 1985. Enzyme composition and the taxonomy of *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* 32: 604-607.

Culbertson, C.G. 1975. Soil amoeba infection. Specific immunoenzymatic (peroxidase) staining of formalin-fixed sections. *Am. J. Clin. Pathol.* 63: 475-482.

Culbertson, C.G., Smith, J.W. & Minner, J.R. 1958. *Acanthamoeba*: Observations on animal pathogenicity. *Science*. 127: 1506.

Culbertson, C.G., Smith, J.W., Cohen, H.J., Minner, J.R. 1959. Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am. J. Pathol.* 35: 485-197.

Cursons, R.T.M. & Brown, T.J. 1978. Use of cell cultures as an indicator of pathogenicity of free-living amoebae. *Journ. Clin. Path.* 31: 1-11.

Curds, C.R. 1992. Protozoa in the Water Industry. Cambridge University Press. New York, U.S.A. 122 pp.

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. 1979. Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: Survey in Belgium. *Ann. Microbiol. Inst. Pasteur.* 130B: 205-212.

De Jonckheere, J.F. 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 681-685.

De Jonckheere, J.F. 1981. *Naegleria australiensis* sp. nov., another pathogenic *Naegleria* from water. *Protistologica* 17: 423-429.

De Jonckheere, J.F. 1982. Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* spp, using agarose isoelectric focusing. *Ann. Microbiol.* 133A: 319-342.

De Jonckheere, J.F. 1983. Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomic of the genus *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* 30(4): 701-706.

De Jonckheere, J.F. 1987. Taxonomy. *En: E.G. Rondanelli (ed). Amphizoic Amoebae: Human pathology infectious diseases.* Color Atlas Monograph. Piccin Nuova Libreria, Pavia, Italy. pp. 25-48.

De Jonckheere, J.F., Pernin, P., Scaglia, M. & Michel, R. 1984. A comparative study of 14 strains of *Naegleria australiensis* demonstrates the existence of a highly virulent subspecies: *N. australiensis italica* n. sp. *J. Protozool.* 31: 324-331.

Díaz, J. Osuna, A., Rosales, M.J., Cifuentes, J. & Mascaró, C. 1991. Sucker-like structures in two strains of *Acanthamoeba*: scanning electron microscopy study. *Intern. Journ. Parasitol.* 21(3): 365-367.

Dos Santos, J.G. 1970. Fatal primary amebic meningoencephalitis: A retrospective study in Richmond, Virginia. *Am. J. Clin. Pathol.* 54: 737-742.

Dunnebacke, T.H. & Schuster, F.L. 1985. Morphological response of cultured cells to *Naegleria amoeba* cytopathogenic material. *J. Cell Sci.* 75: 1-16.

Edmons, R. (ed.). 1979. Aerobiology. The ecological systems approach. Dowden, Hutchinson & Ross Inc. Pennsylvania, U.S.A. 386 pp.

Fenchel, T. 1987. Ecology of Protozoa. The biology of free-living phagotrophic protist. Springer-Verlag. New York, U.S.A. 197 pp.

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

Ferrante, A. & Bates, E.J. 1988. Elastasa in the pathogenic free-living amoebae *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp. *Infection and Immunity.* 56: 3320-3321.

Fowler, M. & Carter, R.F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Brit. Med. J.* 2: 740-742.

García, E. 1988. Modificaciones al Sistema de clasificación climática de Köppen. Ed. Laríos. México. 217 pp.

Gregory, P.H. 1960. Outdoor aerobiology. *Endeavour.* 19(76): 223-228.

Gregory, P.H. 1973. The microbiology of the atmosphere. Leonard Hill Books. Aylesbury, Bucks, Great Britain. 377 pp.

Grell, K.G. 1973. Protozoology. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 554 pp.

Griffin, J.L. 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecological interactions and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J. Protozool.* 30: 403-409.

Gullett, J., Mills, J., Hadley, K., Podemsky, B., Pitts, L. & Gelber, R. 1979. Disseminated granulomatous *Acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. *Am. J. Med.* 67: 891-896.

Honigberg, B.M., Balamuth, W., Bovee, E.C., Corliss, J.O., Gojdics, M., Hall, R.P., Kudo, R.R., Levine, N.D., Loeblich, A.R. Jr, Weiser, J. & Wenrich, D.H. 1964. A revised classification of the phylum Protozoa. *J. Protozool.* 11: 7-20.

Hysmith, R.M. & Franson, R.C. 1982. Degradation of human myelin by phospholipase-enriched culture media of pathogenic *Naegleria fowleri*. *Biochim. Biophys. Acta.* 712: 698-701.

Jacobson, L. & Band, R. 1987. Genetic heterogeneity in a natural population of *Acanthamoeba polyphaga* from soil, an isoenzyme analysis. *J. Protozool.* 34(1): 83-86.

Jadin, J.B. 1987. History. *En: E.G. Rondanelli (ed). Amphizoic Amoebae: Human pathology infectious diseases.* Color Atlas Monograph. Piccin Nuova Libreria, Pavia, Italy. pp. 1-20.

Jadin, J.B., Hermanne, J., Robyn, G., Willaert, E., Van Maercke, Y. & Stevens, W. 1971. Trois cas de méningo-encéphalite amibienne primitive observés a Anvers (Belgique). *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* 51: 255-266.

Jahnes, W.G., Fullmer, H.M. & Li, C.P. 1957. Free living amoebae as contaminants in monkey kidney tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 96: 484-488.

Jaramillo, Y.R., Chávez, M.G., Olvera, R.J. & Martínez, J.A. 1989. Encefalitis por una nueva amiba de vida libre, probablemente *Leptomyxid*. *Patología.* 27: 137-141.

Jáuregui, E. 1987. Climas. *En: Atlas de la Ciudad de México.* México. El Colegio de México. pp. 37-40.

John, D.T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amebae. *En: Kreier, J.P. & Baker, J.R. (eds.). Parasitic protozoa.* Academic Press. San Diego California, U.S.A. 2(3): 143-246.

John, D.T. & Howard, M.J. 1993. Virulencia of *Naegleria fowleri* affected by axenic cultivation and passage in mice. *Folia Parasitol.* 40: 187-191.

John, D.T., Cole, T.B. Jr. & Bruner, R.A. 1985. Amebostomas of *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 32: 12-19.

John, D.T. Cole, T.B., Jr. & John, R.A. 1991. Flagella number among *Naegleria* flagellates. *Folia Parasitol.* 38: 289-295.

Jones, D.B., Visvesvara, G.S. & Robinson, N.M. 1975. *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* 95: 221-232.

Kilvington, S., Mann, P. & Warhurst, D. 1984. Differentiation between *Naegleria fowleri* and *N. lovaniensis* using isoenzyme electrophoresis of aspartate aminotransferase. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 562.

Kingston, N. & Taylor, P.C. 1976. *Naegleria sp.*, an amoeboflagellate from *Physa gyrina* Say in a high mountain lake in Wyoming. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.* 43: 227-229.

Kingston, F. & Warhurst, D.C. 1969. Isolation of amoebae from the air. *J. Med. Microbiol.* 2: 27-36.

Kinnear, F.B. 1998. Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* and *Hartmannella* for human corneal keratocytes. *Memorias 8th International Conference on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae*. Tennessee, U.S.A.

Kyle, D.E. & Noblet, G.P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* 33: 422-434.

Lacey, J. 1995. Whither Aerobiology?. *International Aerobiology Newsletter*: 41.

Lares, F., De Jonckheere, J., De Moura, H., Rechi, I.A., Ferreira, G.E., Fernández, Q.G., Ruiz, M.C. & Visvesvara, G.S. 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. *Journ. Clin. Microbiol.* 31(3): 685-688.

Lawande, R.V. 1983. Recovery of soil amoebae from the air during the harmattan in Zaria, Nigeria. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 77: 45-49.

Lawande, R.V., Abraham, S.N., John, I. & Egler, L.J. 1979. Recovery of soil amebas from the nasal passages of children during the dusty harmattam period in Zaria. *Am. J. Clin. Pathol.* 71: 201-203.

Lawande, R.V., MacFariane, J.T., Weir, W.R.C. & Awunor-Renner, C. 1980. A case of primary amoebic meningoencephalitis in a nigerian farmer. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29: 21-25.

Lee, J.J., Hunter, S.H. & Bovee, E.C. (eds.). 1985. An Illustrated Guide to the Protozoa. Society of Protozoologist, Kansas. U.S.A. pp. 1-17; 158-190.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F.G. 1980. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27: 37-58.

López-Corella, E., De León, B.B. & De Jonckheere, J.F. 1989. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo Michoacán, México. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 46(9): 619-622.

Lowrey, D.M. & McLaughlin, J. 1985. Activation of a heat-stable cytolytic protein associated with the surface membrane of *Naegleria fowleri*. *Infect. Immun.* 50: 478-482.

Ma, P., Visvesvara, G.S., Martínez, J.A., Theodore, F.H., Daggett, P.M. & Sawyer, T.K. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections: review. *Rev. Inf. Dis.* 12(3): 490-513.

Mandal, B.N., Gudex, D.J., Fitchett, M.R., Pullon, D.H.H., Malloch, J.A., David, C.M. & Apthorp, J. 1970. Acute meningo-encephalitis due to amoebae of the order Myxomycetale (slime mould). *N. Z. Med. J.* 71: 16-23.

Mandrioli, P. 1998. Review. Basic aerobiology. *Aerobiologia.* 14: 89-94.

Marciano-Cabral, F. 1988. Biology of *Naegleria* spp. *Microbiol. Rev.* 52: 114-133.

Marciano-Cabral, F., Zoghby, K. & Bradley, G. 1990. Cytopathic action of *Naegleria fowleri* amoebae on rat neuroblastoma target cells. *J. Protozool.* 37(2): 138-144.

Marciano-Cabral, F., Stanitski, S., Radhakrishna, V. & Bradley, S.G. 1987. Characterization of a neutral aminoacylpeptide hydrolase from *Naegleria fowleri*. *J. Protozool.* 34: 146-149.

Martínez, J.A. 1980. Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection?. *Neurol.* 30: 567-574.

Martínez, J.A. 1985. Free living amebas: Natural history, prevention, diagnosis and treatment of disease. CRC Press. Boca Raton, Florida, U.S.A. 156 pp.

Martínez, J.A. 1993. Free-living amebas: Infection of the central nervous system. *The Mount Sinai J. Med.* 40(4): 271-278.

Martínez, J.A. & Amado-Ledo, E. 1979. Meningoencefalitis y encefalitis producidas por amebas de vida libre. *Protozool. Epidemiol. Neuropatol. Morfol. Normal Patol.* 3(B): 679-704.

Martínez, J.A. & Visvesvara, G. 1997. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7: 583-598.

Martínez, J.A. & Visvesvara, G. 1998. Pathogenic and opportunistic free-living amebic infections in animals. *Memorias 8th International Conference on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae.* Tennessee, U.S.A.

Martínez, J.A., Guerra, A.E., García, J., Céspedes, G., González, J. & Visvesvara, G. 1994. Granulomatous amebic encephalitis: a review and report of a spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol.* 87: 430-434.

Martínez, J.A., Sotelo-Avila, C., García-Tamayo, J., Moron, J.T., Willaert, E. & Stamm, W.P. 1977. Meningoencephalitis due to *Acanthamoeba* sp: pathogenesis and clinicopathological study. *Acta Neuropathol.* 37: 183-191.

Mascaró, M.L., Mascaró, M.C., Osuna, A., Pérez, M.I. & González-Castro, J. 1986. Study of an ameboflagellate isolated from the nasal mucosa of man. *J. Protozool.* 33(1): 89-93.

Moreno, M.S. & Noreña, C. 1986. El agua en el desarrollo de zonas urbanas. *Agua potable.* 1(25): 24-28.

Nagington, J. 1975. Isolation of amoebae from eye infections in England. *Trans. Ophthalmol. Soc. U.K.* 95: 207-209.

Nicholson, K.W. 1988. A review of particle resuspension. *Atmospheric. Environ.* 22: 2639-2651.

Omaña, M. 1997. Estudio comparativo de 3 cepas del género *Acanthamoeba* responsables de los primeros casos detectados de queratitis amebiana en México. Tesis de Maestría en Ciencias en el Área de Microbiología. FES-Cuautitlán-UNAM. México. 165 pp.

Page, F.C. 1966. Taxonomical Criteria for the small amoebae, with a re-definition of the genera *Hartmannella* and *Acanthamoeba* and description of eight new species. Tesis doctoral. Universidad de Wisconsin, Madison. U.S.A. 525 pp.

Page, F.C. 1974. A further study of taxonomic criteria for limax amoebae, with descriptions of 3 new species and a key to genera. *Arch. Protistenk.* 116: 149-184.

Page, F.C. 1976. An Illustrated key to freshwater and soil amoebae with notes on cultivation and ecology. Freshwater Biol. Assoc. Cumbria, England. 155 pp.

Page, F.C. 1985. The limax amoebae: comparative fine structure of the Hartmannellidae (Lobosea) and further comparisons with the Vahlkamfiidae (Heterolobosea). *Protistologica.* 21(3): 361-383.

Page, F.C. 1988. A new Key to Freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association. Cumbria, England. 122 pp.

PICA. 1990. Programa integral contra la contaminación atmosférica. Documento Criterio, Departamento del Distrito Federal. México. 75 pp.

Pussard, M. & Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica.* 13(4): 557-598.

RAMA. 1995. Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México. Comisión metropolitana para la prevención y control de la contaminación ambiental en el Valle de México. DDF-Secretaría del Medio Ambiente. México. 45 pp.

RAMA. 1996. Red Automática de Monitoreo Atmosférico de la Ciudad de México. Comisión ambiental metropolitana. Informe anual de la calidad del aire. DDF-Secretaría del Medio Ambiente. 25 pp.

Rapoport, E.H., Díaz, M.E. & López, I.R. 1983. Aspectos de la ecología urbana en la Ciudad de México. Ed. Limusa. México. pp. 15, 16, 22.

Rico-Ferrat, G. 1985. Estudio biológico de algunas especies de protozoarios recolectados en un suelo de tipo andosol órtico. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 27: 27-30.

Rico-Ferrat, G. & López-Ochoterena, E. 1976. Aspectos biológicos de los protozoarios de las aguas negras de la zona metropolitana de la Ciudad de México. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 37: 221-227.

Riestra, J.M., Riestra, R., González, A., Peña, P., Martínez, J., Visvesvara, G., Jardon, F., Oropeza, J.L. & González, S. 1997. Granulomatous amebic encephalitis due to *Balamuthia mandrillaris* (Leptomyxiidae): report of four cases from Mexico. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(6): 603-607.

Rivera, F. & Paz, M.E. 1978a. Criterios taxonómicos para las amebas limax. *Arch. Mex. Anat.* 15: 72.

Rivera, F., Paz, M.E. & López-Ochoterena, E. 1978b. Transformación ameboflagelar espontánea e inducida en amibas del género *Naegleria sp.* aisladas de piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México. *Arch. Mex. Anat.* 15: 9-19.

Rivera, F., Paz, M.E. & López-Ochoterena, E. 1978c. Estudio biológico de amebas del grupo limax, géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*. *Arch. Mex. Anat.* 15(3): 54.

Rivera, F., Romero, R. & Medina, F. 1984a. Meningoencefalitis amibiana primaria producida por *Naegleria fowleri*. *Rev. Fac. Med. México.* 27(3): 113-122.

Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, E. & Paz, M.E. 1979. A quantitative, morphological and ecological study of protozoa polluting tap-waters in Mexico City. *Trans. Am. Micros. Soc.* 98(3): 465-469.

Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E. & Medina, F. 1983. A survey of pathogenic and free-living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. *Environ. Res.* 32: 205-211.

Rivera, F., Galván, M., Robles, E., Leal, P., González, L. & Lacy, A.M. 1981. Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. *J. Protozool.* 28(1): 54-56.

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

Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P. & Lares, F. 1987. Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environ. Res.* 42: 149-154.

Rivera, F., García, G., Lugo, A., Zierold, E., Islas, J., Ramírez, E. & Bonilla, P. 1986a. Amoebae in a waste stabilization pond system in Mexico. *Water, Air and Soil Pollution.* 28: 185-198.

Rivera, F., Lares, F., Morayta, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Xóchihua, L. & Calderón, A. 1989a. Contaminación del líquido cefalorraquídeo de un infante con síndrome de Arnold-Chiari tipo II, hidrocefalia y mielomeuingocele, por *Naegleria lovaniensis*. *Rev. Enferm. Infecc. Ped.* 2(9): 91-94.

Rivera, F., Rosas, I., Castillo, M., Chávez, M., Gómez, R., Chio, R.E. & Islas, J. 1986b. Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients: II. *Environ. Res.* 39: 364-371.

Rivera, F., Warren, A., Ramírez, E., Decamp, O., Bonilla, P., Gallegos, E., Calderón, A. & Sánchez, J.T. 1995. Removal of pathogens from wastewaters by the root zone method (RZM). *Wat. Sci. Tech.* 32(3): 211-218.

Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D. & 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.

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

Rivera, F., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ramírez, J., Xóchihua, L. & 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., Saha, A. & Glew, R. 1990. *Naegleria lovaniensis tarasca* new subspecies, and the purepecha strain, a morphological variant of *N. lovaniensis*, isolated from natural thermal waters in Mexico. *J. Protozool.* 37(4): 301-310.

Rivera, F., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos, E., Labastida, A. & Chávez, M. 1992. Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution.* 61: 17-36.

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

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

Rodríguez, S., Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Gallegos, E., Calderón, A., Ortiz, R. & Hernández, D. 1993. Amoebological study of the atmosphere of San Luis Potosí, SLP. México. *Journ. Exp. Anal. Environ. Epidemiol.* 3: 229-241.

Rondanelli, E.G. (ed). 1987. Amphizoic Amoebae: Human Pathology. Infectious diseases. Color atlas monographs. Piccin, Pavia, Italy. 279 pp.

Rosas, I. & Roy-Ocotla, G. 1985. La aerobiología una ciencia multidisciplinaria. Memorias III Curso y Simposio sobre Biología de la Contaminación. ENEP-Iztacala-UNAM-CONACyT-UPN-DDF. México, D.F. p. 41.

Rosas, I., Belmont, R. & Jauregui, E. 1995. Seasonal variation of atmospheric lead levels in three sites in Mexico City. *Atmósfera.* 8: 157-168.

Rosas, I., Roy-Ocotla, G. & Mosiño, P. 1989. Meteorological effects on variation of airborne algae in Mexico. *Int. J. Biometeorol.* 33: 173-179.

Rosas, I., Yela, A. & Santos-Burgoa, C. 1994. Occurrence of airborne enteric bacteria in Mexico City. *Aerobiologia.* 10: 39-45.

Rosas, I., Calderón, C., Ulloa, M. & Lacey, J. 1993. Abundance of airborne *Penicillium* CFU in relation to urbanization in Mexico City. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(8): 2648-2652.

Rosas, I., Calderón, C., Martínez, L., Ulloa, M. & Lacey J. 1997. Indoor and outdoor airborne fungal propagule concentrations in Mexico City. *Aerobiologia.* 13: 23-30.

Rosas, I., Roy-Ocotla, G., Mosiño, P., Báez, A. & Rivera, L. 1987. Abundance and heterogeneity of algae in the Mexico City atmosphere. *Geof. Int.* 26(3): 359-373.

Salazar, S., Lemoyne, L. & Rosas, I. 1992. Preliminary results of size distribution particles in Mexico City. *Water, Air and Soil Pollution.* 64: 649-658.

Schlichting, H.E. Jr. 1961. Viable Species of Algae and protozoa in the atmosphere. *Lloydia.* 24: 81-88.

Schlichting, H.E. Jr. 1964. Meteorological conditions affecting of airborne algae and protozoa. *Lloydia* 27: 64-78.

Schlichting, H.E. Jr. 1969. The importance of airborne algae and protozoa. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 19: 946-951.

Schlichting, H.E. Jr. 1986a. Airborne algae. Memorias VI Coloquio de investigación en ciencias de la salud, el medio ambiente y la educación. ENEP-Iztacala-UNAM. pp. 177-187.

Schlichting, H.E. Jr. 1986b. Airborne algae and protozoa. Memorias VI Coloquio de investigación en ciencias de la salud, el medio ambiente y la educación. ENEP-Iztacala-UNAM. pp. 398.

Schlichting, H.E. Jr. 1986c. Subaerial algae. Memorias VI Coloquio de investigación en ciencias de la salud, el medio ambiente y la educación. ENEP-Iztacala-UNAM. pp. 384-397.

Schlichting, H.E. Jr. 1986d. Techniques for sampling, isolating, culturing and identifying aerial microalgae. Memorias VI Coloquio de investigación en ciencias de la salud, el medio ambiente y la educación. ENEP-Iztacala-UNAM. pp. 196-205.

Schuster, F.L. 1979. Small amebas and ameboflagellates. *En: Levandowsky, M & Hutner, S.H. (eds.). Biochemistry and physiology of protozoa.* 1(2): 215-285.

SEDUE. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología. 1986. Informe sobre el estado del medio ambiente en México. México. pp. 39-41.

Siclet, F. & Bard, F. 1996. Mathematical modelling of primary amoebic meningoencephalitis risk associated with swimming in *Naegleria fowleri* contaminated water. Memorias del 7th International Conference of small freeliving amoebae. North Adelaide, Australia.

Silvany, R.E. Luckenbach, M.W. & Moore, M.B. 1987. The rapid detection of *Acanthamoeba* in paraffin-embedded sections of corneal tissue with calcofluor white. *Arch. Ophthalmol.* 105: 1366-1367.

Singh, B.N. 1975. Pathogenic and Nonpathogenic Amoebae. John Wiley & Sons. New York, U.S.A. pp. 1-33.

Sleigh, M. 1989. Protozoa and other protists. E. Arnold (ed.). London, England. 342 pp.

Steel, R. & Torrie, J. 1988. Bioestadística: Principios y procedimientos. Mc Graw Hill. México.

Steinert, M., Birkness, K., White, E., Fields, B. & Quinn, F. 1998. *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(6): 2256-2261.

Stehr-Green, J.K., Bailey, T.M. & Visvesvara, G.S. 1989. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in the United States. *Am. J. Ophthalmol.* 107: 331-336.

Symmers, W.St.C. 1969. Primary amoebic meningoencephalitis in Britain. *Brit. Med. J.* 4: 449-454.

Taratuto, A.L. Monges, J., Acefe, J.C., Meli, F., Paredes, A. & Martínez, A.J. 1991. Leptomyxid amoeba encephalitis: report of the first case in Argentina. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 85: 77.

Taylor, W.M., Pidherney, M.S., Alizadeh, H. & Niederkorn, J.Y. 1995. *In vitro* characterization of *Acanthamoeba castellanii* cytopathic effect. *J. Parasitol.* 81(4): 603-609.

Tomasini, P. & López-Ochoterena, E. 1979. Análisis taxonómico de las especies de protozoarios encontrados en el agua potable de la Ciudad de México D.F. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 21: 147-151.

Tyndall, R.L. & Ironside, K.S. 1990. Free-living amoebae: Health concerns in the indoor environments. *En: Morey, P.R., Feeley, J.C. & Otten, J.A. (eds.). ASTM STP 1071.* Philadelphia, U.S.A.

Valenzuela, G., López-Corella, E. & De Jonckheere, J.F. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78: 558-559.

Visvesvara, G.S. & Leitch, G.J. 1998. Can *Acanthamoeba* serve as vector of microsporidia, the causal agents of corneal and disseminated microsporidiosis of humans?. *Memorias 8th International Conference on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae*. Tennessee, U.S.A.

Visvesvara, G.S. & Stehr-Green, J.K. 1990. Epidemiology of free-living amoeba infections. *J. Protozool.* **37**(4): 25S-33S.

Visvesvara, G.S., Schuster, F.L. & Martínez, J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N:G, N. Sp., Agent of Amebic Meningoencephalitis in Humans and other Animals. *J. Euk. Microbiol.* **40**(4): 504-514.

Visvesvara, G.S., Mirra, S.S., Brandt, F.H., Moss, D.M., Mathews, H.M. & 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, F.L., Leitch, G., Wallace, S.V., Sawyer, T.K. & Anderson, M. 1990. Leptomyxid amoeba, a new agent of amebic meningoencephalitis in humans and animals. *J. Clin. Microbiol.* **28**: 2750-2756.

Wadowsky, R.M., Wilson, T.M., Kapp, N.J., West, A.J., Kuchta, J.M., States, S.J., Dowling, J.N. & Yee, R.B. 1991. Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1950-1957.

Weekers, P.H.H. 1993. *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. Ecophysiological, biochemical and molecular biological differences. Tesis doctoral. University of Nijmegen, The Netherlands. 122 pp.

West, N.J., Kuchta, A.J., States, J.M., Dowling, S.J.J.N. & Yee, R.B. 1991. Multiplication of *Legionella* spp. in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 1950-1957.

Willaert, E. 1974. Primary meningoencephalitis, a selected bibliography and tabular survey of cases. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **54**: 429-440.

Willaert, E. & Stevens, A.R. 1976. Indirect immunofluorescent identification of *Acanthamoeba* causing meningoencephalitis. *Pathol. Biol.* **24**: 545-547.

Willaert, E., Jamienson, A., Jadin, J.B. & Anderson, K. 1974. Epidemiological and immunoelectrophoretic studies on human and environmental strains of *Naegleria fowleri*. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **54**: 333-342.

Yasuda, T., Yagita, K., Agata, K. & Endo, T. 1996. *Vanella platypodia* as the new host of *Legionella pneumophila*. *Memorias del 7th International Conference of small freeliving amoebae*. North Adelaide, Australia.

ANEXO A

Soluciones y medios de cultivo

Medio Basal de Bold

1.- Se preparan 6 soluciones stock (macroelementos). Se disuelve el peso indicado de las siguientes sales en 400 ml de agua destilada.

NaNO ₃	10.0 g
KH ₂ PO ₄	7.0 g
K ₂ HPO ₄	3.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O.....	3.0 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O.....	1.0 g
NaCl.....	1.0 g

De estas soluciones se toman 10 ml de cada una para 1 litro de solución final.

2.- Se preparan las siguientes soluciones stock (microelementos):

a) Solución stock de EDTA

50 g de EDTA (ácido etilendiaminotetracético) y 31 g de KOH diluidos en 1 litro de agua destilada.

b) Solución stock H-Fe

4.98 g de FeSO₄ · 7H₂O se disuelven en 1 litro de agua acidificada. Ésta se prepara adicionando 1 ml de H₂SO₄ concentrado a 999 ml de agua destilada.

c) Solución stock H-Boro

11.42 g de H₃ Bo₃ se disuelven en 1 litro de agua destilada.

d) Solución stock de H-H₅

ZnSO ₄ · 7H ₂ O.....	8.82 g
MnCl ₂ · 4H ₂ O.....	1.44 g
MoO ₃	0.71 g
Cu SO ₄ · 5H ₂ O.....	1.57 g
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O.....	0.49 g

Todo lo anterior se disuelve en 1 litro de agua acidificada (como en el inciso b). Un ml de cada solución stock de microelementos se adiciona a 1 litro de la solución final. Se disuelve todo y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos.

Agar no nutritivo con *Escherichia coli* (NNE)

NaCl.....	0.12 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O.....	0.004 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O.....	0.004 g
Na ₂ HPO ₄	0.142 g
KH ₂ PO ₄	0.136 g
Bactoagar.....	15.0 g
Agua destilada.....	1000 ml

Mezclar en seco todos los ingredientes, agregar 500 ml de agua destilada y disolver, completar el volumen de 1 000 ml y hervir hasta que se disuelva el agar completamente. Esterilizar a 121°C durante 15 min. Se vierten de 15 a 20 ml en cajas Petri. Cuando el agar se haya solidificado se vierten 5 gotas de una suspensión concentrada de bacteria *E. coli* muerta por calor a 70°C durante 30 minutos, distribuyendo la suspensión de bacteria sobre la superficie del agar. Las cajas se guardan en el refrigerador.

Medio PBSGM (Chang modificado)

Peptona 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

Los ingredientes se mezclan en seco y se disuelven en el agua destilada. Se envasan 2.7 ml del medio en tubos con tapón de rosca y se esterilizan a 121°C durante 15 minutos. Ya frío el medio, a cada tubo se le agrega 0.3 ml de suero neonato de bovino con antibióticos. Se guardan en el congelador.

Preparación de suero neonato de bovino para el medio PBSGM

El suero se descongela y se pone en baño María a 56°C durante 30 min para descomplementarlo. Se prepara una mezcla de antibióticos a base de penicilina G sal sódica y kanamicina de la siguiente manera:

Penicilina G 1 000 000 U en 2 ml de agua destilada.
Kanamicina 1 g en solución 3 ml
Volumen total 5 ml

Agregar 1.0 ml de la mezcla de antibióticos por cada 100 ml de suero descomplementado. Para obtener una concentración final de 200 µg de cada antibiótico en 3.0 ml de medio PBSGM.

Medio Bactocasitona (BC)

Bactocasitona..... 2.0 g
Agua destilada..... 1 000 ml

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos, se deja enfriar y se agregan 0.3 ml de suero neonato de bovino con antibióticos. Se guardan en el congelador.

Medio Ringer

NaCl..... 6.0 g
KCl..... 0.075 g
CaCl₂..... 0.1 g
NaHCO₃ 0.1 g
Agua destilada..... 1 000 ml
pH 7-7.4

Esterilizar a 121°C durante 20 minutos, dejarse enfriar y agregar *Escherichia coli* o *Enterobacter aerogenes* inactivada.

ANEXO B

Técnica de isoelectroenfoque enzimático (IEF)

Revelado de las enzimas

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 1M.....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
Agua destilada..... 77 ml

Amortiguador de fosfatos 0.1 pH 5.7

Solución 1

NaH_2PO_46.875 g
Agua destilada.....250 ml

Solución 2

Na_2HPO_42.83 g
Agua destilada.....100 ml

Mezclar 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

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

Preparación de los concentrados amibianos para IEF

- Cada aislamiento amibiano, se resiembró en frascos para cultivo de tejidos de 25 cm³ con 15 ml de medio Chang modificado, durante tres días a 30°C o hasta observar una monocapa de trofozoítos (aproximadamente 10⁶ células por ml).
- Los frascos de cultivo se dejan durante tres minutos a -20°C. Se agitan vigorosamente y el medio se vierte en tubos de polipropileno con fondo cónico para centrifuga de 15 ml. Se centrifugan a 2 000 rpm durante 10 min y con mucho cuidado se desecha el sobrenadante.
- El concentrado celular se resuspende con agua destilada y se transfiere a tubos de microcentrifuga de 2 ml y se concentra nuevamente a 3 000 rpm durante 10 min. Se desecha el sobrenadante.
- Para lisar las células, se agregan 10 µl de Tritón X-100 y la muestra se congela y descongela dos veces a -20°C. También se pueden someter a sonicación utilizando cuatro pulsos al 30% y 15-20 watts. Los concentrados se pueden almacenar hasta un mes a -75°C o en nitrógeno líquido.
- Las muestras amibianas a determinar se descongelan a 37°C, y se vuelven a congelar inmediatamente, no es recomendable descongelar más de tres veces, ya que las enzimas pierden actividad y las marcas de los zimogramas pueden verse muy claras o no ser visibles.

Preparación de los geles de agarosa

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml, se disuelve la solución de agarosa en agua hirviendo. El gel de agarosa, se prepara mezclando lo siguiente:

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

Mientras se disuelve la agarosa, se prepara el molde de la siguiente manera:

- la tabla de nivelación se coloca horizontalmente

- vaciar 2 ml de agua destilada en el centro de la placa de nivelación
- colocar una hoja de película Gel Bond para geles de agarosa de 114 × 225 mm, sobre la placa de nivelación con la superficie hidrofílica hacia arriba
- con un rodillo se hace presión sobre la película y contra la placa de nivelación para eliminar el exceso de agua y las burbujas que se hubieran formado bajo el 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 el molde
- después de disolver completamente la agarosa, se deja enfriar a aproximadamente 75°C. Se agrega el anfolito (1.9 ml), se mezcla suavemente para no formar burbujas y se vacía rápida y uniformemente en el molde, dejando gelificar la solución de 10-15 minutos. Se retira el marco de acrílico de la tabla niveladora con cuidado para no dañar el gel. Se deja que la agarosa gelifique completamente durante 1 hora a 4°C
- se agregan 2 ml de agua destilada sobre la placa de enfriamiento de la unidad de electroforesis. Se coloca encima la película con el gel, asegurándose de que el agua se extienda en una delgada película sin burbujas. El exceso de agua se elimina con toallas de papel absorbente
- se sumergen los electrodos en las soluciones del ánodo y del cátodo respectivamente. Se colocan los electrodos sobre papel filtro por un minuto para eliminar el exceso de líquido (los electrodos no deben gotear) y luego colocarlos sobre el gel aproximadamente a 1 mm de los extremos
- se colocan 25 µl de cada una de las muestras en los papeles aplicadores de 10×5 mm
- se coloca la tapa del equipo de electroforesis asegurándose que exista un estrecho contacto entre los electrodos de la tapa y los electrodos colocados sobre el gel
- se ajusta la fuente de poder a 15W, 1500V y corriente ilimitada. Se quitan los aplicadores de muestra después de 45 minutos. Después de otros 45 minutos, se apaga el equipo, se levanta la tapa y se quitan los electrodos del gel
- se coloca el gel en la solución reveladora de la enzima correspondiente a 37°C durante 30-60 min.

- el gel se seca colocando tres hojas de papel secante sobre su superficie seguidas de una placa de vidrio y un peso de alrededor de 1 kg. Después de 15 min se remueve todo y con una secadora de pelo se termina de secar el gel.

Determinación de Proteínas totales

- El gel se coloca en una solución fijadora (ácido sulfosalicílico 5% y ácido tricloroacético 10%) por 30 min.
- Se lava el gel dos veces (25 minutos cada vez) en la solución destañadora (metanol:ácido acético:agua destilada 3:1:6). El gel se seca de la misma manera arriba descrita
- El gel ya seco se pone en la solución teñidora de Coomassie (azul brillante de Coomassie R-250 al 0.2% en solución destañadora) por 10-15 min.
- Se coloca el gel en solución destañadora hasta que el fondo del mismo se vea claro (alrededor de 15-30 min).
- Secar la película con una secadora de pelo y analizar los resultados bajo luz visible.