



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**“Amebas de vida libre patógenas asociadas a bacterias
del género *Legionella* spp. en sistemas
hídricos de contacto humano”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Ana Karen Cervantes Islas

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2012





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
	1. Amebas de vida libre.....	2
	2. <i>Naegleria fowleri</i>	3
	a. Patología.....	4
	b. Proceso infeccioso.....	4
	c. Signos y síntomas.....	5
	d. Diagnóstico.....	5
	e. Tratamiento.....	6
	f. Control de <i>N. fowleri</i>	6
	3. <i>Acanthamoeba</i> spp.....	6
	a. Patología.....	7
	b. Proceso infeccioso.....	8
	c. Signos y síntomas de la QA.....	8
	d. Diagnóstico de la QA.....	8
	e. Tratamiento de la QA.....	9
	f. Signos y síntomas de la EAG.....	9
	g. Diagnóstico de la EAG.....	9
	h. Tratamiento de la EAG.....	9
	i. Control de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	9
	4. <i>Balamuthia mandrillaris</i>	10
	a. Patología.....	11
	b. Proceso infeccioso.....	11
	c. Signos y síntomas.....	12
	d. Diagnóstico.....	12
	e. Tratamiento.....	13
	f. Control de <i>Balamuthia mandrillaris</i>	13
	5. <i>Sappinia</i> spp.....	13
	a. Patología.....	14
	b. Proceso infeccioso.....	14
	c. Signos y síntomas.....	14
	d. Diagnóstico.....	14
	e. Tratamiento.....	14
	f. Control de <i>Sappinia</i> spp.....	14
	6. Bacterias del género <i>Legionella</i>	15
	7. Taxonomía de <i>Legionella</i>	15
	8. Especies de <i>Legionella</i> de importancia médica.....	16
	9. Patologías causadas por las bacterias del género <i>Legionella</i>	16
	a. Proceso infeccioso.....	17
	b. Ciclo intracelular de <i>Legionella pneumophila</i>	18
	c. Signos y síntomas.....	19
	d. Diagnóstico.....	19

e. Tratamiento.....	20
f. Control de <i>Legonella</i> spp.....	20
10. El papel de las biopelículas en los ambientes acuáticos.....	21
11. Asociación con otros microorganismos.....	21
III. ANTECEDENTES.....	23
IV. JUSTIFICACIÓN.....	25
V. OBJETIVOS.....	26
VI. ÁREA DE ESTUDIO.....	27
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	28
1. Recolecta y transporte de las muestras.....	28
2. Aislamiento de AVL.....	28
3. Identificación de AVL	29
4. Prueba de tolerancia a la temperatura.....	29
5. Prueba de flagelación.....	29
6. Análisis estadístico para AVL.....	29
7. Aislamiento de <i>Legionella</i> spp.....	29
8. Identificación morfológica de colonias de bacterias del género <i>Legionella</i>	30
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
1. Amebas de vida libre	31
2. Amebas de vida libre patógenas en humanos.....	38
3. Prueba estadística para AVL.....	41
4. Bacterias del género <i>Legionella</i>	42
5. Amebas de vida libre y <i>Legionella</i> spp.....	44
6. Parámetros fisicoquímicos.....	48
a. Temperatura de agua.....	48
b. pH.....	49
c. Conductividad.....	50
IX. CONCLUSIONES.....	52
X. REFERENCIAS.....	54
XI. ANEXOS.....	63

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Etapas del ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i>	4
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i> e infección humana.....	5
Figura 3. Etapas del ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	7
Figura 4. Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> e infección humana.....	8
Figura 5. Etapas del ciclo de vida de <i>Balamuthia mandrillaris</i>	11
Figura 6. Ciclo de vida de <i>Balamuthia mandrillaris</i> e infección humana.....	12
Figura 7. Etapas del ciclo de vida de <i>Sappinia diploidea</i>	13
Figura 8. Ciclo infectivo de <i>Legionella pneumophila</i>	18
Figura 9. Ciclo de vida de <i>L. pneumophila</i> en protozoos y macrófagos humanos	19
Figura 10. Micrografías de transmisión de electrones del trofozoíto de <i>Hartmanella vermiformis</i> y células del epitelio alveolar de humano, infectados con <i>L. pneumophila</i>	22
Figura 11. Ubicación de los municipios y delegaciones de donde se recolectaron las muestras de agua potable provenientes de distintos contenedores.....	27
Figura 12. Contenedores de donde fueron obtenidas algunas de las muestras para identificación de AVL y de bacterias del género <i>Legionella</i>	27
Figura 13. Presencia de amebas de vida libre.....	32
Figura 14. Frecuencia de los géneros aislados de AVL.....	35
Figura 15. Frecuencia de las especies aisladas de AVL.....	36
Figura 16. Riqueza de especies identificadas en cada uno de los contenedores de agua que fueron muestreados.....	36
Figura 17. Riqueza de especies de acuerdo a los diferentes municipios y delegaciones muestreadas.....	38
Figura 18. De las 32 muestras que se obtuvieron con crecimiento amebiano, 22 presentan AVL patógenas.....	39
Figura 19. Aislados de bacterias del género <i>Legionella</i>	43

Figura 20. Ausencia de AVL y de bacterias del género <i>Legionella</i>	45
Figura 21. Presencia de AVL y de bacterias del género <i>Legionella</i>	45
Figura 22. Número de aislados de cada contenedor en donde se observó la presencia de AVL y de la bacteria del género <i>Legionella</i>	47
Figura 23. Número de aislados en donde se observó la presencia tanto de AVL como de bacterias del género <i>Legionella</i> spp., según los municipios o delegaciones muestreadas.....	47
Figura 24. Temperaturas del agua obtenida de cada uno de los contenedores muestreados.....	48
Figura 25. Registro de pH de las 101 muestras analizadas	50
Figura 26. Registro de conductividad de las 101 muestras analizadas.....	50

CONTENIDO DE CUADROS

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de las principales AVL patógenas.....	2
Cuadro 2. Especies de <i>Legionella</i> de importancia médica.....	16
Cuadro 3. Reservorios de agua analizados para la búsqueda de amebas de vida libre	32
Cuadro 4. Amebas de vida libre aisladas de las 32 muestras positivas para crecimiento amebiano.....	33
Cuadro 5. Total de géneros y especies de AVL aisladas por cada una de las muestras obtenidas.....	37
Cuadro 6. Número de aislados positivos y negativos para AVL según los municipios o delegaciones muestreadas.....	38
Cuadro 7. AVL que causan alguna patología en humanos y que fueron identificadas en este estudio	39
Cuadro 8. Número de aislados patógenos que presentó cada contenedor.....	40
Cuadro 9. Prueba de temperatura y flagelación de los aislados obtenidos.....	40
Cuadro 10: Índice de correlación de Spearman entre los parámetros fisicoquímicos y el número de aislados de AVL obtenidos.....	42
Cuadro 11. Muestras obtenidas de cada contenedor muestreado.....	43
Cuadro 12. Número de aislados positivos y negativos para <i>Legionella</i> spp. según los municipios o delegaciones muestreadas.....	44
Cuadro 13. Aislados que mostraron concordancia en la presencia de ambos organismos.....	45

I. RESUMEN

Las amebas de vida libre (AVL) son protozoos capaces de vivir como organismos de vida libre y endoparásitos, las infecciones provocadas por dichos organismos constituyen una de las infecciones oportunistas de mayor interés médico pues pueden conducir incluso a la muerte, se han descrito en casi todo el mundo y su diagnóstico depende del grado de sospecha clínica. No conforme con ello, representan una amenaza adicional para la salud humana al actuar como vehículos de multiplicación y dispersión de especies parásitas como bacterias del género *Legionella* spp. un organismo altamente patógeno, es por ello que ante la inquietud generada por la información sobre las AVL, la posible amenaza que representan al actuar como vehículos de multiplicación de este tipo de parásitos y la poca información que existe en torno a esta relación, es importante seguir investigando para que de esta manera se pueda contribuir a la prevención de brotes provocados por ambos patógenos.

Se analizaron 101 muestras de agua potable de diversos contenedores como: regaderas, cisternas, tinacos etc., provenientes de hogares y negocios de diferentes municipios y delegaciones del Distrito Federal y Área Metropolitana, con el fin de detectar organismos amebianos y bacterias del género *Legionella*. Se pudo identificar 32 aislados con presencia de AVL, entre los cuales pudieron observarse algunas de las especies más patógenas como: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *A. castellanii* y *Sappinia* spp. Por otro lado también fueron identificadas en 64 muestras la bacteria *Legionella* spp.

Se observó que en 20 de las muestras obtenidas hubo presencia tanto de AVL como de bacterias del género *Legionella* spp., lo cual representa un alto riesgo para la salud de los usuarios de cada uno de los contenedores que fueron analizados.

II. INTRODUCCIÓN

1. Amebas de vida libre

Las amebas son pequeños protozoos que se encuentran distribuidos mundialmente en diferentes tipos de fuentes de agua como: lagunas, lagos, ríos, piscinas, así como en la vegetación, suelo y también formando parte de la fauna natural de algunos mamíferos, peces y reptiles, se sabe también que las temperaturas elevadas favorecen su proliferación y ocupan un lugar muy importante en la cadena alimenticia de las comunidades naturales donde hay agua, alimentándose de bacterias, hongos, algas y otros protozoos más pequeños (Gallegos, 1997; Adl *et al.*, 2005; Peralta, 2009).

A las amebas de vida libre (AVL) se les ha llamado organismos anfitriónicos porque aunque son capaces de vivir como endoparásitos también pueden hacerlo como organismos de vida libre, comportándose de esta manera como organismos oportunistas capaces de producir infecciones a nivel del sistema nervioso central (SNC). Estos organismos también son conocidos como amibas “típicas” y pertenecen a la subclase Gymnamoebia o amebas “desnudas” es decir que carecen de testa ó caparazón (Page, 1976; Gallegos, 1997).

Diversos estudios de las AVL han demostrado que solo un pequeño grupo provoca infecciones humanas, incluyendo a los géneros: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia* y *Sappinia* provocando desde meningoencefalitis fulminante que ocasiona la muerte en lapsos muy cortos o encefalitis granulomatosa crónica que provoca la muerte en periodos mayores, así como también infecciones muy severas en otros órganos como: piel, ojos y oídos, esto último solo en el caso de las acantamebas (Kilvington *et al.*, 1991).

Cuadro 1. Ubicación taxonómica de las principales AVL patógenas (Tomado de Peralta, 2009)

Clasificación taxonómica de las amebas de vida libre patógenas				
Dominio	Eukarya	Eukarya	Eukarya	Eukarya
Reino	Protozoa	Protozoa	Protozoa	Protozoa
Filo	Sarcomastigophora	Sarcomastigophora	Sarcomastigophora	Sarcomastigophora
Clase	Lobosa	Lobosa	Heterolobosa	Lobosa
Orden	Amoebida	Amoebida	Leptomyxa	Eumoebida

Familia	Vahlkampfiidae	Acanthamoebidae	Leptomyxidae	Thecamoebidae
Género	<i>Naegleria</i>	<i>Acanthamoeba</i>	<i>Balamuthia</i>	<i>Sappinia</i>
Especie	<i>N. fowleri</i> Carter, 1970	<i>A. castellanii</i> Douglas, 1930	<i>B. mandrillaris</i> Visvesvara, 1990	<i>S. pedata</i> Dangeard, 1896
	<i>N. australiensis</i> De Jonckheere, 1981	<i>A. polyphaga</i> Puschkarew, 1913		<i>S. diploidea</i> Hartmann y Nägler, 1908
		<i>A. quina</i> Pussard y Pons, 1977		
		<i>A. astronyxis</i> Ray y Hayes, 1954		
		<i>A. culbertsoni</i> Singh y Das, 1970		
		<i>A. hatchetti</i> Sawyer <i>et al.</i> , 1977		
		<i>A. palestinensis</i> Reich, 1933		
		<i>A. rhyodes</i> Singh, 1952		

2. *Naegleria fowleri*

Es un parásito facultativo de distribución cosmopolita que crece favorablemente a elevadas temperaturas que llegan hasta los 42 °C. Se les encuentra en diversos sistemas de agua dulce, en el suelo y otros ambientes artificiales (Smirnov y Thar, 2003).

El ciclo de vida de *Naegleria fowleri* incluye una etapa de alimentación ameboide (trofozoíto), una de natación rápida temporal (flagelado) y un quiste latente, que es una estructura de resistencia donde la ameba se encuentra en estado latente, protegiéndose de condiciones adversas en el ambiente como lo son las bajas temperaturas y la desecación, razón por la cual ésta especie se encuentra rara vez en el suelo (Fig. 1) (Smirnov y Thar, 2003).

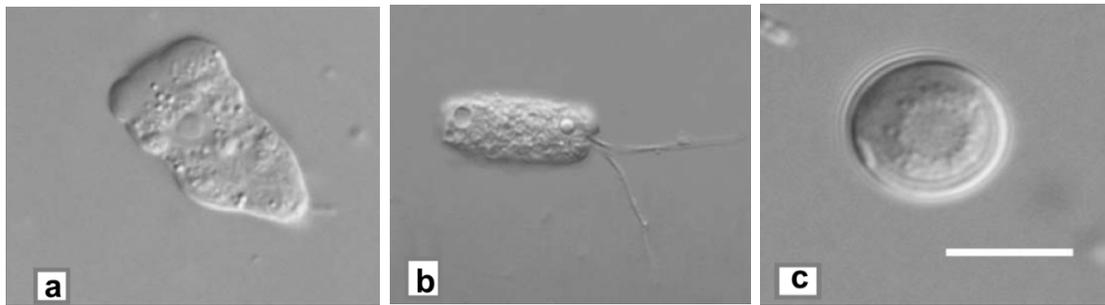


Figura 1. Etapas del ciclo de vida de *Naegleria fowleri*: a) trofozoíto b) flagelado y c) quiste (Road, 2007).

a) Patología

La especie *Naegleria fowleri* es el agente causal de la Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP), infección aguda de evolución rápida y fatal que en la mayoría de los casos se presenta en individuos jóvenes y saludables con historial reciente de natación u otras actividades en aguas cálidas (Vargas *et al.*, 2005); dicha enfermedad invariablemente ocasiona la muerte del enfermo (Smirnov y Thar, 2003).

El periodo de incubación varía de dos días a tres semanas dependiendo del tamaño del inóculo y de la virulencia del organismo invasor. La aspiración de agua o aire que contiene amibas les permite alcanzar el epitelio olfatorio de la mucosa pituitaria y penetrar a la cavidad craneal a través del nervio olfatorio, constituyéndose así la ruta de diseminación de las amibas a otras partes del encéfalo. Dado que la invasión es muy rápida, hay destrucción del tejido nervioso de prácticamente todo el encéfalo (Carter, 1972). Esta enfermedad ha sido reportada en países como: Bélgica, Gran Bretaña, Australia, Estados Unidos, Venezuela, Panamá y México (Loschiavo *et al.*, 1993).

b) Proceso infeccioso

La fase invasiva de *N. fowleri* es el trofozoíto y la infección se adquiere únicamente por la aspiración nasal de aguas contaminadas con dichos parásitos. Los trofozoítos invaden la mucosa nasal, la placa cribosa y los bulbos olfatorios del encéfalo.

Se cree que las formas flageladas o quistes de *N. fowleri* pueden entrar a la nariz de la persona que este en contacto con el agua contaminada, sin embargo estos estadios pueden revertirse rápidamente a trofozoitos para iniciar la invasión. Los flagelados o quistes de *N. fowleri* nunca se encuentran en los tejidos o fluido cerebroespinal del huésped (Fig. 2) (John, 1993).

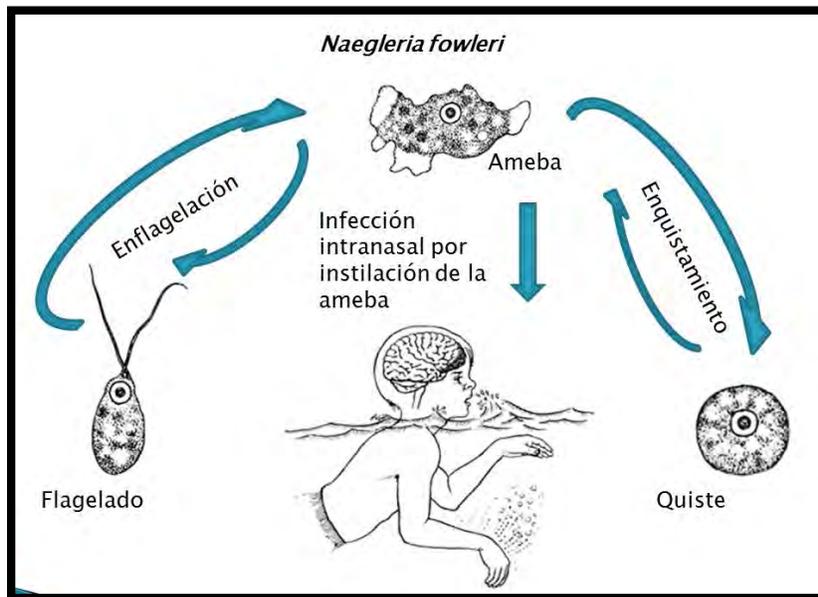


Figura 2. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri* e infección humana (Tomada de John, 1993).

c) Signos y síntomas

De manera súbita los enfermos presentan cefalea frontal bitemporal intensa, fiebre alta que va de 38 a 40 °C, asociada a síntomas respiratorios, vómito, rigidez de nuca, somnolencia, letargia, irritabilidad y tendencia progresiva al coma (Peralta, 2009).

La evolución clínica de la MAP es muy rápida y termina con la instalación de coma y muerte, la cual ocurre de dos a siete días después de la aparición de los primeros síntomas (Lalitha *et al.*, 1985).

d) Diagnóstico

Se puede llegar al diagnóstico mediante métodos de imagen como Tomografía Computarizada (TC), Imagen de Resonancia Magnética (IRM), aunque estos no son específicos; también existen los métodos microscópicos como el diagnóstico *pre-mortem* y aunque es muy raro, la punción lumbar puede ser realizada, ensayos de inmunofluorescencia utilizando anticuerpos policlonales o monoclonales o bien se puede llevar a cabo la realización de métodos de cultivo de tejido cerebral, serología o pruebas de Reacción en Cadena de la Polimerasa, PCR conocido por sus siglas en inglés (Da Rocha *et al.*, 2009).

e) Tratamiento

La supervivencia a la MAP depende del rápido diagnóstico y tratamiento de la enfermedad. La tasa de supervivencia ha mejorado cuando una combinación de anfotericina B aplicada por vía intravenosa y con la administración intratecal de la misma con rifampicina y otros agentes antifúngicos (Singh *et al.*, 1998).

f) Control de *Naegleria fowleri*

El cloro mata todas las etapas del ciclo de vida de *N. fowleri*, se ha visto incluso en aguas recreativas, que 1.5 ppm de cloro libre residual en un tiempo de contacto de 20 minutos es perfecto para eliminar tanto trofozoítos como quistes de esta ameba; sin embargo en algunas zonas, los suministros de cloro no son lo suficientemente adecuadas para eliminar a este organismo, lo que implica tener que aplicar sucesivas cantidades de amoniaco y cloro pues ello es mas eficaz para la eliminación de *N. fowleri* (Singh *et al.*, 1998).

3. *Acanthamoeba* spp.

Es una de las amebas mas frecuentemente aisladas de muestras ambientales. Este organismo se encuentra en todas partes al rededor del mundo, se han aislado del suelo, aguas dulces y salobres, agua embotellada, torres de enfriamiento, centrales eléctricas, de calefacción, ventilación y aire acondicionado, bañeras de hidromasaje, piscinas de hidroterapia, unidades dentales, máquinas de diálisis, en el polvo, en el aire, cultivos de células bacterianas y hongos, lentes de contacto e incluso secreción del oído. Se cultivan a temperaturas que van de los 35 a los 37 °C, pero son capaces de crecer también a elevadas temperaturas que van hasta los 45 °C (Visvesvara *et al.*, 2007).

Acanthamoeba presenta dos fases morfológicas en su ciclo de vida, un trofozoíto y una etapa de quiste que tiene forma más o menos estrellada. Ambas etapas se pueden encontrar en los tejidos de los seres humanos infectados y en el ambiente. El trofozoíto es la fase en la que se divide y se sabe que es la etapa infecciosa. Los quistes son inactivos y protegen al organismo de ambientes nocivos. Los quistes son resistentes a biocidas, cloración y antibióticos (Fig. 3) (Da Rocha *et al.*, 2009).

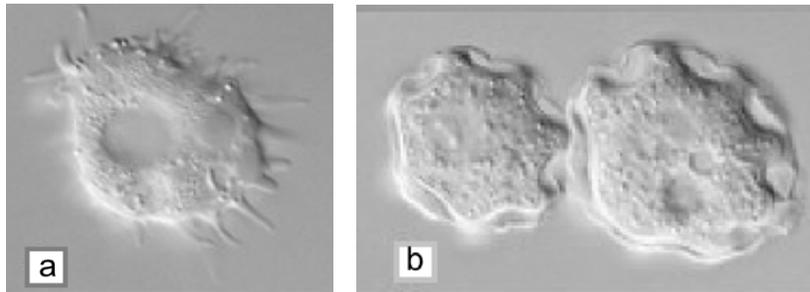


Figura 3. Etapas del ciclo de vida de *Acanthamoeba*: a) trofozoíto b) quiste (Road, 2007).

a) Patología

Varias especies de *Acanthamoeba* pueden causar Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG), Acantamebiosis Cutánea (AC) y Queratitis Amebiana (QA) (Da Rocha *et al.*, 2009).

Se han identificado varias especies de *Acanthamoeba* causantes de (QA) y entre ellas destacamos a: *Acanthamoeba cultbersoni*, *A. castellanii*, *A. hatchetti* y *A. quina*. Estos parásitos son poco virulentos ya que existe inmunidad innata en el huésped y además el epitelio corneal constituye una buena barrera de defensa (Smirnov y Thar, 2003).

La mayor parte de casos confirmados están ligados al uso de lentes de contacto, así la prevalencia del uso de lentes desechables entre los pacientes con queratitis por *Acanthamoeba* es muy elevada. Son susceptibles principalmente personas jóvenes y sanas pues son usuarios frecuentes de estos lentes de contacto. Se presenta dolor ocular severo, ulceración corneal precedida del uso de lentes de contacto o incluso algún trauma. El pronóstico es bueno si se diagnostica pronto y se aplica el tratamiento adecuado (Bottone, 1939).

Por otra parte las lesiones cutáneas causadas por *Acanthamoeba* se han reportado con mayor frecuencia en los pacientes seropositivos al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), presentándose numerosos nódulos eritematosos o úlceras en todo el cuerpo del paciente para luego complicarse en una neumonía o en una EAG (Duarte *et al.*, 2006).

En el caso de la EAG el proceso es crónico ya que necesita de varias semanas o meses de incubación para que la enfermedad se establezca. Cabe destacar que ésta infección se presenta primordialmente en paciente debilitados por otro padecimiento, es decir que se encuentren inmunocomprometidos, por ejemplo,

pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), con diabetes mellitus, falla renal, neumonía, cirrosis, hepatitis, cáncer etc. (Anzil *et al.*, 1991).

b) Proceso infeccioso

Ambas formas del ciclo de vida de *Acanthamoeba* (trofozoito y quiste) pueden encontrarse en los tejidos del huésped humano. Se sabe que su vía preferencial de entrada es a través de una lesión primaria en epitelio (herida); una vez que se establece la lesión, por vía hematogena las amebas alcanzan el SNC. El período de incubación es de varias semanas o meses para que la enfermedad se establezca (Fig. 4) (John, 1993).

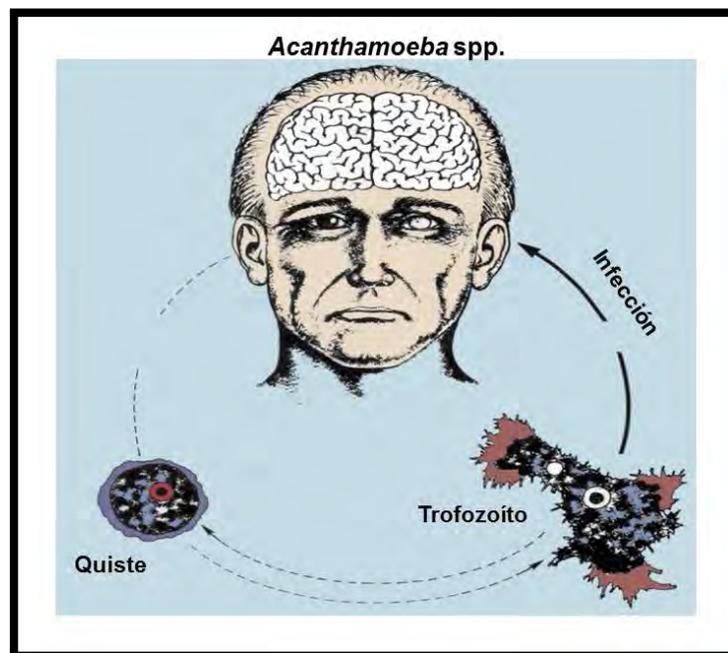


Figura 4. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* e infección humana (John 1993).

c) Signos y síntomas de la QA

Los síntomas iniciales de la queratitis amebiana no son específicos pero incluyen dolor de ojos, fotofobia, enrojecimiento ocular, lagrimeo y por lo general afecta solo uno de ambos ojos. Las últimas etapas de la infección pueden dar lugar a denudación epitelial y necrosis estromal (Wilhelmus *et al.*, 2008).

d) Diagnóstico para la QA.

El diagnóstico de la queratitis amebiana se puede llevar a cabo por métodos microscópicos mediante el análisis de un raspado de córnea. Para la detección de los quistes se han utilizado ensayos de inmunofluorescencia, métodos de

cultivos mediante biopsia o raspados de la córnea y mediante la técnica de PCR (Schuster *et al.*, 2003).

e) Tratamiento para la QA

El tratamiento de la queratitis por *Acanthamoeba* ha tenido bastante éxito, se han utilizado una gran variedad de fármacos incluyendo la clorhexidina, la propamidina, isetionato, neomicina, polimixina B, clotrimazol, ketoconazol, miconazol e itraconazol (Schuster y Visvesvara, 2004).

f) Signos y síntomas de la EAG

Los síntomas incluyen dolor de cabeza, fiebre, convulsiones, hemiparesia, cambios de personalidad, náusea, rigidez en el cuello, disminución del nivel de conciencia y coma. Los signos clínicos de la EAG no son específicos por lo que muchas veces el diagnóstico se confunde con otras patologías como: meningitis, tuberculosis, encefalitis viral, toxoplasmosis, infecciones por hongos o neurocisticercosis (Cabral *et al.*, 2003).

g) Diagnóstico para EAG

Se han utilizado métodos de imágenes cerebrales tales como la TC, la IRM, biopsia, microscopia de inmunofluorescencia e inmunohistoquímica, métodos de cultivo, serología, y la técnica de PCR (Martínez, 1993).

h) Tratamiento para la EAG

El tratamiento para la EAG representa un problema debido a la poca claridad de los síntomas, la falta de una prueba fiable y el hecho de que el diagnóstico se hace a menudo *post-mortem*, sin embargo, varios pacientes con EAG causada por *Acanthamoeba* spp, así como algunos de ellos con infección cutánea sin afectación del SNC, han sido tratados exitosamente con una combinación de isetionato de pentamidina, sulfadiazina, flucitosina y fluconazol y las aplicaciones tópicas de gluconato de clorhexidina y ketoconazol en crema. En muchos de los casos registrados, el tratamiento tuvo que ser interrumpido debido a efectos secundarios no deseados (Schuster y Visvesvara, 2004).

i) Control de *Acanthamoeba* spp.

Debido a que la EAG causada por *Acanthamoeba* spp ocurre en huéspedes con las funciones inmunodebilitadas, no hay métodos de control claramente establecidos. En el caso de la QA causada por la misma ameba se recomienda tener mucho cuidado higiénico con los lentes de contacto y con la solución

desinfectante de los mismos, por otra parte los usuarios de estos lentes no deben usarlos durante la natación, realización de algún deporte acuático o mientras se encuentre en alguna bañera de hidromasaje o jacuzzi (Schuster y Visvesvara, 2004).

4. *Balamuthia mandrillaris*

En el año de 1986, se encontró una ameba morfológicamente diferente a *Acanthamoeba*, fue aislada del cerebro de una mujer embarazada, esta ameba también produce quistes en el cerebro y fue descrita inicialmente como una ameba leptomyxa (incluida dentro de la familia Leptomyxidae debido a la semejanza que tiene con el suelo), pero en 1993 fue reconocida como un organismo diferente y fue asignado como un nuevo género y especie, es decir *Balamuthia mandrillaris* (Visvesvara *et al.*, 1993).

La ameba se encuentra en el suelo, pero se ha sugerido su presencia en el agua sobre la base de casos de EAG provocada por *Balamuthia* que se produce en animales, incluyendo seres humanos que tenían un historial de haber nadado en aguas estancadas (Schuster *et al.*, 2003).

A diferencia de *Acanthamoeba*, *Balamuthia* no puede ser cultivada en placas de agar cubiertas con bacteria y aunque *B. mandrillaris* ha sido aislada recientemente del ambiente su fuente de alimento en la naturaleza no es clara. Cultivada *in vitro*, *Balamuthia* se puede alimentar de pequeñas amebas y su aislamiento es generalmente de tejido de humanos y animales, el cultivo se lleva a cabo utilizando células de mamíferos como la de riñón de mono, por su parte los aislados de suelo son mucho mas complicados para llevar a cabo (Schuster *et al.*, 2003).

La temperatura óptima de crecimiento para *Balamuthia* es de 37 °C y al igual que *Acanthamoeba*, solo tiene dos etapas en su ciclo de vida, trofozoíto y quiste, el trofozoíto generalmente es irregular, pleomórfico y muy pocas formas son limax; las formas tróficas van de los 12-60 µm. Los quistes tienen forma más o menos esférica u oval que va de los 6-30 µm (Fig. 5) (Visvesvara *et al.*, 2007).

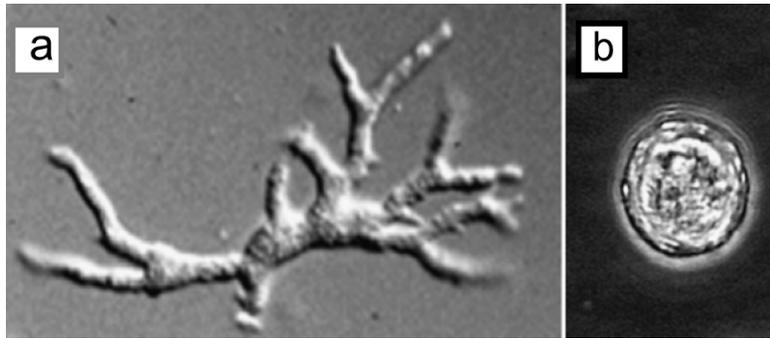


Figura 5. Etapas del ciclo de vida de *Balamuthia mandrillaris*:
a) trofozoíto b) quiste (Visvesvara *et al.*, 2007).

a) Patología

Hasta la fecha *B. mandrillaris* es la única especie conocida perteneciente al género *Balamuthia* que causa EAG tanto en humanos como en otros animales. La balamutiosis es similar a la EAG causada por *Acanthamoeba* y se presenta en huéspedes inmunocomprometidos, incluyendo a pacientes infectados por el VIH /SIDA y los usuarios de drogas intravenosas. La enfermedad tiene una base crónica que se desarrolla durante un periodo de tiempo que va desde dos semanas a dos años. Se sabe que *Balamuthia* también puede causar infección en la piel similar a la provocada por *Acanthamoeba*, ambos daños pueden ocurrir en cualquier época de año y por lo tanto no tiene relación con los cambios estacionales (Visvesvara y Maguire, 2006). Las infecciones pueden ocurrir tanto en niños como en adultos (Schuster y Visvesvara, 2008).

b) Proceso infeccioso

El periodo de incubación de la EAG por *Balamuthia* se extiende por varias semanas y por lo tanto el origen y el modo de infección no han sido determinados definitivamente, se ha sugerido que la puerta de entrada puede ser a través de lesiones cutáneas, nasales o la inhalación a través de las vías respiratorias con la consiguiente diseminación hematológica al cerebro y otros órganos (Fig. 6) (Schuster y Visvesvara, 2008).

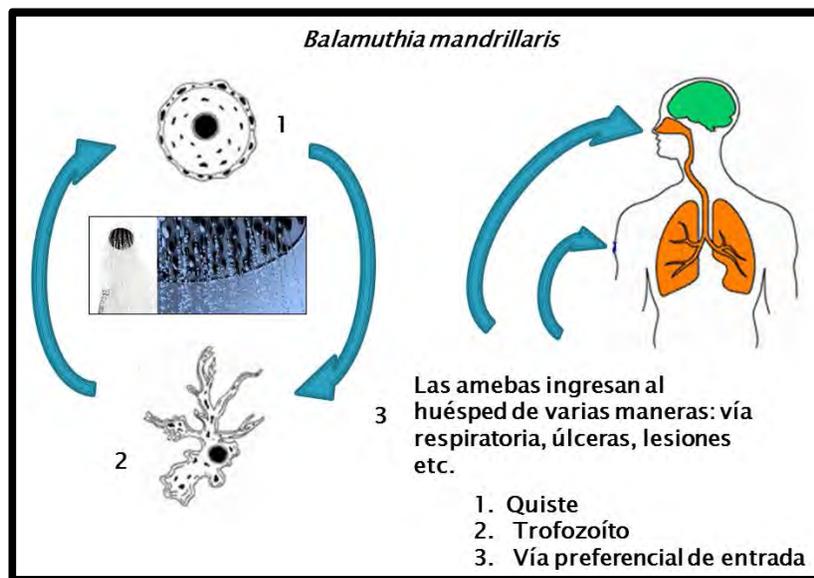


Figura 6. Ciclo de vida de *Balamuthia mandrillaris* e infección humana (Tomado del CDC, 2012)

c) Signos y síntomas

La EAG provocada por *B. mandrillaris* también es una enfermedad rara con síntomas inespecíficos, pero se habla de dolores de cabeza, náusea, vómitos, fiebre, mialgia, convulsiones, pérdida de peso y dificultades de habla, generalmente asociada con anteriores lesiones en la piel. Es difícil llegar al diagnóstico adecuado ya que los síntomas son similares a otras infecciones como la tuberculosis, toxoplasmosis, cisticercosis, meningitis y también a los tumores cerebrales (Reed *et al.*, 1997).

d) Diagnóstico

Para realizar el diagnóstico correcto para EAG por *B. mandrillaris* se pueden utilizar los métodos de imagen como la TC y la IRM. También sirve la microscopía de luz para detectar la presencia de la ameba en el tejido del huésped.

Las amebas se pueden observar desde el cerebro por medio de biopsias de piel y autopsias. A diferencia de la infección por *N. fowleri*, *B. mandrillaris* generalmente no es vista en el líquido cefalorraquídeo. Se pueden realizar métodos de cultivo muy específicos de muestras de biopsia, serología y técnica de PCR (Griesemer *et al.*, 1994).

e) Tratamiento

Tres pacientes de E.U.A, un hombre de 60 años de edad, una niña de seis y una mujer de 70 que presentaban balamutiosis sobrevivieron después de un tratamiento con una combinación de isetionato de pentamidina, sulfadiazina, claritromicina, fluconazol y flucitosina. En el caso de unos peruanos, pacientes con lesiones cutáneas, se recuperaron con un tratamiento con albendazol e itraconazol (Deetz *et al.*, 2003).

f) Control de *Balamuthia mandrillaris*

Los casos de balamutiosis han ocurrido en personas inmunocromprometidas por lo que actualmente no existen métodos claramente definidos para la prevención de estas amebas (Visvesvara *et al.*, 2007).

5. *Sappinia pedata*.

Existe solo una especie patógena de *Sappinia*: *S. pedata* antes conocida como *S. diploidea*. Esta ameba tiene una distribución mundial y se le ha aislado de las heces de los alces y los búfalos, del suelo contaminado con heces de bovinos, de agua dulce y el recto de un lagarto. El ciclo de vida de *Sappinia* consta de dos etapas, un trofozoíto y un quiste (Turner *et al.*, 2005).

Un rasgo distintivo del organismo, es un probable proceso sexual en el quiste y la presencia de dos núcleos fuertemente adosados entre si (a menudo de dos a cuatro pares), ésta es una característica única del género (Schuster y Visvesvara 2004). *Sappinia* spp. no se extiende bien cuando es posada sobre una superficie de vidrio, se observa de una mejor manera al ser vista sobre la superficie del agar (Fig.7)(Page,1988).

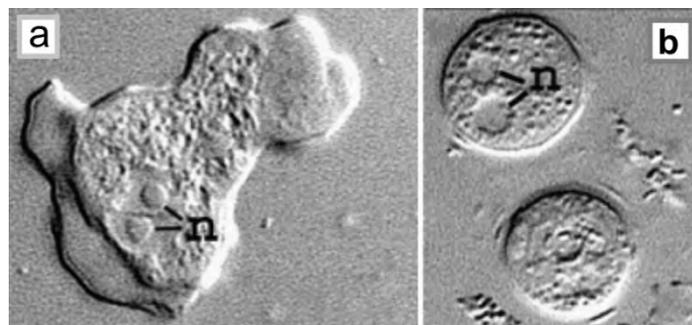


Figura. 7 Etapas del ciclo de vida de *Sappinia pedata* :
a) trofozoíto b) quiste n) núcleos. (Visvesvara *et al.*, 2007).

a) Patología

La ameba del género *Sappinia*, pertenece al grupo de las AVL patógenas que afectan a nivel del SNC y que fueron descubiertas recientemente en el ser humano, dichas amebas pueden causar Encefalitis Amebiana (EA) (Gelman *et al.*, 2003). El primer y único caso de encefalitis causado por *Sappinia* spp. se presentó en un hombre adulto inmunológicamente sano que sobrevivió a la infección (Da Rocha *et al.*, 2009).

b) Proceso infeccioso

El periodo de incubación y la vía de infección es desconocida pero se cree que es por la inhalación del parásito a través de la nasofaringe y diseminación hematogena al cerebro (Gelman *et al.*, 2001).

c) Signos y síntomas

El paciente perdió la conciencia durante unos 45 minutos y desarrolló náusea y vómito seguidos de cefalea bifrontal, fotofobia y visión borrosa durante dos o tres días. La resonancia magnética (RM) reveló una sola lesión ocupante de espacio que fue extirpada quirúrgicamente. La masa extirpada en corte mostró una inflamación necrozante hemorrágica que contenía organismos amebianos (Gelman *et al.*, 2001).

d) Diagnóstico

Como se menciona anteriormente, se puede distinguir a *Sappinia* spp. por la presencia de dos núcleos muy evidentes, por lo que una forma de llegar al diagnóstico es observar a estas amebas derivadas de una biopsia de tejido fija en parafina (Gelman *et al.*, 2003). Se puede diagnosticar también por medio de técnicas moleculares como PCR (Qvarnstrom *et al.*, 2009).

e) Tratamiento

Después de la cirugía del paciente que presentó Encefalitis Amebiana por *Sappinia* se aplicó un tratamiento con azitromicina, isetionato de pentamidina, itraconazol y flucitosina lo que llevó a una recuperación completa sin secuelas neurológicas (Schuster y Visvesvara, 2004).

f) Control

En el caso de éste género amebiano, no hay especificaciones en cuanto a los métodos de control, sin embargo, algunos autores sugieren que los medios

anteriormente mencionados para el control tanto de *Acanthamoeba* como de *Naegleria* pueden ser eficaces también para la eliminación de *Sappinia*.

Las infecciones provocadas por los protozoos de vida libre vistos anteriormente, se diferencia de otros porque se encuentran distribuidos ampliamente en la biosfera, son muy virulentos, pasan inadvertidos por errar en su diagnóstico médico y por lo tanto no hay un tratamiento oportuno (Peralta, 2009). Se sabe también que las AVL presentan una amenaza adicional para la salud humana ya que pueden actuar como vehículos de multiplicación y dispersión de bacterias parásitas facultativas incluyendo patógenos y otros microorganismos como: proteobacterias, bacterias asociadas a plantas de la familia Bradyrhizobiaceae, otra familia de bacterias como Parachlamydiaceae, pseudomonas, micobacterias, mimivirus, enterovirus, enterobacterias etc. Una de las asociaciones más estudiadas de este tipo es la que existe entre AVL y bacterias del género *Legionella* (Stout, 1997).

6. Bacterias del género *Legionella* spp.

Legionella spp. es una bacteria ambiental y su hábitat natural es el agua dulce proveniente de lagos y ríos. A través de las redes de agua potable, accede a equipos tales como: torres de refrigeración, sistemas centralizados de agua caliente (regaderas), equipos de aerosolterapia y sistemas de agua climatizada entre otros. A partir de estas instalaciones, *Legionella* puede infectar al hombre por inhalación de micro-aerosoles contaminados con la bacteria (Murdoch, 2003).

7. Taxonomía de *Legionella*:

Dominio: Prokaryota Chatton, 1925.

Reino: Eubacteria Woese, 1990.

Filo: Proteobacteria Garrity *et al.*, 2005.

Clase: Legionellaceae

Orden: Legionellales Garrity *et al.*, 2005.

Familia: Legionellaceae Bronner *et al.*, 1979

Genero: *Legionella* Bronner *et al.*, 1979

Actualmente existen 48 especies del género *Legionella*, dentro de las cuales se encuentra *L. pneumophila* como una de las especies mas virulentas y causante del 79 % de casos declarados de legionelosis o enfermedad del legionario y Fiebre de Pontiac (FP) (Barry *et al.*, 2002).

Legionella pneumophila se multiplica a temperaturas elevadas que están entre los 25 y 42 °C. Se han observado mayor número de casos de legionelosis en

donde el hombre acude a nadar en ambientes acuáticos donde la temperatura del agua es superior a la temperatura ambiente, térmicamente la alteración de estos ambientes acuáticos puede cambiar el equilibrio entre protozoos y bacterias, lo que resulta en la multiplicación rápida de *Legionella*, lo cual puede traducirse posteriormente en enfermedades humanas (Barry *et al.*, 2002).

Estudios ecológicos han demostrado que los protozoos proporcionan hábitats ideales para la supervivencia de las especies de *Legionella* y aunque no está claro que especies de protozoos están contribuyendo al mantenimiento y la propagación de estos patógenos se sabe que los géneros: *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Hartmanella* utilizan a *Legionella* como fuente de alimentación (Ronald, 1999). Investigaciones sugieren que las AVL son huéspedes naturales de *Legionella* spp, y que no sólo funcionan como reservorios ambientales sino que también participan en la protección y el mantenimiento de *Legionella* spp. actuando como mini incubadoras ya que se ha observado que dicha bacteria se puede multiplicar dentro de la amebas (Lau, 2009).

8. Especies de *Legionella* de importancia médica

Cuadro 2. Especies de *Legiogella* de importancia médica (Jawetz *et al.*, 1990)

Especie	Neumonía	Fiebre de Pontiac (FP)
<i>L. pneumophila</i>	+	Serogrupos 1 y 6
<i>L. micdadei</i>	+	-
<i>L. gormanii</i>	+	-
<i>L. dumoffii</i>	+	-
<i>L. bozemanii</i>	+	-
<i>L. longbeachae</i>	+	-
<i>L. wadsworthii</i>	+	-
<i>L. jordanis</i>	+	-
<i>L. feeleii</i>	+	+
<i>L. oakridgensis</i>	+	-

(+) Especies que causan tanto neumonía como FP.

(-) Especies que no se ha reportado que causen FP.

9. Patología causada por bacterias del género *Legionella*

La legionelosis es un término general usado para describir todas las formas de infección causadas por una bacteria del género *Legionella*, tal es el caso de *Legionella pneumophila* que es la especie mas común y mas virulenta del género (Gaia *et al.*, 2003). La legionelosis es una enfermedad respiratoria aguda y tiene dos formas clínicamente distintas, la enfermedad del “Legionario” que es un tipo severo de infección que incluye la neumonía y la FP, una enfermedad auto-limitante mucho menos agresiva. La exposición se atribuye a la inhalación

de aerosoles procedentes de sistemas de aire, piscinas, regaderas etc. (Murdoch, 2003).

Aunque las personas previamente sanas pueden desarrollar la enfermedad del legionario, las personas que se encuentran particularmente en riesgo son aquellas que fuman, beben en exceso, las personas con cáncer, diabetes, enfermedades respiratorias, renales e inmunosuprimidos, lo que en contraste con la FP que, aunque es mucho menos común que la enfermedad del legionario ésta puede atacar incluso a personas jóvenes y que gozan de completa salud (Calvo, 2005).

a) Proceso infeccioso

Para causar la infección, la bacteria necesita ser inhalada. Las partículas por las cuales *Legionella* va a ser inhalada deben ser lo suficientemente pequeñas como para penetrar y mantenerse en la parte mas profunda de los pulmones (los alveolos), pero lo suficientemente grande como para contener al menos una célula bacteriana, las partículas de 1.3 μm satisfacen estos criterios, éstas son demasiado pequeñas como para ser vistas por los ojos del humano y pueden permanecer suspendidas en el aire por periodos de tiempo prolongados. A la suspensión de estas partículas en el aire se les denomina aerosoles y no necesariamente pueden ser visibles (Calvo, 2005).

Los aerosoles naturales pueden ser generados por las lluvias, cascadas, burbujas de agua o por formación de olas. En sistemas de agua artificiales o entornos pueden ser los grifos funcionando, duchas, fuentes, piscinas de hidromasaje, bañeras y torres de enfriamiento evaporativo quienes generan estos aerosoles (Fig. 8) (Moreira et al., 2006).

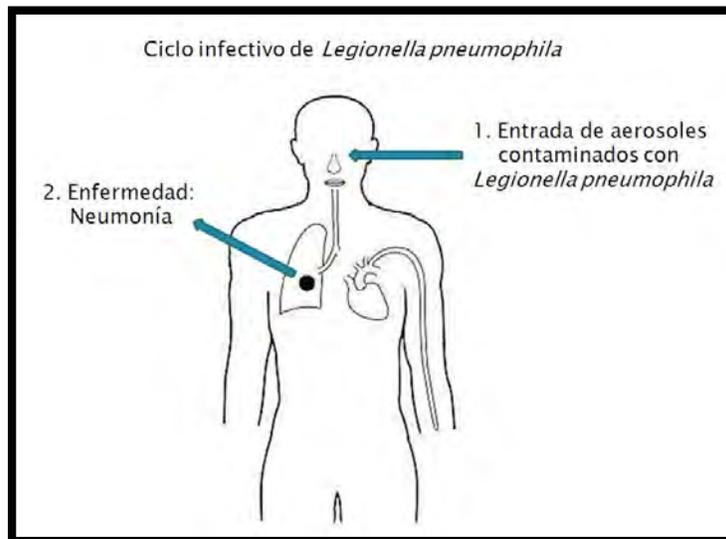


Figura 8. Ciclo infeccioso de *Legionella pneumophila* en el humano (Glockner, 2008).

b) Ciclo intracelular de *Legionella pneumophila* en protozoos y macrófagos humanos

Se sabe que los mecanismos de virulencia de *L. pneumophila* son demasiado complejos, pues presenta diversas proteínas inducidas durante su replicación intracelular. La infestación de *L. pneumophila* en las células fagocíticas se divide en las siguientes etapas (Moreira et al., 2006) (Fig.9):

- a. Adhesión del microorganismo a los receptores superficiales de las células.
- b. Endocitosis, en donde el microorganismo penetra los macrófagos o las amebas.
- c. Fusión con el retículo endoplásmico.
- d. Formación de una vacuola replicativa.
- e. Multiplicación intracelular.
- f. Se liberan las bacterias y la célula huésped muere.

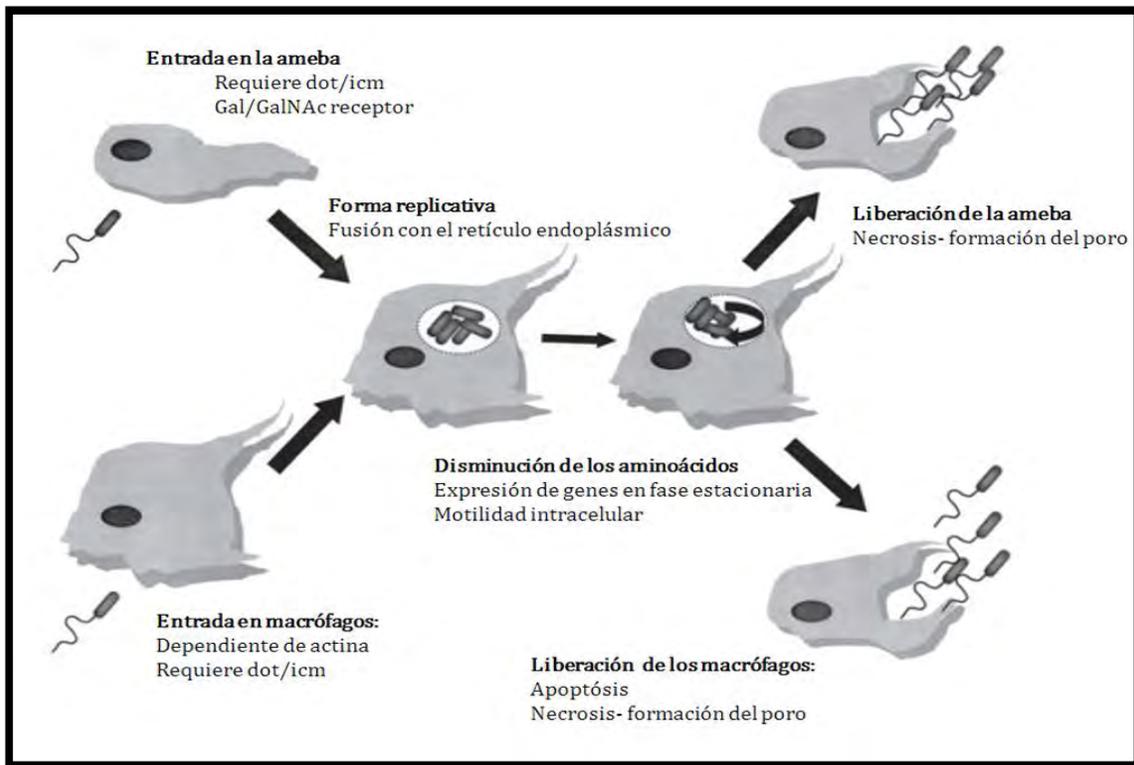


Figura 9. Ciclo de vida de *L. pneumophila* en protozoos y macrófagos humanos (Tomada de Fields *et al.*, 2002).

c) Signos y síntomas

Los signos y síntomas comienzan abruptamente con la fiebre alta, escalofríos, dolor de cabeza y de músculos. Las personas infectadas sufren de dificultades para respirar y algunos también desarrollan síntomas gastrointestinales como náusea, vómito, dolor abdominal y diarrea.

Es bien sabido que la enfermedad presenta un amplio espectro de enfermedades que van desde una tos leve, fiebre, insuficiencia respiratoria y una falla multiorgánica (Calvo, 2005).

d) Diagnóstico

El diagnóstico de las infecciones humanas causadas por *Legionella* puede realizarse por los métodos microbiológicos siguientes (Stout y Yu 1997):

- a) Cultivo de la bacteria a partir de muestras respiratorias (esputo, muestras obtenidas mediante broncoscopia o tejido pulmonar) utilizando los medios de cultivo adecuados, BCYE y BMPA.

- b) Serología mediante inmunofluorescencia indirecta, demostrando la presencia de anticuerpos específicos en el suero del enfermo tras la infección por la bacteria.
- c) Visualización del microorganismo en líquidos o tejidos patológicos mediante inmunofluorescencia directa.
- d) Uso de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

e) Tratamiento

El inicio temprano del tratamiento adecuado es reconocido hoy como crucial para el éxito en la recuperación de la enfermedad del legionario. La eritromicina ha sido considerada históricamente como la primera opción en el tratamiento de la enfermedad del legionario (Stout y Yu, 1997). El tratamiento con este antibiótico, sin embargo, está asociada con varios efectos secundarios adversos, incluyendo la pérdida transitoria de la audición, flebitis, intolerancia gastrointestinal y más raramente arritmia ventricular (Roig *et al.*, 1993).

Nuevos macrólidos, como la azitromicina y claritromicina son atractivas porque han mostrado una actividad superior frente a especies de *Legionella* y una mayor penetración intracelular con potencialmente menos efectos adversos (Klein y Cunha, 1998). Incluso con el desarrollo de formulaciones intravenosas por ejemplo la azitromicina se puede remplazar con la eritromicina como tratamiento de elección (Stout y Yu, 1997).

Para el tratamiento de la enfermedad del legionario, la vía preferida de administración de cualquier antibiótico es por vía intravenosa al menos en las primeras etapas de la enfermedad, esta ruta asegura la mayor concentración posible de los antibióticos en el tejido pulmonar (Stout y Yu, 1997).

f) Control

Existen varios métodos de control disponibles para la desinfección de los sistemas de distribución de agua que podrían estar contaminados con bacterias del género *Legionella* spp. Estos incluyen: hipercloración, ionización cobre-plata, la luz ultravioleta, la esterilización, ozonización y los sistemas de calefacción de vapor instantáneas. El uso de cloro, la esterilización ultravioleta, y la ozonización se examinaron desde 1985, sin embargo, estudios recientes se han visto en la necesidad de proporcionar información actualizada al respecto, debido a que se cree que los métodos tradicionales podrían ser aun insuficientes (Yu *et al.*, 1993).

10. El papel de las biopelículas en los ambientes acuáticos

En el medio acuoso crecen bacterias, ya sea como organismos planctónicos o componentes de la matriz de una biopelícula. Los organismos planctónicos se encuentran libremente dispersos en la fase acuosa mientras que los organismos de la biopelícula se unen a una superficie rodeada por sustancias poliméricas (Marshall, 1996). En la naturaleza las biopelículas no son homogéneas pues consisten en un consorcio de microorganismos que pueden exhibir diferentes propiedades fisiológicas y metabólicas en respuesta a diversos gradientes físicos y de nutrientes que existen dentro de la matriz de exopolisacáridos; como resultado se producen varios nichos que pueden permitir la coexistencia de diferentes microorganismos con los requisitos de crecimiento (Lee y West, 1991).

Las biopelículas juegan un papel muy importante en el crecimiento y supervivencia de muchos microorganismos patógenos en el ambiente, lo cuál tiene implicaciones tanto en salud pública como en cuestiones económicas (Characklis y Marshall, 1990).

Una amplia gama de microorganismos se han asociado con la formación de biopelículas, dentro de los cuáles destacan una gran diversidad de AVL y bacterias del género *Legionella* al actuar como un importante reservorio. Se ha demostrado incluso que *Legionella* presenta una mayor resistencia a los controles microbianos incluidos los biocidas, cloro y la ionización de cobre y plata al establecerse en estas biopelículas (Marrao, 1993).

11. Asociación con otros microorganismos

Años atrás se pensaba que *Legionella* spp. sólo podía existir en medios artificiales y si era cultivada en condiciones muy específicas, bajo determinada temperatura, pH y los requerimientos nutricionales adecuados, sin embargo se ha demostrado que muchas de las especies de *Legionella* spp. sobreviven en una amplia gama de condiciones extremas, tanto en hábitats acuáticos naturales como artificiales. Su supervivencia se ve reforzada por relaciones simbióticas con otros microorganismos como protozoos, algas y otras bacterias, lo que les proporciona ventajas en el medio natural, así como en el agua potable y sistemas de distribución de agua doméstica (Mietzner *et al.*, 1997).

Se sabe que muchas especies del género, infectan a las AVL para poder multiplicarse, dicha bacteria se ha encontrado en por lo menos 13 especies de amebas, dentro de los cuales se mencionan los géneros: *Acanthamoeba*, *Hartmanella*, *Vahlkampfia* y *Naegleria* (Fig. 10) (Fields, 1996).

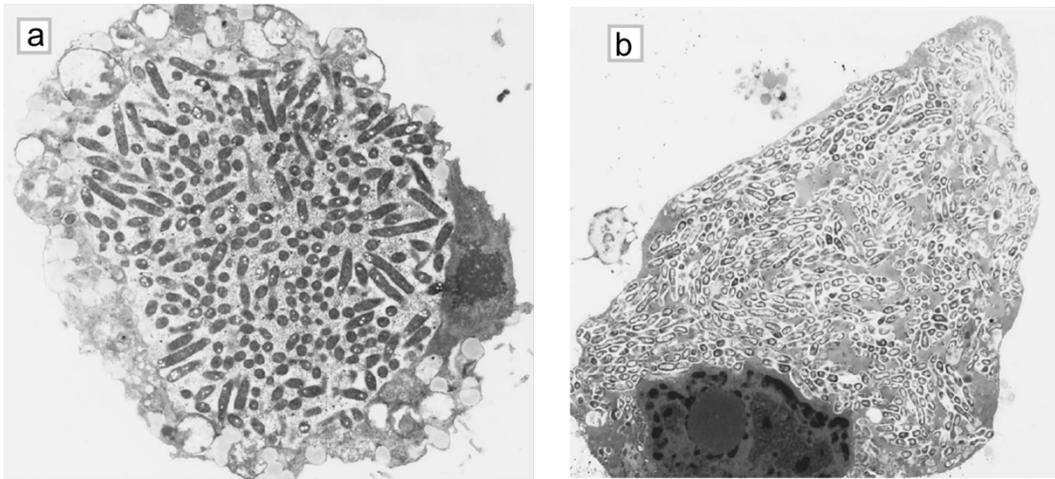


Figura 10. Micrográficas de transmisión de electrones del trofozoíto de *Hartmanella vermiformis* (a) y células del epitelio alveolar de humano (b) infectados con *L. pneumophila* (Abu *et al.*, 1998).

Después de que las bacterias son fagocitadas por las amebas, la multiplicación se lleva a cabo dentro de sus vesículas y permanecen encapsuladas en los quistes hasta la ruptura de la ameba (Miuetzner *et al.*, 1997). Debido a que *Legionella* spp. se replica rápidamente intracelularmente durante períodos prolongados de tiempo, las vesículas amebianas pueden contener cientos de células de la bacteria a la vez (Berk *et al.*, 1998); Incluso, la replicación dentro de los protozoos puede contribuir a una mayor virulencia de *Legionella* (Kramer y Ford, 1994).

III. ANTECEDENTES

Madrigal y cols. en 1986 realizaron un proyecto de investigación titulado “Aislamiento, identificación y patogenia de amebas de vida libre en aguas de consumo de Madrid”; en donde muestrearon 43 sistemas de agua caliente y termos eléctricos unifamiliares obteniendo un 14 % de positividad, identificándose las especies: *Hartmanella vermiformis*, *Vannella simplex*, *Vanella mira* y *Acanthamoeba* spp.

En 1992 Sanden y cols. llevaron a cabo un trabajo en donde muestrearon duchas y grifos de lavabo incluyendo muestras con hisopos de tres hospitales y una comunidad rural. Obteniendo 207 sistemas muestreados, de los cuales 62 muestras dieron positivas para la presencia de bacterias del género *Legionella* spp. y 144 muestras positivas con crecimiento amebiano, observándose así 28 muestras positivas para ambos organismos. El grupo de investigadores concluyó que aunque el número de aislados con presencia tanto de bacterias del género *Legionella* como de AVL fueron pocos, se observó que los aislados con dicha bacteria tenían una multiplicación mucho mas rápida cuando había presencia de AVL en contraste de aquellas en donde no.

Por su parte Borella y cols. en 2004 publicaron un artículo que lleva por titulo “*Legionella*, riesgo de infección del agua caliente sanitaria”. El equipo de trabajo muestreó un total de 146 muestras de agua, recolectadas de viviendas particulares de seis ciudades italianas (Milán, Módena, Bolonia, Roma, Nápoles y Bari), obteniendo 33 (22.6 %) muestras contaminadas con *Legionella* spp. y *L. pneumophila* que fue la especie con mayor frecuencia. Las observaciones de los autores sugieren que se deben considerar las especies de *Legionella* al examinar la contaminación ambiental, pues se tiene entendido que la contaminación del ambiente con dicho patógeno es un factor de riesgo al propagarse en los sistemas de distribución de agua potable, y con base en este aspecto seleccionar los métodos de prevención y control mas apropiados para prevenir las enfermedades contraídas por esta importante bacteria.

Leoni y cols. en 2004, llevaron a cabo una investigación en donde analizaron 137 muestras de agua potable caliente, tomada de diversos puntos en la ciudad de Bolonia (Italia), con el fin de encontrar colonización de especies bacterianas del género *Legionella* : 59 muestras provenían de departamentos privados, 46 de diferentes hoteles y 32 de distintos hospitales públicos. El equipo llevó a cabo técnicas morfológicas para la identificación de las especies bacterianas en cuestión. Ellos concluyeron que la presencia de *Legionella* se detectó con alta frecuencia y en altos niveles de distribución en la red de agua caliente en Bolonia, pues el 40 % de los sistemas examinados fueron positivos para *Legionella* spp. La mayor colonización se encontró en el agua proveniente de los hospitales.

Kuiper y cols. en 2004 realizaron una investigación que titularon: “Proliferación intracelular de *Legionella pneumophila* en *Hartmannella vermiformis* presentes en biopelículas acuáticas de diferentes sistemas de tuberías en los Países Bajos”. Los investigadores muestrearon algunos grifos de diferente procedencia de donde se obtuvieron aislados tanto de *L. pneumophila* como de *H. vermiformis*, ambos organismos fueron identificados por técnicas morfológicas y moleculares (PCR); concluyendo así que *L. pneumophila* se multiplica mucho más rápidamente en los trofozoítos de *H. vermiformis*, que encontrándose ya sea en los quistes de dicho protozoo o multiplicándose extracelularmente.

En otro trabajo, Edagawa y cols. en 2008, estudiaron también diferentes muestras obtenidas de varios sistemas de agua caliente, provenientes de diversos edificios públicos en Japón como: hoteles, escuelas y oficinas de trabajo, con el fin de aislar bacterias del género *Legionella*. Obtuvieron 130 muestras, de las cuales 26 mostraron la presencia de *Legionella* spp., tres de ellas fueron positivas por el método de cultivo, 22 por la técnica de PCR y una por ambas técnicas. El mayor número de muestras positivas se encontró en los sistemas de agua caliente muestreados en los hoteles.

Garaycochea y cols. en 2008, demostraron la patogenicidad de las AVL aisladas de diferentes fuentes de agua procedentes de: ríos, lagos, piscinas y pozos, que eran empleadas por los habitantes del lugar en actividades agrícolas, recreativas y medicinales así como también para consumo o aseo personal, en algunas comunidades de Lima. Las investigadoras obtuvieron 83 muestras, de las cuales obtuvieron 40 aislados amebianos, identificando a los géneros: *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Mayorella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Saccamoeba*, con predominancia de *Acanthamoeba* entre los aislados obtenidos.

En 2009 Bing-Mu y cols. muestrearon diferentes sistemas de agua como: regaderas, piscinas y jacuzzis, provenientes de un centro recreativo en Taiwán con el objetivo de estudiar dos tipos de patógenos: bacterias del género *Legionella* y AVL. El equipo obtuvo 34 muestras en total que posteriormente fueron analizadas por métodos morfológicos. Del total de muestras solo tres fueron positivas para AVL del género *Acanthamoeba*, 12 para el género *Hartmannella*, y cinco del género *Naegleria*. Por su parte, la bacteria *Legionella* fue aislada en 16 de las 34 muestras obtenidas. En cuanto a la presencia de ambos organismos, ésta se pudo observar en 11 de las muestras analizadas, observándose una asociación de *Legionella* con: *N. australiensis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *H. vermiformis* siendo con esta última la asociación más frecuente.

IV. JUSTIFICACIÓN

Debido a la información que existe sobre las AVL y la posible amenaza que representan al actuar como vehículo de multiplicación y dispersión de bacterias parásitas facultativas como *Legionella pneumophila*, ambos, organismos altamente patógenos en cuanto a infecciones humanas se refiere, el incremento de dichas patologías en los últimos años, aunque no específicamente en el caso de México, ya que en el país no existen normas oficiales para el análisis, determinación ni eliminación de las AVL ni de bacterias del género *Legionella* de los diferentes sistemas de agua de contacto humano, lo que hace suponer que debido a la falta de conocimiento sobre el comportamiento de ambos organismos, ha provocado errores al dar un diagnóstico médico, pues resulta de difícil explicación como es que a pesar de que estos parásitos pueden estar habitando en muchos de nuestros sistemas de distribución de agua, el número de casos de encefalitis por ejemplo se atribuye a otro tipo de parásito.

No obstante, también es de suma importancia entender que la contaminación y prevalencia de las AVL y de bacterias del género *Legionella* en los sistemas de agua potable en edificios públicos, como hoteles y hospitales así como también departamentos y casas, representa un relevante factor de riesgo para adquirir cualquiera de las infecciones causadas por dichos microorganismos.

Es así que, ante la inquietud generada por la información de ambos organismos en cuestión y debido a todo lo mencionado anteriormente, se subraya la necesidad de seguir investigando para comprender el vínculo que existe entre las AVL y la bacteria *Legionella* spp., para que de esta manera se pueda contribuir a la prevención y control de brotes provocados por dichos patógenos.

V. OBJETIVOS

1.- Objetivo general

Determinar la presencia de especies amebianas de vida libre patógenas así como la de la bacteria *Legionella* spp. en diversos sistemas hídricos de contacto humano en México.

2.- Objetivos particulares

- Aislar y cultivar amebas de vida libre y bacterias del género *Legionella*. de diferentes sistemas de agua potable doméstica y de algunos servicios de autolavado.
- Determinar los parámetros fisicoquímicos del agua (pH, conductividad y temperatura) que influyen en la presencia de AVL patógenas y de *Legionella* spp. en fuentes de agua de contacto directo.
- Ubicar taxonómicamente las amebas aisladas por criterios morfológicos, utilizando claves especializadas de identificación.
- Establecer la temperatura máxima y óptima (tolerancia a la temperatura) ideal para la supervivencia de las amebas de vida libre.
- Identificar morfológicamente las colonias de bacterias del género *Legionella*.
- Identificar la diversidad de AVL y la co-existencia de bacterias del género *Legionella* spp. en sistemas de agua de contacto humano.
- Determinar el riesgo potencial de infección por AVL patógenas y de *Legionella* spp. en los usuarios del agua en estudio.

VI. ÁREA DE ESTUDIO

Los muestreos se llevaron a cabo en diversas casas y negocios de diferentes zonas del Distrito Federal y Área Metropolitana de la Ciudad de México.

El muestreo se llevó a cabo solo entre algunas colonias de algunos municipios y delegaciones, dentro de los cuales se encuentran los municipios de: Ixtapaluca, Ecatepec, Naucalpan, Atizapán de Zaragoza, Tlalnepantla, Cuautitlán Izcalli, Coacalco y las delegaciones de Gustavo A. Madero y Azcapotzalco (Fig. 11).



Figura 11. Ubicación de los municipios y delegaciones de donde se recolectaron las muestras de agua potable provenientes de distintos contenedores.



Figura 12. Contenedores de donde fueron obtenidas algunas de las muestras para identificación de AVL y de bacterias del género *Legionella*.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recolecta y transporte de las muestras

Para la búsqueda de amebas de vida libre y bacterias del género *Legionella*, se seleccionaron diversas fuentes hídricas de contacto humano que incluyeron: piscinas, regaderas, tinacos, piletas, cisternas expuestas al calor del sol además de agua embotellada.

Las muestras de agua se recolectaron en tubos de polipropileno estériles con capacidad de 50 ml, introduciendo el tubo al contenedor de agua tratando de raspar parte de la superficie de este para llevar una porción de la biopelícula que suele formarse en este tipo de lugares. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Investigación en Patógenos Emergentes de la UIICSE en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala a temperatura ambiente para su posterior procesamiento.

Se midieron valores fisicoquímicos del agua:

- Temperatura que fue medida *in situ* con un termómetro digital Itawa.
- pH y conductividad utilizando un instrumento pH EC 98130 (Hanna Instruments, Woonsocket, RI)

2. Aislamiento de AVL

Las muestras se procesaron según el método descrito por De Jonckheere (1984). Se centrifugaron a 2500 X g durante 10 minutos, el sobrenadante se decantó y el sedimento fue inoculado sobre placas de Petri con medio NNE (agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes*) y posterior a ello fueron incubadas a 37 °C dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación (Delattre y Oger, 1981).

Después de 24 horas las placas inoculadas se observaron bajo el microscopio invertido y se buscaron organismos amebianos. De las muestras positivas, se cortó un segmento de 5 mm² en condiciones de esterilidad en donde presentara buen crecimiento de amebas y posteriormente se re-inoculó en placas nuevas de NNE (De Jonckheere, 1984).

Si llegaron a observarse diferentes formas y tamaños en los organismos recolectados se procederá a hacer un cultivo monoxénico es decir, éstas diferentes formas se separarán y se inocularán en nuevas placas de NNE, para así clonar estos organismos.

3. Identificación de las AVL

Se tomaron muestras de amebas a partir de cultivos positivos al crecimiento y se identificaron por morfometría con las claves taxonómicas de Page (1988) con el microscopio invertido marca Nikon y se hizo el registro fotográfico de los organismos encontrados.

4. Prueba de tolerancia a la temperatura

Cabe destacar que la mayoría de las amebas patógenas son termotolerantes mas no todas las amebas que son termotolerantes son patógenas y es por ello que para identificar las características de algunos aislados se realizó la prueba de tolerancia a la temperatura, colocando cultivos en estado de trofozoítos a temperaturas de 37, 42 y 45 °C para determinar su viabilidad (De Jonckheere, 1984).

5. Prueba de flagelación

Se llevó a cabo la prueba de flagelación para la identificación de aquellos organismos que presentan ésta fase flagelar, como lo es el caso del género *Naegleria* (Robinson, 1992).

Las amebas identificadas morfológicamente como *Naegleria* sp. fueron cultivadas en agar NNE, al cual se le agregó 500 µl de agua destilada.

La prueba consistió en colocar unas gotas de agua destilada estéril sobre la superficie de una caja de Petri con medio NNE (no nutritivo con *Enterobacter aerogenes*) en la que se hizo crecer una clona de amebas; posteriormente fue incubada a 37 °C durante dos horas. La placa se observó en intervalos de 30 minutos en el microscopio invertido a 10x para determinar la presencia de formas flageladas, lo que permitió utilizar ésta transformación como una característica de identificación taxonómica (Aladro *et al.*, 2009).

6. Análisis estadístico para AVL

Se llevó a cabo el análisis estadístico de correlación de Spearman (prueba no paramétrica) entre el número de aislados de amebas y cada uno de los parámetros fisicoquímicos que se analizaron en el estudio. El análisis se llevó a cabo con ayuda del programa GraphPad Prism versión 2005.

7. Aislamiento de *Legionella* spp.

Los tubos con unos 35 ml de agua fueron centrifugados a 3000 X g durante 30 minutos, posterior a la centrifugación, se decantó el sobrenadante dejando

aproximadamente 1 ml de la muestra con el sedimento, el cual se proceso por tratamiento ácido para eliminar en lo posible cualquier otra bacteria que no sea ácido resistente como sí lo es *Legionella*, dicho proceso se llevó a cabo colocando 1 ml de suspensión en un tubo de centrifuga de 15 ml estéril que contenía 1 ml de amortiguador ácido y se mezcló. Posteriormente se incubó la suspensión acidificada durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se colocó 1 ml de la suspensión, en placas de agar específico BCYE marca Difco, para el crecimiento de *Legionella*. A estas placas se les agregó cisteína y se incubaron a 37 °C durante 72-96 horas.

8. Identificación morfológica de colonias del género *Legionella*

Las colonias de bacterias pertenecientes al género *Legionella* se tornan visibles de tres a cuatro días después de incubarse a 37 °C en una atmósfera húmeda. Las placas se mantuvieron en dicho ambiente un máximo de dos semanas para descartar las que fueran negativas.

Se identificó a *Legionella* spp. por medio de sus características morfológicas comparando el crecimiento obtenido con la cepa *Legionella pneumophila* subsp. *pneumophila* ATCC 33152. Las colonias típicas de *Legionella* spp. miden de 3 a 4 mm de diámetro, presentan un color blanco- grisáceo, la forma es convexa y circular. Presentan bordes enteros y un moteado granular interno similar al vidrio esmerilado (NCID, 2005).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se llevaron a cabo muestreos en 47 hogares y 6 servicios de autolavado tomando en cuenta la disponibilidad de los contenedores de agua en cada una de las casas. Como se menciona anteriormente el estudio incluyó la toma de muestras de agua de cisternas, tinacos, regaderas, agua embotellada, piletas, piscinas y agua obtenida de las mangueras de presión de los servicios de autolavado.

Los resultados fueron descritos utilizando la siguiente nomenclatura:

- Letra inicial de donde fue tomada la muestra:

AU = Servicio de auto lavado
R = Regadera
C = Cisterna
T = Tinaco
P = Pileta
G = Agua embotellada
A = Alberca

- Número que fue asignado a cada una de las muestras.
- Letras iniciales del municipio o delegación de donde se obtuvo la muestra.

Ix = Ixtapaluca
Ec = Ecatepec
Na = Naucalpan
At = Atizapán de Zaragoza
Tl = Tlalnepantla
Cu = Cuautitlán Izcalli
Co = Coacalco
Gu = Gustavo A. Madero
Az = Azcapotzalco

Ejemplo: el aislado señalado como T7Na, nos indica que es la muestra número 7 tomada de un tinaco y que se obtuvo de alguna colonia perteneciente al municipio de Naucalpan.

1. Amebas de Vida libre

Los muestreos se llevaron a cabo en zonas del Distrito Federal y Área Metropolitana de la Ciudad de México obteniéndose un total de 101 muestras, de las cuales, se identificaron 32 muestras positivas para crecimiento amebiano (Fig.13) (Ver anexo I).

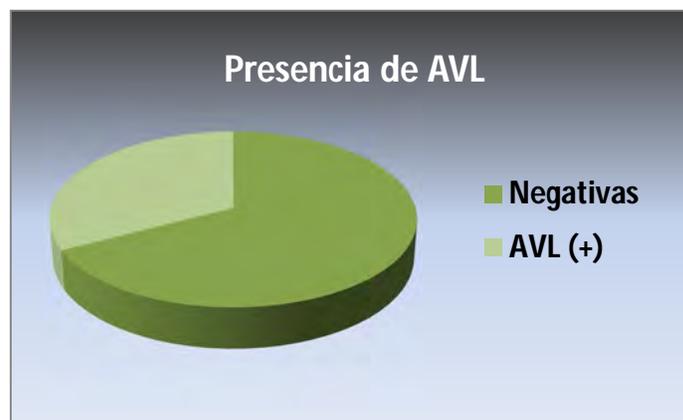


Figura 13. Negativas: son aquellas muestras analizadas que no presentaron crecimiento de AVL; AVL (+): son las muestras que presentaron crecimiento amebiano.

De manera general, cabe señalar que tanto las AVL como las bacterias del género *Legionella* spp. están distribuidas mundialmente, sin embargo, la presencia de estos organismos depende mucho del sitio en donde se localizan, es decir, su presencia o ausencia se encuentran íntimamente ligadas a las condiciones físicas y químicas del lugar, la presencia de depredadores y la calidad y cantidad de alimento que se encuentre disponible. En el caso de este estudio, los organismos en cuestión son contaminantes del agua potable, sin embargo, esta puede aportar las condiciones óptimas de crecimiento para algunas especies de AVL y de *Legionella*, sobre todo si se mencionan algunos factores externos que influyen en la presencia de los mismos en cada uno de los contenedores de agua muestreados, tal es el caso de la formación de biopelículas en las superficies que se encuentran en contacto directo con el agua, debido a la falta de aseo en estos contenedores (Rodríguez *et al.*, 1994; Kuiper *et al.*, 2004).

En el siguiente cuadro se puede observar el número de muestras obtenidas de cada uno de los contenedores de agua que fueron muestreados.

Cuadro 3. Reservorios de agua analizados para la búsqueda de amebas de vida libre.

Contenedor	Positivas (+)	Negativas (-)	Total (T)
Tinaco	9	12	21
Regadera	11	24	35
Cisterna	8	16	24
Agua embotellada	2	10	12
S. de auto lavado	0	6	6
Alberca	1	0	1
Pileta	1	1	2
Total de muestras	32	67	101

(+): Se hace referencia a las muestras en donde hubo presencia de AVL, (-): muestras donde no hubo AVL y (T): es el número total de muestras obtenidas por cada contenedor de agua.

Como se mencionó anteriormente la presencia de AVL depende de las condiciones del lugar donde estas se encuentren y en el caso de las muestras que resultaron negativas para amebas, pudo haber influido el mantenimiento que se les proporciona a los diferentes contenedores de agua que fueron muestreados, pues la limpieza y desinfección de los mismos es un factor que influye directamente en la prevalencia de estos organismos (Gallegos, 1997).

Por otra parte, la identificación de las AVL se llevo a cabo por morfometría con las claves taxonómicas de Page (1988) y se obtuvieron los siguientes resultados:

Del total de muestras obtenidas con presencia amebiana, se identificaron 12 géneros y 21 especies de AVL, algunas tecadas y también un grupo con especies no identificadas (Cuadro 4) (Ver anexo II).

Cuadro 4. Amebas de vida libre aisladas de las 32 muestras positivas para crecimiento amebiano.

Género	Especie
<i>Acanthamoeba</i>	<i>A. astronyxis</i> <i>A. castellanii</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. divionensis</i> <i>A. griffini</i> <i>A. palestinensis</i> <i>A. polyphaga</i> <i>A. quina</i> <i>A. rhyodes</i> <i>A. triangularis</i> <i>Acanthamoeba</i> spp. No. I
<i>Dactylamoeba</i>	<i>D. stella</i>
<i>Echinamoeba</i>	<i>E. sp.</i>
<i>Hartmannella</i>	<i>H. vermiformis</i>
<i>Naegleria</i>	<i>N. fowleri</i> <i>N. gruberi</i>
<i>Platyamoeba</i>	<i>P. sp.</i>
<i>Rhizamoeba</i>	<i>R. sp.</i>
<i>Rosculus</i>	<i>R. ithacus</i>

<i>Saccamoeba</i>	S. sp.
<i>Sappinia</i>	S. sp.
<i>Stachyamoeba</i>	S. sp.
<i>Vahlkampfia</i>	<i>V. aberdonica</i> <i>V. avara</i> <i>V. lacustris</i> <i>V. ustiana</i>
<i>Vannella</i>	V. sp.
<i>Willaertia</i>	<i>W. magna</i>

(No. I): se refiere a un tipo de AVL del género *Acanthamoeba* no registrado en las claves taxonómicas.

Los géneros que se presentaron con mayor frecuencia fueron: *Vahlkampfia* y *Naegleria* identificándose en 24 de los 32 aislados obtenidos y *Acanthamoeba*, en 19. El caso de los dos primeros géneros su frecuencia se le puede atribuir a que tiene especies que toleran temperaturas muy elevadas y cabe recordar que las muestras fueron inoculadas a 37 °C, siendo esto un filtro para que predominen aquellas AVL termotolerantes en base a lo mencionado por Gallegos (1997) que indica que todas las amebas patógenas son termotolerantes, más no todas las amebas termotolerantes son patógenas, y en este contexto *Vahlkampfia* y *Naegleria* fueron los géneros que presentaron mayor frecuencia.

En el caso particular del género *Acanthamoeba* que ocupó el segundo lugar en cuanto a frecuencia, esto pudo haberse debido a que este tipo de AVL son tolerantes a condiciones extremas, esta resistencia esta dada por la estructura de su quiste al presentar una doble pared constituida de celulosa, además de la capacidad de su trofozoíto para tolerar variaciones en las condiciones de los ambientes acuáticos como cambios de pH, temperatura y disponibilidad de oxígeno disuelto (John, 1993; Rodríguez, 1994).

En contraste con lo anterior, los géneros aislados con menor frecuencia fueron, *Echinamoeba*, *Rhizamoeba*, *Saccamoeba*, *Sappinia*, *Willaertia* y *Stachyamoeba* al presentarse únicamente en un aislado (Fig. 14).

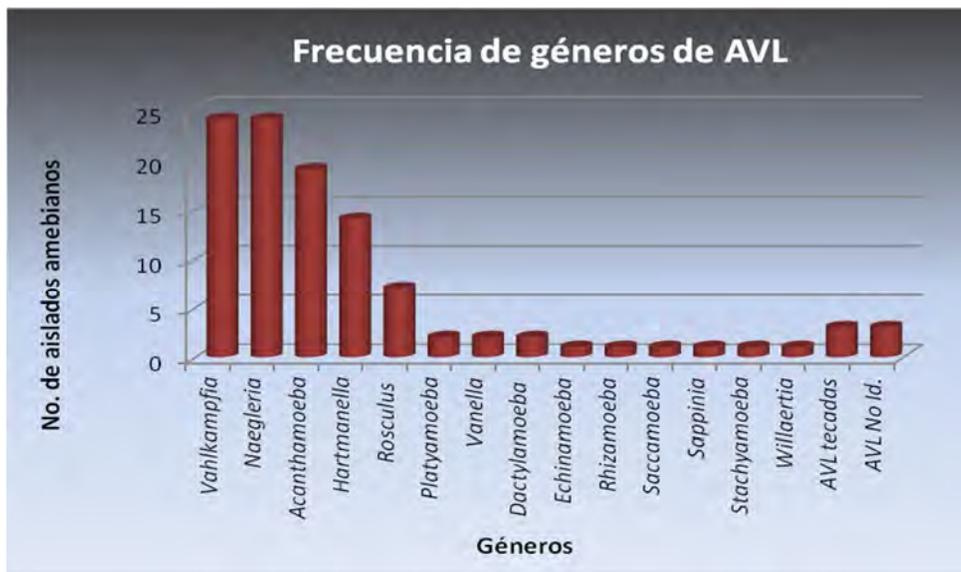


Figura 14. Los géneros: *Vahlkampfia*, *Naegleria* y *Acanthamoeba* fueron los géneros más aislados. Se identificaron AVL tecadas en tres muestras y en otras tres se encontraron amebas que no fue posible identificar.

Las especies aisladas con mayor frecuencia fueron: *A. culbertsoni* y *A. polyphaga* presentes en 10 de los aislados amebianos y *Naegleria gruberi* aislada en 20 de las muestras recolectadas (Fig. 15); se sabe que las especies de este último género se encuentran comúnmente en agua dulce, por lo que suelen predominar en algunas poblaciones, en el caso específico de *N. gruberi*, se dice que su quiste es mucho más resistente que el de otras amebas de su mismo género (Page, 1988). Rivera *et al.* en 1988, mencionan incluso haber observado en los cultivos de esta ameba en condiciones de anaerobiosis parcial a la fase trófica, aunque esta es escasa, mientras que las formas quísticas son muy abundantes. Se menciona también que *N. gruberi* se caracteriza por la emisión de pseudópodos no sólo anteriores sino también laterales, e incluso cuando se le suspende en un medio líquido continúa emitiendo pseudópodos en varias direcciones hasta que finalmente sedimenta, lo que hace de esta ameba un organismo muy eficaz para sobrevivir en su medio, razones por las cuales es probable que en este estudio se le haya encontrado con mayor frecuencia.

En muchos de los estudios realizados sobre AVL, también se ha visto a las especies de *Acanthamoeba* como unas de las más frecuentes, lo que coincide con lo mencionado por Page en 1983, al afirmar que estas amebas son el grupo más común de las gimnamebas, posiblemente el protozoo de vida libre más común que exista, además de la resistencia que presentan por la composición de su quiste como se mencionó anteriormente. Cabe destacar que los resultados obtenidos en este estudio en cuanto a la frecuencia de las especies de éste género es muy importante, pues se puede observar a *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* y *A. castellanii* como de los organismos con mayor presencia,

especies a las que se les atribuye algunas patologías en el ser humano (Fig. 15) (Da Rocha *et al.*, 2009).

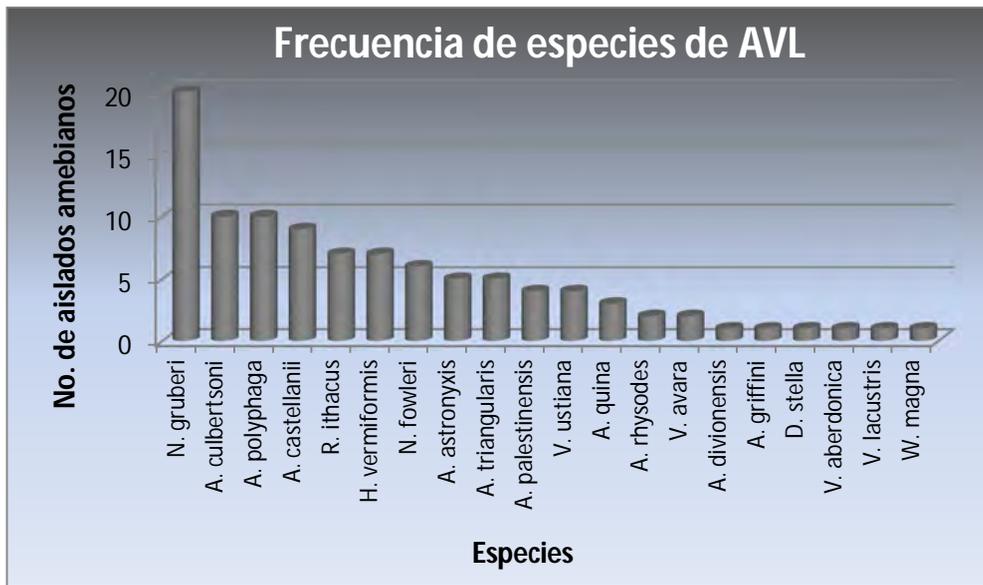


Figura 15. Se observó mayor frecuencia de *N. gruberi*, *A. culbertsoni* y *A. polyphaga*.

Por otra parte, se pudo observar también que el origen de las muestras de agua que tuvieron una mayor riqueza de especies y géneros fueron las regaderas presentando 22 especies distintas, seguidas de los tinacos y las cisternas con 20 especies diferentes (Fig. 16).

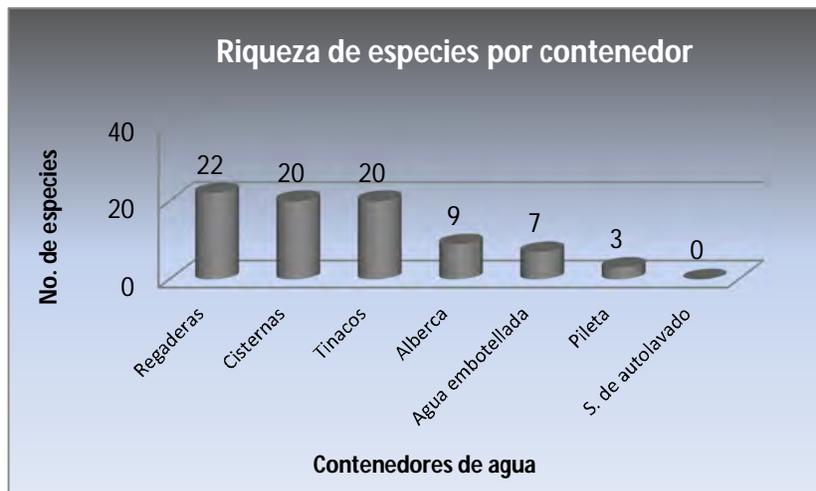


Figura 16. Regaderas, cisternas y tinacos presetaron el mayor número de especies amebianas.

En el cuadro 5 se puede observar que las muestras que presentaron mayor número de AVL fueron T17TI y R1Ec con 13 diferentes géneros y especies, C5Na con 12 y R8Na con 11 géneros y especies distintas.

Cuadro 5. Total de géneros y especies de AVL aisladas por cada una de las muestras obtenidas.

Muestra	No. de aislados	Muestra	No. de aislados	Muestra	No. de aislados
T1Na	4	R4Ix	3	C2Ec	5
T2Na	4	R5Ix	5	C5Na	12
T3Na	4	R6Ix	3	C6Ec	3
T5Na	3	R8Na	11	C7Ec	4
T6Ec	6	R9Ec	3	C20Cu	4
T7Na	4	R10Co	4	G1Na	3
T8TI	4	R11Ec	3	G2Ec	5
T9Ec	8	R13Gu	6	A1Ec	9
T17TI	13	C1Ec	8	P1Ix	3
R1Ec	13	C3Ix	4		
R2Ec	3	C4Ix	5		
R3Ix	3	C2Ec	5		

Es bien conocido que algunos grupos de amebas prefieren las temperaturas mayores a 25 °C en el agua, pues las temperaturas elevadas son un factor importante en el crecimiento y extensión de las AVL y cabe recordar que las muestras que fueron tomadas de las regaderas son las que presentaron las mayores temperaturas (Fig. 16 y 24), lo que pudo haber sido uno de los factores que influyeron para que la mayor riqueza de especies se concentrara en este tipo de receptáculos de almacenamiento (John, 1993; Rodríguez, 1994).

Por otra parte, es importante mencionar que uno de los principales factores en la distribución de las AVL en el agua, pudo haber sido la disponibilidad de alimento (bacterias principalmente), ya que son reconocidas como consumidoras voraces y depredadoras de bacterias, incluso se ha encontrado que el número de amebas se puede correlacionar con el número de bacterias, y si estas no están disponibles para alimento, aunque existan condiciones ideales en el hábitat, las amebas no se desarrollan a plenitud, dicho alimento bien puede estar incluido en las biopelículas que se forman en las superficies de los contenedores que fueron muestreados, sobre todo en cisternas y tinacos al ser lugares que no suelen limpiarse con tanta frecuencia y el agua se encuentra estancada mayor tiempo, lo que coincide también con los datos obtenidos en este estudio, presentándose así a la muestra T17TI como el aislado con mayor riqueza de especies (Fig. 24 y Cuadro 5) (Kyle y Noblet, 1988).

En cuanto a los municipios en donde se obtuvo un mayor número de aislados de AVL estos fueron: Ixtapaluca, Naucalpan y Ecatepec con siete, ocho y 12 aislados amebianos respectivamente, por el contrario en el Municipio de Atizapán de Zaragoza y en la Delegación Azcapotzalco no se demostró la presencia de AVL (Cuadro 6).

Cuadro 6. Número de aislados positivos y negativos para AVL según los municipios o delegaciones muestreadas.

Municipio/ Delegación	No. de aislados con AVL	No. de aislados sin AVL	Total de muestras obtenidas
Ecatepec	12	21	33
Naucalpan	8	22	30
Ixtapaluca	7	4	11
Tlalnepantla	2	5	7
Cuautitlán I.	1	1	2
Coacalco	1	1	2
G. A. Madero	1	6	7
Azcapotzalco	0	1	1
Atizapán de Z.	0	2	2

De acuerdo a la identificación realizada de las especies amebianas, el municipio que obtuvo la mayor riqueza de especies fue Ecatepec con 28 ejemplares, seguido del municipio de Naucalpan con 21, Ixtapaluca y Tlalnepantla con 14 y 13 especies respectivamente (Fig.17).



Figura 17. Riqueza de especies de AVL de acuerdo a los diferentes municipios y delegaciones muestreadas.

2. Amebas de vida libre patógenas en humanos

Según la identificación taxonómica que se obtuvo en el presente estudio, se puede asumir que de los siete grupos de contenedores que fueron muestreados se identificaron un total de nueve especies que representan un alto riesgo para la salud humana, dichos organismos se pueden observar en el cuadro que se presenta a continuación:

Cuadro 7. AVL que causan alguna patología en humanos y que fueron identificadas en este estudio (Tomada de John, 1993).

Amebas de vida libre	Patología en humanos
<i>Naegleria fowleri</i>	Es el agente causal de la MAP, enfermedad que puede causar la muerte incluso solo algunos días después de haber adquirido la infección (Gallegos, 1997).
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>A. culbertsoni</i>	Géneros que se caracterizan por actuar como parásitos oportunistas y son el agente etiológico de la EAG y de algunas infecciones en el ojo.
<i>A. castellanii</i>	También se le atribuye el padecimiento de la EAG.
<i>A. astronyxis</i> <i>A. palestinensis</i> <i>Hartmannella vermiformis</i>	Se sabe que causan infecciones a nivel del SNC.
<i>A. rhysodes</i>	Es causante tanto de infecciones en el SNC como de algunas patologías en el ojo.
<i>Sappinia</i> sp.	Como se menciona anteriormente, este género de amebas es conocido por causar EA.

De los 32 aislados amebianos obtenidos, 22 presentaron al menos una especie patógena (Fig. 18). También se puede observar el número de estas especies que mostraron cada uno de los contenedores que fueron muestreados (Cuadro 8).

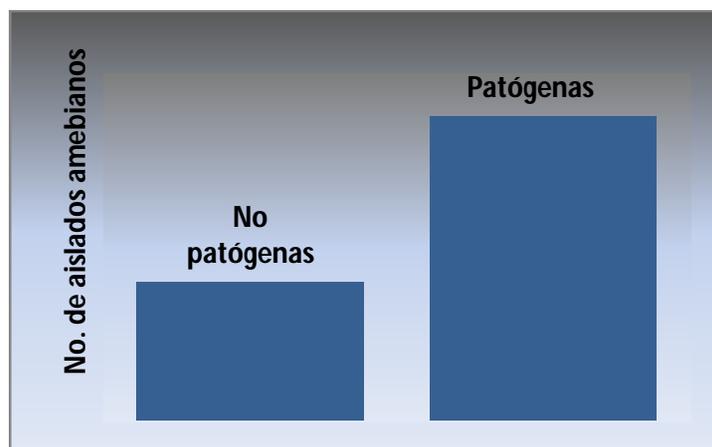


Figura 18. De las 32 muestras que se obtuvieron con crecimiento amebiano, 22 presentan AVL patógenas.

Cuadro 8. Número de aislados patógenos que presentó cada contenedor.

AVL Patógenas	Tinaco	Cisterna	Regadera	Agua embotellada	Alberca	Pileta
<i>N. fowleri</i>	2	2	3	0	0	0
<i>A. culbertsoni</i>	1	4	3	1	1	0
<i>A. castellanii</i>	2	2	3	0	1	0
<i>A. polyphaga</i>	3	3	3	0	1	0
<i>A. astronyxis</i>	1	1	2	0	0	0
<i>A. palestininsis</i>	2	0	2	0	0	0
<i>A. rhyodes</i>	1	0	1	0	0	0
<i>H. vermiformis</i>	2	1	3	1	0	0
<i>Sappinia</i> spp.	0	0	1	0	0	0

Por otra parte, se realizaron también las pruebas de tolerancia a la temperatura y flagelación en donde se sometieron los aislados a 37, 42 y 45 °C obteniendo los siguientes resultados (Cuadro 9).

Cuadro 9. Prueba de temperatura y flagelación de los aislados obtenidos.

Muestra	Prueba de tolerancia a la temperatura (°C)			Prueba de flagelación
	37	42	45	
T1Na	+	+	-	-
T2Na	+	+	+	-
T3Na	+	-	-	-
T5Na	+	+	-	-
T6Ec*	+	-	-	-
T7Na*	+	+	-	-
T8TI	+	-	-	-
T9Ec*	+	+	-	-
T17TI*	+	+	+	+
R1Ec*	+	+	-	-
R2Ec*	+	+	+	-
R3Ix	+	+	+	-
R4Ix*	+	-	-	-
R5Ix*	+	+	-	-
R6Ix*	+	+	+	-
R8Na*	+	-	-	-
R9Ec*	+	+	+	-
R10Co*	+	+	+	-
R11Ec	+	+	-	-
R13Gu*	+	-	-	-
C1Ec*	+	+	-	-
C2Ec	+	-	-	-
C3Ix*	+	+	-	-
C4Ix*	+	-	-	-
C5Na*	+	+	-	-
C6Ec	+	+	-	-
C7Ec*	+	+	+	-
C20Cu*	+	+	+	+
G1Na*	+	+	-	-

G2Ec*	+	+	-	-
A1Ec*	+	+	-	-
P1Ix	+	+	+	-

(+) Son aquellos aislados que crecieron a las temperaturas indicadas en el mismo cuadro; (-) Se refiere a que esos aislados no crecieron a las temperaturas igualmente indicadas en el cuadro; (*)son las muestras que presentaron una o más especies de AVL patógenas para el humano.

Las temperaturas anteriores son ambientes que toleran la mayoría de las AVL patógenas para el humano, como se mencionó anteriormente las temperaturas elevadas son un factor importante en el crecimiento de las AVL sobre todo si son patógenas, lo que explica porque la mayoría de los aislados amebianos que se obtuvieron en este trabajo presentan AVL patógenas (Fig. 18).

En el caso del género *Sappinia*, presente en la muestra R13Gu (Ver anexo I), son organismos patógenos que no toleran temperaturas mayores a 40 °C, lo que coincide con los resultados obtenidos en este estudio (Cuadro 9). Por el contrario los géneros *Hartmannella Acanthamoeba* y *Naegleria* son capaces de proliferar a temperaturas superiores a lo anteriormente mencionado; en el caso específico de *N. fowleri*, es una de las pocas AVL patógenas que sobrevive en temperaturas de hasta 45 °C, punto que también pudo ser observado en este trabajo sobre todo en dos de las muestras (T17TI y C20Cu, ver Anexo I y Cuadro 9) (Page 1988; Road, 2007; Visvesvara *et al.*, 2007).

En otro tema, cabe recordar que una de las características más notables de diferenciación entre protistas se encuentra en algunas especies de naeglerias, incluyendo a *N. fowleri* y es la capacidad para cambiar su forma de ameba a una fase temporal flagelada, sin embargo en los resultados que se obtuvieron solo se pueden observar que dos de las muestras en donde se encontró a *N. fowleri*, fueron positivas para la prueba de flagelación (Cuadro 9), esto puede deberse a que la fase flagelar del género, solo se presenta cuando las condiciones del medio son adversas y tienen que desplazarse hacia otro sitio en donde las condiciones sean mejores para su desarrollo, características que les brinda el medio en donde fueron sembradas (Fulton, 1977).

3. Prueba estadística para AVL

Para establecer de manera confiable una posible relación entre las AVL aisladas y los parámetros fisicoquímicos medidos, se obtuvo el índice de correlación de Spearman (prueba no paramétrica) obteniendo así los siguientes resultados (Cuadro 10):

Cuadro 10: Índice de correlación de Spearman entre los parámetros fisicoquímicos y el número de aislados de AVL obtenidos.

Análisis	Temperatura	pH	Conductividad
r_s	-0.1660	0.2388	-0.4122
P	0.4020	0.1958	0.0212
95% intervalo de confianza	-0.4920 a 0.2205	-0.1371 a 0.5545	-0.6749 a -0.05679
correlación significativa ($\alpha=0.05$)	No	No	Si
N	32	32	32

(r_s): Coeficiente de correlación de Spearman; P: Nivel de significancia; N: Número de datos.

Estudios como los de Lares (1983) y Rivera y cols. (1993), señalan una relación directa entre la temperatura y el pH del agua con respecto al número de amebas, sin embargo, los resultados obtenidos del análisis estadístico empleado en este trabajo, no muestra una correlación significativa entre estos parámetros y el número de AVL aisladas, así que el hecho de que estadísticamente no haya una correlación muy marcada entre los dos aspectos ya mencionados, puede ser atribuido a que las AVL están presentes por causas externas como contaminación a causa del viento y posteriormente su reproducción por falta de aseo en los contenedores; no obstante también cabe recordar que las AVL se adaptan en amplios rangos tanto de temperatura como de pH, lo cual también pudo influir en los valores obtenidos del análisis.

Por otra parte, según el análisis, la conductividad si mostró una correlación significativa respecto al número de AVL aisladas, lo cual es evidente debido a que las AVL necesitan estar adheridas a partículas flotantes o sedimentos existentes en la columna de agua, y pues cabe señalar que la conductividad permite expresar precisamente la concentración de sólidos totales (Riolobos, 2002).

4. Bacterias del género *Legionella*

En cuanto a la identificación de las bacterias del género *Legionella* se llevó a cabo por características morfológicas de la colonia obtenida en el cultivo de BCyE. De las 101 muestras analizadas se obtuvieron 64 positivas y 37 negativas para crecimiento bacteriano específico (Ver anexo III) (Fig. 19).

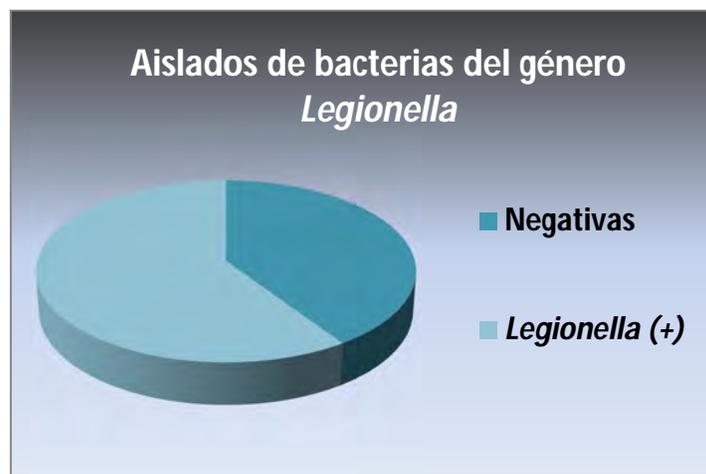


Figura 19. Negativas: son aquellas muestras que no presentaron crecimiento de *Legionella* spp.; *Legionella* (+): son las muestras en donde se localizó *Legionella* spp.

En el cuadro 11 se puede observar el número de muestras positivas y negativas para *Legionella*, obtenidas de cada uno de los contenedores de agua que fueron muestreados. El mayor número de muestras positivas para la bacteria antes mencionada se encontró en regaderas con 21 aislados, seguidas de las cisternas con 16.

Cuadro 11. Muestras obtenidas de cada contenedor muestreado.

Contenedor	Positivas (+)	Negativas (-)	Total (T)
Tinaco	13	8	21
Regadera	21	14	35
Cisterna	16	8	24
Agua embotellada	9	3	12
S. de autolavado	3	3	6
Alberca	1	0	1
Pileta	1	1	2

Se ha mencionado que la temperatura óptima de crecimiento para *Legionella* spp. es de 36 °C (Ta, 1995), sin embargo, se hace hincapié en que la bacteria puede prevalecer favorablemente arriba de los 25 °C, con lo que se puede explicar por qué en el presente estudio hubo mayor presencia de *Legionella* spp. en las regaderas (Cuadro 11), en donde el agua mostró temperaturas que van de los 23 a los 34 °C (Fig. 24), en el mismo trabajo se menciona que de un frotis realizado a algunas regaderas, quedó demostrado el rendimiento de *Legionella*, al ser diez veces mayor que el de muestras de agua de 250 ml tomadas de las mismas, lo que refleja la prevalencia de los microorganismos contenidos en las biopelículas que se forman en dichos contenedores.

Otros autores como Helms (2000), afirman que altas concentraciones de *Legionella* spp. se desarrollan solo en situaciones en las que la temperatura sube por encima de los 20 °C durante periodos prolongados, características que presentan principalmente cisternas y tinacos al ser contenedores que mantienen el agua casi siempre a las mismas temperaturas, según sea la temporada del año, lo cual pudo ser una razón para que la bacteria en cuestión se presentara también con mucha frecuencia en estos contenedores.

Otra característica que influye para la abundancia de las bacterias del género *Legionella* son ciertos materiales presentes en el sistema de plomería, pues es de esperar que el uso de tuberías de hierro o cobre estimulan su crecimiento, pues en un estudio compararon tuberías de diferentes hogares privados y *Legionella* solo se presentó en lugares que tenían tuberías de los metales anteriormente mencionados. Sin embargo, el evitar usar este tipo de material para las tuberías no protege contra la colonización de la bacteria, pues existen otros medios por los cuales *Legionella* puede invadir los suministros de agua potable (Tiefenbrunner *et al.*, 1993).

En cuanto a los municipios y delegaciones en donde se obtuvieron mayor número de muestras positivas, se encuentra Naucalpan con 23 aislados bacterianos y Ecatepec con 18. Por otra parte, se pudo observar que en el municipio de Coacalco no se encontró presencia de *Legionella* spp. (Cuadro 12).

Cuadro 12. Número de aislados positivos y negativos para *Legionella* spp. según los municipios o delegaciones muestreadas.

Municipio/Delegación	No. de aislados con <i>Legionella</i> spp.	No. de aislados sin <i>Legionella</i> spp.	Total de muestras
Ecatepec	18	15	33
Naucalpan	23	7	30
Ixtapaluca	9	2	11
Tlalnepantla	4	3	7
Cuautitlán I.	1	1	2
Coacalco	0	2	2
G. A. Madero	4	3	7
Azcapotzalco	1	0	1
Atizapán de Z.	0	2	2

5. Amebas de vida libre y *Legionella* spp.

Del total de muestras obtenidas en el presente trabajo, 26 de ellas no mostraron crecimiento ni de AVL ni de bacterias del género *Legionella* spp. (Fig. 20).

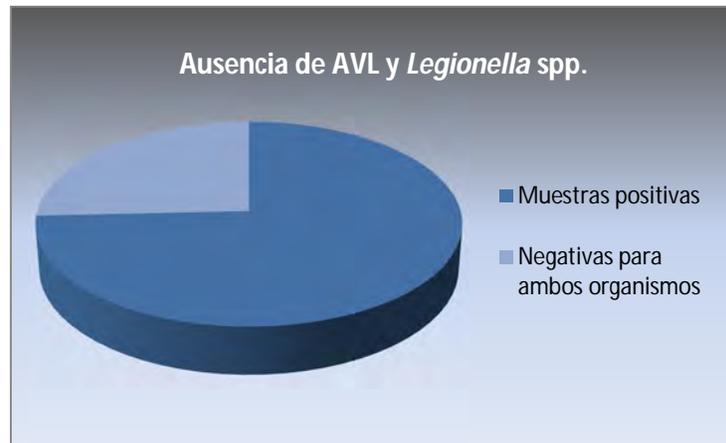


Figura 20. Gráfica que muestra que de las 101 muestras analizadas, 26 no mostraron presencia ni de AVL, ni de bacterias del género *Legionella* spp.

Se observó que en 20 de las muestras obtenidas hubo presencia tanto de AVL como de bacterias del género *Legionella* (Fig. 21 y Cuadro 13).

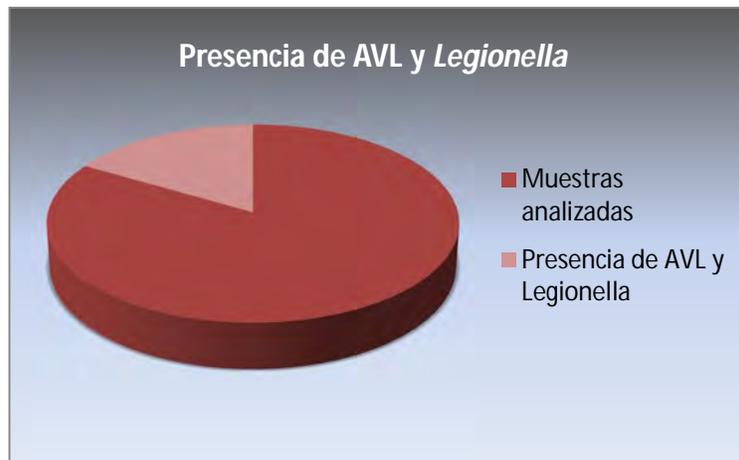


Figura 21. Gráfica donde se observa que del total de muestras analizadas, 20 resultaron positivas para ambos organismos.

Cuadro 13. Aislados que mostraron concordancia en la presencia de ambos organismos.

Muestra	Muestra	Muestra	Muestra
T2Na	R4Ix	C1Ec	A1Ec
T3Na	R5Ix	C2Ec	P1Ix
T5Na	R6Ix	C4Ix	
T17TI	R8Na	C20Cu	
R1Ec	R11Ec	G1Na	
R3Ix	R13Gu	G2Ec	

En un hábitat natural, el crecimiento de *Legionella* spp. requiere de la presencia de otras bacterias y protozoos que son considerados como los huéspedes naturales de dicha bacteria, incluso algunos autores mencionan que *Legionella* nunca es observada en ausencia de otros microorganismos (Rowbotham, 1980; Wadowsky y Lee, 1985; Fields *et al.*, 1993).

La resistencia que presenta *Legionella* al cloro u otros desinfectantes de uso común para el tratamiento de abastecimiento de agua potable, es reforzada por su inclusión en las amebas o por el crecimiento de las biopelículas. Varios protozoos son anfitriones naturales de *Legionella* incluidos los miembros de las amebas *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*, lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, pues en todas las muestras en donde se observó la presencia de ambos organismos, se identificó al menos un miembro de AVL de los géneros anteriormente nombrados (Kuchta *et al.*, 1995).

Como se mencionó en un principio, la inclusión y la replicación intracelular de *Legionella* en los protozoos le ofrece cierta resistencia a la desecación y tratamiento físico o químico del agua, sin embargo en muchas de las muestras obtenidas que incluían a *Legionella*, no mostraron presencia de ningún género de AVL, lo que indica en este caso, que la bacteria se encontraba posiblemente contenida en las biopelículas formadas en la superficies de los contenedores que fueron muestreados (Harf y Monteil, 1988).

De las muestras donde se aislaron tanto AVL como bacterias del género *Legionella* se pudo observar que el contenedor de agua que mostró mayor presencia de ambos organismos, fueron las regaderas con un total de ocho aislados, y una vez más se asoció la alta aparición en este contenedor debido a las altas temperaturas en que el agua se muestreo y el material del que se encuentran hechas las regaderas, pues ambos son factores que favorecen la prevalencia de estos microorganismos. (Fig. 22).



Figura 22. Número de aislados de cada contenedor en donde se observó la presencia de AVL y de bacterias del género *Legionella* spp.

En cuanto a los municipios y delegaciones en donde se localizó a ambos organismos patógenos, ubicamos a Ecatepec e Ixtapaluca con seis de los aislados adquiridos, seguido de Naucalpan en donde se obtuvieron cinco. En los municipios de Coacalco y Atizapán de Zaragoza no se obtuvo ninguna concordancia en la presencia de AVL y de bacterias del género *Legionella* spp., al igual que en la delegación Azcapotzalco (Fig. 23).



Figura 23. Número de aislados en donde se observó la presencia tanto de AVL como de bacterias del género *Legionella* spp., según los municipios o delegaciones muestreadas.

6. Parámetros fisicoquímicos

a) Temperatura del agua

La temperatura es una variable física fundamental en el funcionamiento de los ecosistemas acuáticos y por tanto para los organismos que conforman al mismo, ya que las reacciones químicas del metabolismo ocurren dentro de ciertos límites proporcionales a la temperatura que ocurren regularmente, es decir, a mayor temperatura, mayor actividad metabólica (Riolobos, 2002).

En este estudio se obtuvieron valores de temperatura que van de los 17 a los 34 °C, rangos que cabe destacar caen dentro de la temperatura tolerada tanto de las AVL como de *Legionella* spp. En cuanto a la temperatura obtenida por cada contenedor muestreado, las mayores temperaturas fueron registradas en regaderas alcanzando los 34 °C, por su parte las cisternas presentaron temperaturas que van de los 17 a los 26 °C, los tinacos de 18 a 26 °C, el agua embotellada de 17 a 25 °C, las piletas de 20 a 25 °C, los servicios de autolavado de 21 a 23 °C y la alberca muestreada presentó temperatura de 21 °C (Fig. 24).



Figura 24. Temperaturas del agua obtenida de cada uno de los contenedores muestreados.

En base a lo mostrado anteriormente, se puede decir que el agua de regadera representa el hábitat favorito de los lugares muestreados tanto para AVL al ser el contenedor con mayor riqueza de especies (Fig. 16), como para bacterias del género *Legionella* spp. al haber presentado la cantidad superior de aislados positivos (Cuadro 11), lo que podemos ligar directamente a las temperaturas elevadas que se obtuvieron en las regaderas.

De manera particular las AVL son determinadas como organismos extremófilos, es decir que toleran ambientes extremos, tales como la temperatura, pues son capaces de sobrevivir por debajo de los 4 °C y algunas otras por el contrario sobreviven a temperaturas que llegan hasta los 45 °C, lo que hace de las temperaturas de cada uno de los lugares que fueron muestreados un buen hábitat para las AVL, sin embargo es bien sabido que las temperaturas elevadas favorecen su crecimiento, razón por la cual fue posible hallar mayor número de estas amebas en las regaderas (De Jonckheere, 1981b). Ahondado a ello cabe destacar que el crecimiento óptimo de los aislados de AVL obtenidos en este estudio fue a los 37 °C (Cuadro 9), pues existen algunos géneros de amebas como *Vanella*, *Hartmannella*, *Echinamoeba* y *Platyamoeba* que comienza a enquistarse después de los 37 °C, lo que no es el caso de los géneros de las amebas más patógenas como *Acanthamoeba* y *Naegleria* que si toleran temperaturas de hasta 42 y 45 °C respectivamente, dichos putos coincidieron con algunos de los aislados obtenidos en este trabajo. (Scaglia *et al.*, 1987; Sawyer *et al.*, 1998; Bonilla *et al.*, 2000).

Por su parte, *Legionella* spp. también es capaz de sobrevivir en rangos muy amplios de temperatura que van de los 5.7 a los 63 °C, de hecho en los ecosistemas artificiales, la presencia de *L. pneumophila* ha sido responsable de infecciones humanas y parecen estar particularmente vinculadas con los sistemas de agua más cálidas, donde hasta el 85 % de los sitios pueden contener el patógeno. Lo anteriormente mencionado hace suponer que *Legionella* spp. bien puede estar presente en cualquiera de los contenedores que se tomaron en cuenta para hacer este estudio, ya que la temperatura del agua cae dentro del ámbito tolerado por la bacteria (Ruf *et al.*, 1988; Wadowsky *et al.*, 1992).

b) pH

El parámetro de pH puede ser un factor limitante sobre aquellos organismos que se encuentran en un hábitat acuático, ya que las condiciones de acidez o alcalinidad extremas pueden provocar la muerte de los mismos, pues es bien sabido que todo microorganismo es capaz de existir solamente en un medio óptimo para el, esto según sean sus requerimientos (Kyle y Noblet, 1985).

El valor de pH registrado del agua en cada una de las muestras que se obtuvieron, se mantuvo en un intervalo de 6.3 a 8.5 (Fig. 25), dichos valores de pH se encuentran dentro de los límites que permiten el crecimiento óptimo de las AVL. Autores como Kyle y Noblet (1985), Costas y Griffiths (1986), Rivera y cols. (1993), mencionan que las amebas toleran amplios ámbitos de pH que pueden ir desde valores de 4 hasta 8.6.

Por otro lado, en lo que concierne a la bacteria *Legionella* spp. tolera condiciones de pH que van de 5.0 a 8.5, por lo que se puede decir que este

factor no fue limitante para la presencia o ausencia de las AVL ni de *Legionella* spp. en este trabajo (Fiore *et al.*, 1997).

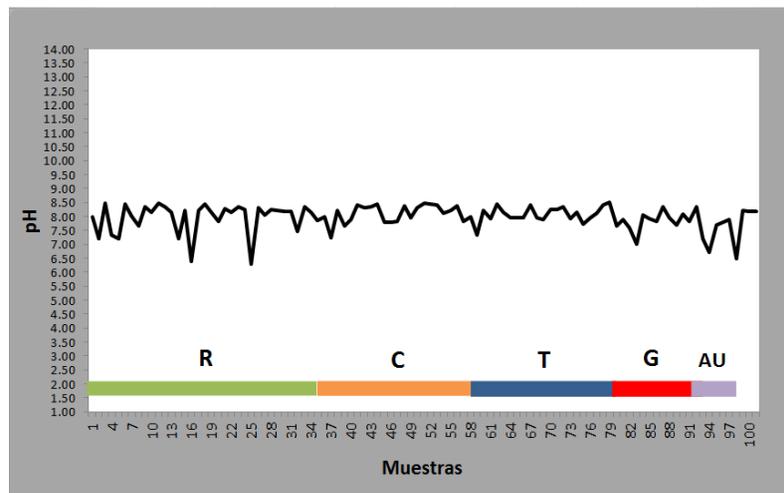


Figura 25. Registro de pH de las 101 muestras analizadas. (R): provenientes de regadera; (C): cisterna; (T): tinacos; (G): agua embotellada; (AU): Servicios de autolavado; el resto de las muestras (sin color ni letra en la gráfica) pertenecen a las dos muestras provenientes de piletas y a la de alberca.

c) Conductividad

Se le conoce por conductividad a la manera de medir la capacidad de conducir la corriente eléctrica a través de las sales disueltas en el agua, de tal manera que permite expresar la concentración de sólidos totales (Riolobos, 2002). Los valores que se obtuvieron en los muestreos realizados en este proyecto, fluctuaron entre 0.06 mS/cm^3 y 3.33 mS/cm^3 (Fig. 26).

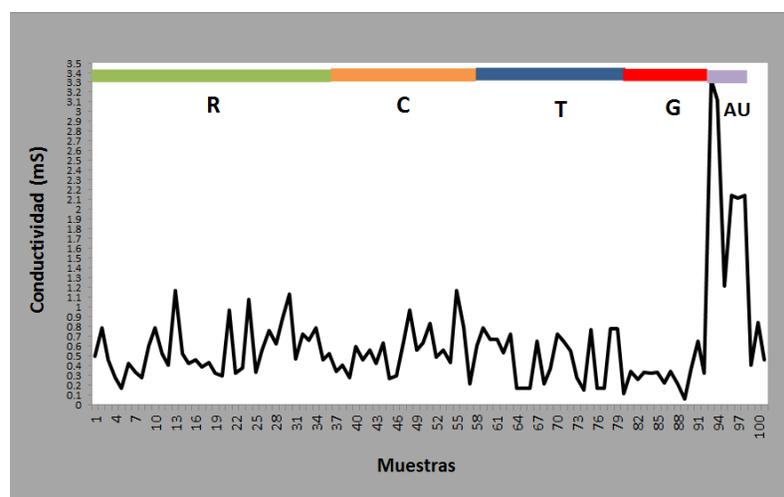


Figura 26. Registro de conductividad de las 101 muestras analizadas. (R): regadera; (C): cisterna; (T): tinacos; (G); agua embotellada; (AU): Servicios de autolavado; el resto de las muestras (sin color ni letra en la gráfica) pertenecen a las dos muestras provenientes de piletas y a la de alberca.

Por su parte las AVL son de amplia tolerancia para este parámetro y se sabe que valores de >3 gramos ($3000 \mu\text{S}/\text{cm}$) se considera agua salina, lo cual afecta negativamente en la riqueza de especies de estos organismos; por debajo de estos valores de conductividad el agua es clasificada como dulce, favoreciendo así el incremento en la presencia de AVL (Calderón, 2008). Los datos que se obtuvieron en el presente trabajo concuerdan con lo anteriormente mencionado, lo cual favoreció el medio para la prevalencia de las AVL, sin embargo, se pudieron observar también datos por arriba de los $2.0 \text{ mS}/\text{cm}^3$ que pertenecen particularmente al agua obtenida de los servicios de autolavado que no es potable, y es que cabe mencionar que los valores de conductividad para agua tratada que es la que se utiliza en este tipo de establecimientos es de $\leq 200 \mu\text{S}/\text{cm}$, así que estas altas concentraciones pudieron haber influido en la ausencia de AVL en todas las muestras obtenidas de estos lugares.

Por otra parte Fliermans (1981), Ohno y cols. (2003), aislaron a *Legionella* spp. del agua de grifo y otros contenedores que presentaron valores de conductividad fluctuantes entre $0.02 \text{ mS}/\text{cm}^3$ a $3.58 \text{ mS}/\text{cm}^3$, dichos datos concuerdan con los del presente trabajo, esto evidencia que la bacteria tolera altos valores de conductividad, pues incluso en tres de las muestras obtenidas de autolavados hubo crecimiento de *Legionella* y justo esas, fueron las que presentaron los valores mas altos en este parámetro.

De manera general, ninguno de los factores fisicoquímicos que fueron evaluados en este estudio, fue limitante para la presencia o ausencia de los organismos en cuestión, pues los valores adquiridos en cada uno de ellos, caen dentro de los rangos establecidos para la supervivencia de los mismos (Ver anexo IV).

CONCLUSIONES

A pesar de que el agua potable es un recurso de contacto directo e incluso de consumo para el humano, puede crear un ambiente adecuado para la presencia y desarrollo de amebas de vida libre. En el presente estudio, fue posible obtener un gran número de muestras positivas para crecimiento amebiano, de las cuales se identificaron 12 géneros y 21 especies amebianas.

De las muestras amebianas analizadas, se identificaron nueve géneros y especies que representan un alto riesgo para la salud humana debido a que algunos son protozoos potencialmente patógenos, dentro de las cuales se menciona a: *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. astronyxis*, *A. palestinensis*, *A. rhyodes*, *Hartmannella vermiformis* y *Sappinia* spp.

Es de suma importancia considerar que del total de aislados amebianos que se obtuvieron en el muestreo, la mayoría presentó por lo menos una especie de ameba de vida libre patógena y sobre todo hay que poner mucha atención en aquellas en donde se identificaron las especies asociadas con patologías que incluso pueden llevar al paciente a la muerte, como: *N. fowleri*, *A. polyphaga*, *A. culbertsoni* y *A. castellanii*.

El único parámetro que resultó significativo estadísticamente para la presencia de AVL, fue la conductividad, sin embargo el análisis de los resultados demostró que la temperatura del agua es un factor muy importante para la prevalencia de este tipo de organismos, al verse incrementada la presencia en aquellos contenedores que mostraron las temperaturas más elevadas.

El agua potable también resultó un buen ambiente para la permanencia de bacterias del género *Legionella* al haberse obtenido más del 60% de aislados positivos con la bacteria, lo cual también es de suma importancia destacar, pues dentro de este género se encuentra una especie en particular que es capaz de causarle un grave daño al ser humano, incluso provocarle hasta la muerte, este es el caso de *Legionella pneumophila*.

Se determinó también, que en varias de las muestras analizadas hubo presencia tanto de AVL como de bacterias del género *Legionella*. Se observó que *Legionella* spp. tiene afinidad solo por algunos géneros de amebas, dentro de los cuales destacan: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella* y *Vahlkampfia*. Dicho lo anterior, es de suma relevancia poner atención en el mantenimiento y desinfección de los sitios en donde se encuentra contenida el agua potable que

se utiliza en casa, todo esto con el fin de prevenir futuras infecciones causadas por estos microorganismos.

El hábitat favorito para las AVL y para *Legionella* spp. en este estudio, fueron las regaderas al ser los contenedores que presentaron las temperaturas más cálidas.

Es importante recomendar el aseo y desinfección continuo de los contenedores de agua que se encuentran en casa, esto con el fin de evitar la prevalencia de las AVL, así como también la formación de biopelículas en donde pueden estar contenidas en comunidad coexistiendo con bacterias del género *Legionella* y así poder evitar brotes infecciosos provocados por dichos organismos.

X. REFERENCIAS

Adl, S., Simpson, A., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, R., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Karpov, S., Krugens, P., Drug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Lynn, D., Mann, D., Mccourt, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S., Nerad, T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegel, F. y Taylor, M. 2005. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protist. *J. Eukariot. Microbiol.* **52** (5): 399-451.

Abu, K., Yong, L., Stone, J. y Harb, S. 1998. Invasion of protozoa by *Legionella pneumophila* and its role in bacterial ecology and pathogenesis. *Am. Soc. Microbiol.* **64** (9): 3127- 3133.

Aladro, M., Reyes, M., Mayen, R., Herros, A. y Gallegos, E. 2009. Manual de prácticas de laboratorio de Protozoos. Ed. Laboratorio de Protozoología del Departamento de Biología Comparada de la Facultad de Ciencias de la UNAM. ISBN: 978-607-02-0444-9.

Anzil, A., Rao, C., Wrzolek, M., Visvesvara, G., Sher, J. y Kozlowski, P. B. 1991. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **115**: 21- 25.

Barry, S., Benson, R. y Besser, R. 2002. *Legionella* and legionaries' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (3): 506-526.

Berk, S., Ting, R., Turner, G. y Ashburn, R., 1998. Production of respirable vesicles containing live *Legionella pneumophila* cells by two *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**(1):279-286.

Bing- Mu, H., Che-Li, L. y Feng-Cheng, S. 2009. Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area. *J. Water Res.* **43**: 2817- 2828.

Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderon, A., Gallegos, E. y Hernández, D. 2000. Occurrence of pathogenic and free-living amoeba in aquatic systems of Huasteca Potosina, México. Aquatic Ecosystems of México: Status and Scope. Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers. Leiden. The Netherlands. pp 37- 44

Boon, G., Carmichael J., Visvesvara, G., Byers, T. y Fuerst, P. 2003. Identification of *Balamuthia mandrillaris* by PCR assay using the mitochondrial 16S rRNA gene as a target. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 453–455.

Borella, P., Montagna, T., Stancanelli, G., Triassi, M., Neglia, R., Marchesi, I., Fantuzzi, G., Tatò, D., Napoli, C., Quaranta, G., Laurenti, P., Leoni, E., De Luca, G., Ossi, C., Moro, M. y Rivera G. 2004. *Legionella* infection risk from domestic hot water. *Emerg. Infect. Dis.* **10** (3): 457- 464.

Bottone, E. 1993. Free-living amoebas of the genera *Acanthamoeba* and *Naegleria*: an overview and basic microbiologic correlates. *Mount. Sinai J. Med.* **4** (60): 260-270.

Cabral, F., Han, K., Powell, E., Ferguson, T. y Cabral, G. 2003. Interaction of an *Acanthamoeba* human isolate harboring bacteria with murine peritoneal macrophages. *J. Euk. Microbiol.* **50**: 516–519.

Calderón, V. 2008, *Aislamiento de la Ameba Patógena Naegleria fowleri del Agua de los Canales de Riego de Mexicali, Baja California*. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Biología Celular). Facultad de Ciencias, México. 84pp.

Calvo, B., Mazón, M y Castro J. 2005. Diagnóstico serológico de neumonía por *Legionella*, Valladolid, España. *Hosp. Universitario Rio Hortega.* **3**:13-22.

Carter, R. 1972. Primary amoebic meningoencephalitis. An appraisal of present knowledge. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**: 193-201.

Centers of Disease Control (CDC). 2012. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html>. Consultado el Enero, 2012.

Characklis, W. y Marshall, K. 1990. Biofilms: A basis for an inter-disciplinary approach. **En:** Characklis, W. y Marshall, K. Eds. *Biofilm*. John Wiley & Sons, New York. pp 3-15.

Costas, M. y Griffiths, A. 1986. Physiological characterization of *Acanthamoeba* strains. *J. Protozool.* **33**: 304-309.

Da Rocha-Azevedo, B., Herbert B. y Marciano-Cabral, F. 2009. Diagnosis of Infections caused by pathogenic free-Living amoebae. *Interdiscipl. Perspect. Infect. Dis.* **14**: 1-14.

De Jonckheere, J. 1981. Pathogenic and non pathogenic *Acanthamoeba* spp. thermally polluted discharges and surface waters. *J. Protozool.* **28**: 56-59.

De Jonckheere, J. 1984. *Postgraduate Course on Biochemical Techniques for the Diagnosis of Prrimary Amoebic Meningoencephalitis*. UNAM, México. 70 pp.

Deetz, T., Sawyer, M., Billman, G., Schuster, F. y Visvesvara, G. 2003. Successful treatment of *Balamuthia* amoebic encephalitis: presentation of two cases. *Clin. Infect. Dis.* **37**: 1304–1312.

Delattre, J., y Oger, M. 1981. *Naegleria fowleri* and heated aquatic environments: a possible mechanism. *Ann. Soc. Belge Med. Trop.* **61**: 441-452.

Duarte, A., Sattar, B., Granwehr, J., Aronson, F. y Lick, S. 2006. Disseminated acanthamoebiasis after lung transplantation. *J. of Heart and Lung Transplantation.* **25** (2): 237-240.

Edagawa, A., Kimura, A., Doi, A., Tanaka, H., Tomioka, K., Sakabe, K., Nakajima, C., y Suzuki, Y. 2008. Detection of culturable and nonculturable *Legionella* species from hot water systems of public buildings in Japan. *J. Appl. Microbiol.* **105**: 2104- 2114.

Fields, B. S. 1993. *Legionella* and protozoa: interaction of a pathogen and its natural host. **En:** Barbaree, J., Breiman, R., Dufour, A. Eds. *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. American Society for Microbiology. Washington, DC. pp 129-136.

Fields, B. 1996. The molecular ecology of *Legionellae*. *Trends Microbiol.* **4** (7):286-90.

Fields, B., Benson, R. y Besser, R. 2002. *Legionella* and legionnaire's disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* **15** (3): 506- 526.

Fiore, A., Kool, J., Carpenter, J. y Butler, J. 1997. Erradicating *Legionella* from hospital water. *J. American Med. Assoc.* **4**: 1404-1405.

Fliermans, C., Cherry, W., Orrison, L., Smith, S., Tison, D. y Pope, D. 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41** (1): 9-16.

Fulton, C. 1977. Cell differentiation in *Naegleria gruberi*. *Annu. Rev. Microbiol.* **31**: 597-629.

Gallegos, N. 1997. Amibas de Vida Libre Potencialmente patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí. Tesis para obtener el grado de doctor en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, México. pp 87

Gaia, V., Fry, N., Harrison, T. y Peduzzi, R. 2003. Sequence-based typing of *Legionella pneumophila* serogroup 1 offers the potential for true portability in legionellosis outbreak investigation. *J. Clin. Microbiol.* **41** (7): 2932-2939.

Garaycochea, M., Beltrán, M. y Morón, C. 2008, Patogenicidad de las amebas de vida libre, aisladas de fuentes de agua en Lima. *Rev. Peru Med. Exp. Salud Pública.* **25** (2): 204- 214.

Gelman, B., Rauf, S., Nader, R., Popov, V., Bokowski, J., Chaljub, G., Nauta, H. y Visvesvara, G. 2001. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA* **285**: 2450–2451.

Gelman, B., Popov, V. y Chaljub, G. 2003. Neuropathological and ultrastructural features of amoebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. *J. Neuropathology and Exp. Neurology.* **62** (10): 990–998.

Glockner, G. 2008. Identification and characterization of a new conjugation IVA secretion system of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. *Int J. Med. Microbiol.* **298** (5):411-428.

Griesemer, D., Barton, L. y Reese, C. 1994. Amoebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. *Pediatr. Neurology.* **10** (3): 249–254.

Harf, M. y Monteil, H. 1988. Interaction between free-living amoebae and *Legionella* in the environment. *Water Science Techniques.* **20** (11/12), pp235-239.

Helms, C. M. 2000. Legionnaire's disease associated with a hospital water system. A five-year progress report on continuous hyperchlorination. *J. American Med. Assoc.* **259**: 2423-2427.

Jawetz, E., Melnick, J. L., Adelberg, E. A., Brooks, G. F., Butel, J. S. y Ornston, L. N. 1990. Microbiología Médica. El Manual Moderno. México. D. F. 250-253 pp.

John, D. 1993. Oportunistically pathogenic free-living amoebae. **En:** Kreier J. y Baker J. Eds. *Parasitic Protozoa*. Academic Press, Nueva York. pp.140- 246.

Kilvington, S., Beeching, J. y White, G. 1991. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestión of whole cell DNA. *J. Clin . Microbiol.* **29**:310-314.

Klein, N. y Cunha, B. 1998. Treatment of legionnaires' disease. *Semin. Resp. Infect.* **13** (2):140-146

Kramer, M. y Ford, T. 1994. Legionellosis: ecological factors of an environmentally 'new' disease. *Zentralbl Hyg. Umweltmed.* **195** (5-6):470-482.

Kuchta, J. 1993. Effect of chlorine on the survival and growth of *Legionella pneumophila* and *Hartmannella vermiformis*. **En:** Barbaree, J., Breiman, R., Dufour, A. Eds. *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. Washington, DC, American Society for Microbiology. pp 55-62.

Kuiper, M., Wullings, B., Akkermans, A., Beumer, R. y Kooij, D. 2004. Intracellular proliferation of *Legionella pneumophila* in *Hartmannella vermiformis* in aquatic biofilms grown on plasticized polyvinyl chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (11): 6826- 6833.

Kyle, D. y Noblet, G. 1985. Vertical distribution of potentially pathogenic free-living amoebae in fresh water lakes. *J. Protozool.* **32**: 99-105.

Kyle, D. y Noblet, G. 1987. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. II. Lake Issaqueena. *J. Protozool.* **34** (1): 10-15.

Lalitha, M., Anandi, V., Srivastava, A., Thomas, K., Cherian, A. y Chandi, S. 1985. Isolation of *Acanthamoeba culbertsoni* from a patient with meningitis. *J. Clin. Microbiol.* **21**: 666- 667.

Lares, V., De Jonckheere, F., De Moura, H., Rechi, A., Ferrera, E., Fernández, G., Ruiz, C. y Visvesvara, G. 1993. Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, México: Study of the isolates. *J. Clin. Microbiol.* **31** (3): 685-688.

Lau, H. y Ashbot, N. 2009. The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implication for drinking water. *J. Appl. Microbiol.* **107**: 368-378.

Lee, J. y West, A. 1991. Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *J. Appl. Bacteriology.* **70**: 121-129.

Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P., Sacchetti, R., Stampi, S. y Zanetti, F. 2004. *Legionella* waterline colonization: detection of *Legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems. *J. Appl. Microbiol.* **98**: 373- 379.

Loschiavo, F., Ventura- Spagnolo, T., Sessa, E. y Bramenti, P. 1993. Acute primary meningoencephalitis from *Naegleria fowleri*. Report of a clinical case with favourable outcome. *Acta Neurol.* **15**: 333- 340.

Marshall, K. 1996. Adhesion as a strategy for access to nutrients. **En:** *Bacterial Adhesion: Molecular and Ecological Diversity*. Ed. M Fletcher, Wiley-Liss inc. New York. pp 59-87.

Martinez, A. 1993. Free-living amebas: infection of the central nervous system. *Mount Sinai J. Medicine*. **60** (4): 271–278.

Miuetzner, S., Schwille, R., Farley, A., Wald, E., Ge, J., States, S., Libert, T. y Wadowsky, R. 1997. Efficacy of thermal treatment and copper-silver ionization for controlling *Legionella pneumophila* in high-volume hot water plumbing systems in hospitals. *Am. J. Inf. Cont.* **25** (6):452-457.

Moreira, E., Helbig, J. y Swanson, M. 2006. Membrane vesicles shed by *Legionella pneumophila* inhibit fusión of phagosomes of lysosomes. *Infect. Immun.* **74** (6): 3285-3295.

Murdoch, D. 2003. Diagnosis of *Legionella* Infection. *Med. Microbiol.* **36**: 64-69.

Ohno, A., Kato, N., Yamada, K. y Yamaguchi, K. 2003. Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* serotype 1 in hot spring water and tap water. *Appl. Environ. Microbiol.* **69** (5): 2540-2547.

Page, F. 1976. *An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 180 pp.

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

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

Qvarnstrom, Y., Da Silva, A., Schuster, F., Gelman, B. y Visvesvara, G. 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J. Infect. Dis.* **199** (8): 1139–1142.

Reed, R., Cooke-Yarborough, C. y Jaquier, A. 1997. Fatal granulomatous amoebic encephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. *Med. J. Australia*. **167** (2): 82-84.

Riolobos, P., Álvarez, C., Rojo, C., Rodrigo, M., Ortega, E. y Cirujano S. 2002. Técnicas Habituales de Análisis Físicos, Químicos y Biológicos del Grupo de Investigación del Agua. Real Jardín Botánico, CSIC, Estudios Europeos del Medio Ambiente, S. L y Centro de Ciencias Medioambientales, CSIC. Madrid, España. 80 pp.

Rivera, A., Paz, M., Ortega, R. y López, O. 1988. Estudio biológico de amibas del grupo "Limax", géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*. *Arch. Mexicanos. ANAT.* **15** (3): 1-14.

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

Robinson, B., Christy, P y Hayes, S. 1992. *Manual of Analytical Methods. Protozoology*. Reporte No.39. State Water Laboratory Engineering and Water Supply Department, Sidney. 90 pp.

Rodríguez, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critic. Rev. Microbiol.* **20** (3): 225-241.

Roig, J., Carreres, A. y Domingo, C. 1993. Treatment of Legionnaires' disease. current recommendations. *Drugs.* **46** (1):63-79.

Ronald, M. 1999. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *J. University of Louisville.* **1** (4): 283-293.

Rowbotham, T. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J. Clin. Pathology.* **33**:1179-1183.

Ruf, B., Schurmann, I., Horbach, K., Seidel, D. y Pohle, H. 1988. Nosocomial *Legionella pneumophila*: demonstration of potable water as the source of infection. *Epidemiol. Infect.* **101**: 647-65.

Sanden, G., Morrill, W., Fields, B., Breman, R. y Barbaree, J. 1992. Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (6): 2001-2004.

Sawyer, W., Nerad, T., Cahoon, L. y Nearhoo, J. 1998. *Learamoeba waccamawensis*, N.G., N. sp, (*Heterolobosea: Vahlkampfiidae*), a new temperature-tolerant cyst-forming soil amoeba. *J. Euk. Microbiol.* **45**: 260-264.

Scaglia, M., Gattis, S., Brustia, R., Strosselli, M., Bernuzzi, A. y Cevini, C. 1987. Pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* spp.: a new autochthonous isolate from an Italian thermal area. *Microbiologica.* **10**: 171-182.

Schuster, F., Dunnebacke, T. y Booton, G. 2003. Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3175-3180.

Schuster, F. y Visvesvara, G. 2004. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates*. **7**: 41–51.

Schuster, F. y Visvesvara, G. 2008. *Balamuthia mandrillaris*. **En:** Khan, N. *Emerging Protozoan Pathogens*. Eds. Taylor & Francis, New York. pp 71-118.

Singh, S., Patwari, A., Dutta, R., Taneja, N. y Anand, V. 1998. *Naegleria meningitis*. *Indian J. Pediatrics*. **35** (10): 1012–1015.

Smirnov, A. y Thar, R. 2003. Spatial distribution of Gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) in brackish-water sediments at the scale of centimeters and millimeters. *Protist*. **154**: 359-369

Stout, J. y Yu, V. 1997. Current concepts : Legionellosis. *N. Engl. J. Med.* **337**: 682-687.

Ta, A. 1995. Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardisation of such methods. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2118-2123.

Tiefenbrunner, E. 1993. Occurrence and distribution of *Legionella pneumophila* in water systems of central European private homes. **En:** Barbaree J., Breiman R., Dufour A. Eds. *Legionella: Current Status and Emerging Perspectives*. Washington, D.C. American Society for Microbiology. 235–238.

Turner, M., Cockerell, E. y Brereton, H. 2005. Antigens of selected *Acanthamoeba* species detected with monoclonal antibodies. *Int. J. Parasitol.* **35** (9): 981–990.

Vargas, Z., Gomez A., Vazquez, M., Licea, A. y Lares, V. 2005. Successful treatment of *Naegleria fowleri* meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazol and rifampicin. Case report. *Arch. Med. Res.* **36**: 83-86.

Visvesvara, G., Schuster, F. y Martinez, J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G. N. sp., Agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.* **40**: 504- 514.

Visvesvara, G. y Maguire, J. 2006. Pathogenic and opportunistic free-living amoebas. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Tropical Infect. Dis.* **2**:1114–1125.

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

Wadowsky, R. y Yee, R. 1985. Effect of non-Legionellaceae bacteria on the multiplication of *Legionella pneumophila* in potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:1206-1210.

Wadowsky, R., Butler, L., Cook, M., Verma, S., Fields, B., Keleti, G., Sykora, J. y Yee, R. 1988. Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmannellid amoebae as growth factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2677-2682.

Wilhelmus, K., Jones, D., Matoba, A., Hamill, M., Pflugfelder, S. y Weikert, M. 2008. Bilateral *Acanthamoeba* keratitis. *American J. Ophthalmol.* **145** (2): 193–197.

Yu, V., Liu, Z., Stout, J. y Goetz, A. 1993. *Legionella* disinfection of water distribution systems: principles problems and practice. *Infect. Con. Epid.* **14**(10): 567-570.

XI. ANEXOS

Anexo I. Amebas de vida libre

Muestras negativas para crecimiento amebiano.

T4Na	T16Na	R16Az	R23Na	R30Gu	R12Ec	C14Na	C22Ec	G7Na	AT2
T10Na	T18Ec	R17Gu	R24TI	R31Cu	C8Ec	C15Ec	C23Ec	G8Na	AT3
T11Na	T19Na	R18Na	R25Ec	R32Gu	C9Ix	C16Ec	C24Ec	G9TI	AT4
T12Na	T20TI	R19Ec	R26TI	R33Ec	C10Na	C17Gu	G3Na	G10Gu	AT5
T13Na	T21Ec	R20Ec	R27Ec	R34Ec	C11Ec	C18Na	G4Ec	G11Na	AT6
T14Na	R14Ix	R21Na	R28Ix	R35Co	C12Gu	C19TI	G5Na	G12Na	P2Ec
T15Na	R15At	R22Ec	R29Na	R7Ix	C13Ec	C21At	G6Ec	AT1	

Muestras positivas para crecimiento amebiano.

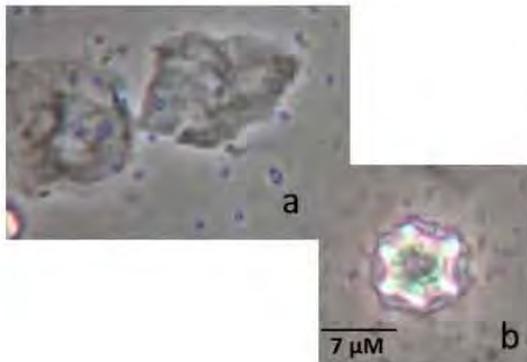
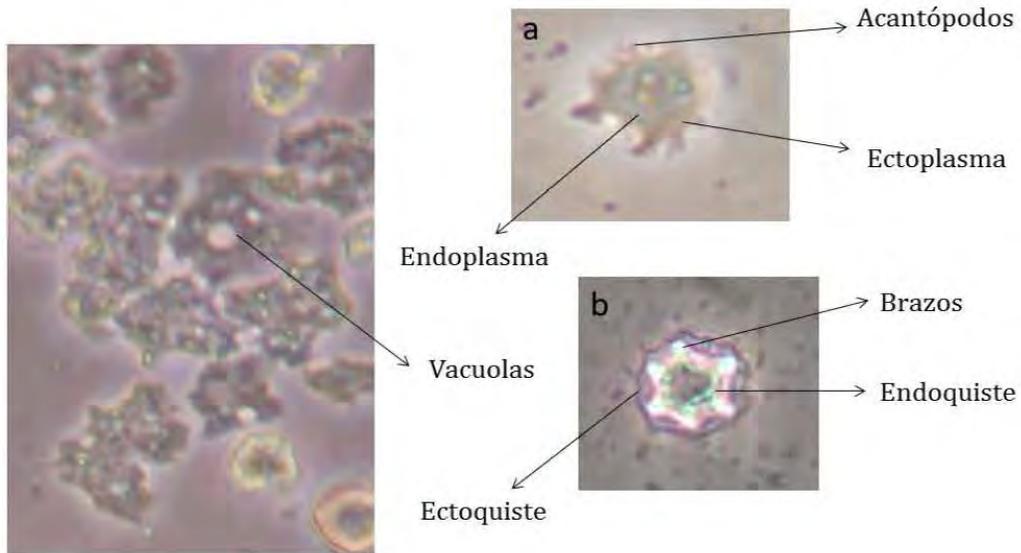
T1Na	T7Na	R2Ec	R8Na	C1Ec	C6Ec	A1Ec
T2Na	T8TI	R3Ix	R9Ec	C2Ec	C7Ec	P1Ix
T3Na	T9Ec	R4Ix	R10Co	C3Ix	C20Cu	
T5Na	T17TI	R5Ix	R11Ec	C4Ix	G1Na	
T6Ec	R1Ec	R6Ix	R13Gu	C5Na	G2Ec	

Muestras que presentaron AVL patógenas

AVL patógenas	Muestras en las que se presentaron			
<i>Naegleria fowleri</i>	T17TI R6Ix	R2Ec R10Co	C7Ec C20Cu	
<i>A. culbertsoni</i>	R13Gu R8Na C3Ix	C4Ix A1Ec C1Ec	R5Ix C5Na	T9Ec G2Ec
<i>A. castellanii</i>	C4Ix R8Na R1Ec	R5Ix A1Ec T9Ec	T17TI C5Na	
<i>A. polyphaga</i>	T6Ec R8Na T9Ec	C4Ix A1Ec C1Ec	R5Ix C5Na	T17TI R1Ec
<i>A. astronyxis</i>	C4Ix	R5Ix	T17TI	R8Na
<i>A. palestininsis</i>	T17TI	R8Na	R1Ec	T9Ec
<i>A. rhyodes</i>	T9Ec	R1Ec		
<i>H. vermiformis</i>	T6Ec C7Ec	R9EC R4Ix	T7Na G1Na	R10Co
<i>Sappinia</i> spp.	R13Gu			

Anexo II. Fotos de amebas de vida libre aisladas

***Acanthamoeba* spp. Volkonsky, 1931**



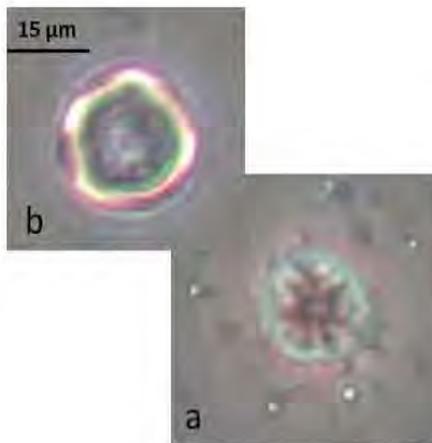
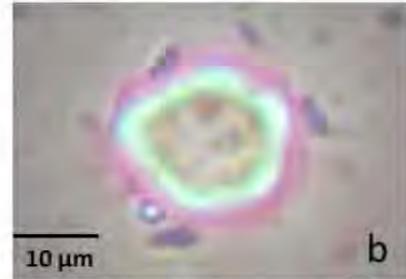
***A. astronyxis* Ray y Hayes, 1954:** Todos o casi todos los brazos del endoquiste están en contacto con el ectoquiste en el mismo plano; tiene un máximo de nueve brazos y la media del diámetro va de 19.2- 22 μm.

***A. castellanii* Douglas, 1930:** El quiste es reticulado, más o menos esférico, el endoquiste está conectado con el ectoquiste por pequeños brazos cónicos. El ectoquiste es espeso y muy doblado; la media del diámetro del quiste es de 14- 16 μm.



a: Trofozoíto
b: Quiste

A. divionensis Pussard y Pons, 1977: El endoquiste es esférico u ovoide, a menudo deformado por muchas protuberancias largas; a menudo el ectoquiste es completamente suave, no está estrecho hacia el endoquiste. La media del número de brazos del endoquiste va de 5-6 y la media del diámetro del quiste es de 13 μm . Posee isoenzimas y patrones de proteínas totales muy característicos de la especie.

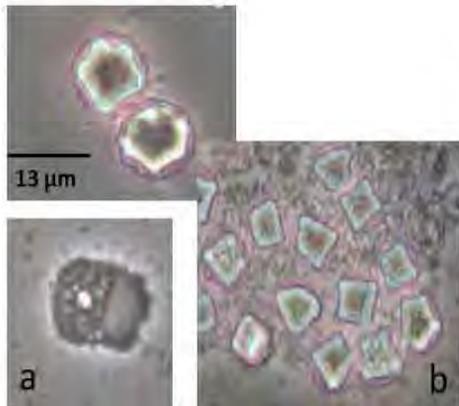


A. culbertsoni Singh y Das, 1970: El endoquiste es usualmente redondeado, ocasionalmente poligonal. El ectoquiste es delgado, ondulado o arrugado, más o menos estrecho hacia el endoquiste. La media del número de poros es de 5-6 y la media del diámetro del quiste es de 15-18 μm . Serológicamente es muy distinta a las demás especies de este género.

A. griffini Sawyer, 1971: No crece a más de 37 °C cuando es cultivada, el endoquiste es variable, algunas veces es esférico u ovoide con o sin brazos cortos, algunas veces también es estrellado con brazos bien desarrollados, dando apariencia de rueda dentada. El ectoquiste es ondulado y estrecho hacia el endoquiste, excepto cuando este último es estrellado. La media del número de brazos o poros del endoquiste es seis, y la media del diámetro del quiste son 14 μm . Posee un patrón único de isoenzimas.

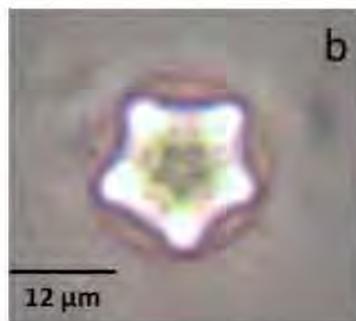
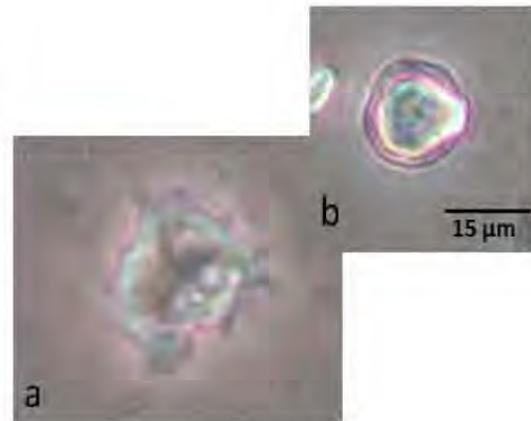


a: Trofozoíto
b: Quiste



A. polyphaga Puschkarew, 1913: Una pequeña proporción del quiste es reticulado, es muy irregular, prácticamente nunca estrellado; el ectoquiste es menos plegado que en *A. castellanii* y está muy separado del endoquiste. La media del número de puntas del endoquiste es de 5- 6 y la media del diámetro es de 14 µm. Las isoenzimas y el patrón de proteínas totales son muy distintivos de la especie.

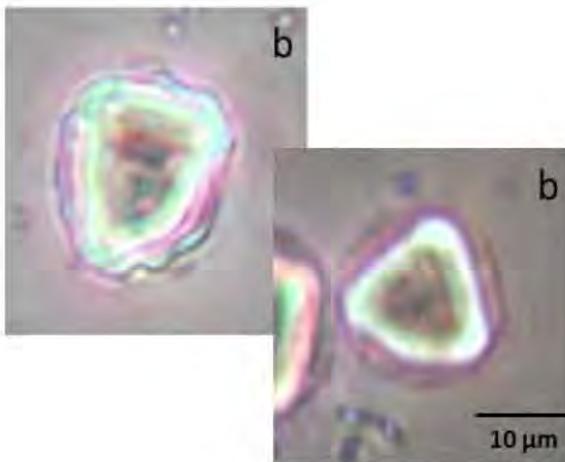
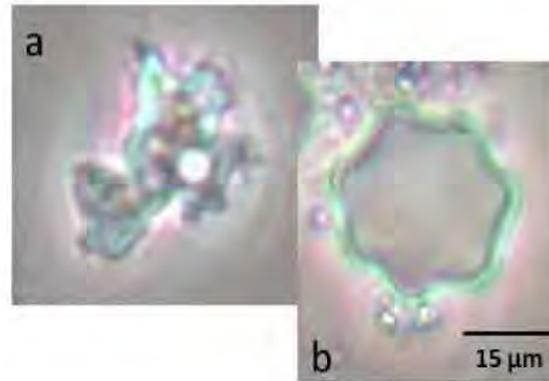
A. palestinensis Reich, 1933: No crece a más de 37 °C, el endoquiste es esférico u ovoide, rara vez con pocas protuberancias cónicas, el ectoquiste es fino, más o menos arrugado, usualmente muy cerrado hacia el endoquiste. Poros difíciles de discernir; la media del número de poros es de 7.5 y la media del diámetro del quiste usualmente es de 17-18 µm.



A. quina Pussard y Pons, 1977: El endoquiste puede ser esférico, ovoide, algunas veces cuadrangular, pentagonal o piriforme, el ectoquiste es delgado y pegado al endoquiste. La media del número de brazos del endoquiste es de 4- 5 y la media del diámetro es de 12 µm.

a: Trofozoíto
b: Quiste

A. rhyodes Singh, 1952: Algunos quistes son pseudo reticulados, a veces el endoquiste presenta brazos cónicos o algo tubulares, una minoría son estrellados o dan apariencia de rueda dentada. La media del número de brazos del endoquiste es de 7- 7.5 y la media del diámetro del quiste va de 16- 18 μm .



A. triangularis Pussard y Pons, 1977: Es capaz de crecer en cultivo a 37 °C, la media del número de brazos del endoquiste es menor a cuatro, la media del diámetro del quiste son 13 μm .

Echinamoeba spp. Page, 1975: Puede ser una ameba triangular, elongada, flabelada o irregular en su contorno, la longitud media del protozoo no pasa las 15 μm , a menudo con pocos y finos subseudopodos que no pasan de 1- 1.5 μm de largo. El quiste es esférico, de pared delgada y usualmente no sobrepasa las 10 μm de diámetro.

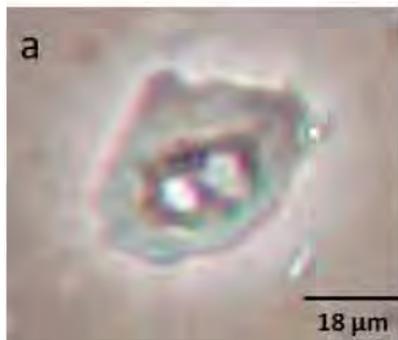
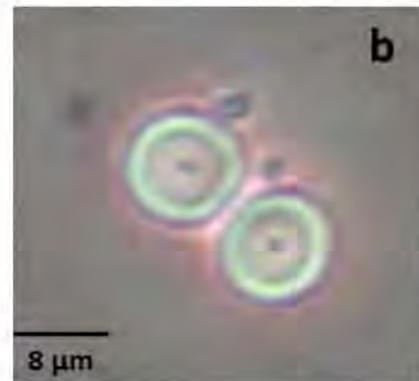


a: Trofozoíto
b: Quiste



***Platyamoeba* spp. Page, 1969:** Este género de ameba es una de las menos comunes aislada de agua dulce y hábitats terrestres, se parece mucho al género *Vanella*, pero se diferencia principalmente por su forma flotante y la formación de su quiste ya que *Vanella* spp. no lo forma.

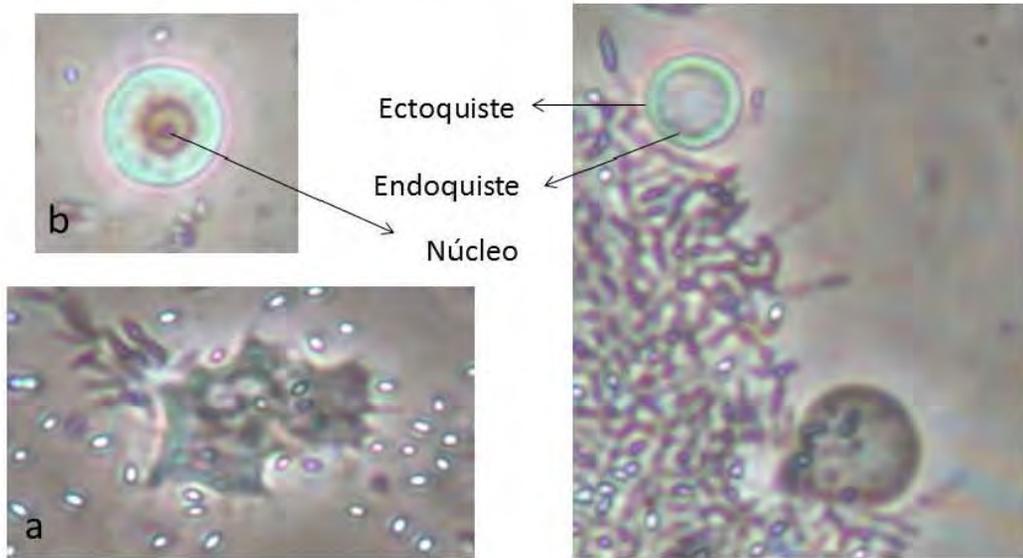
***Rosculus ithacus* Hawes, 1963:** Las formas locomotoras presentan mayor dimensión, usualmente miden de 5-17 μm ; los núcleos presentan una media de 1.9- 2.4 μm , el quiste es muy pequeño, suave, oval o esférico y su tamaño va de los 3.5- 8.8 μm .



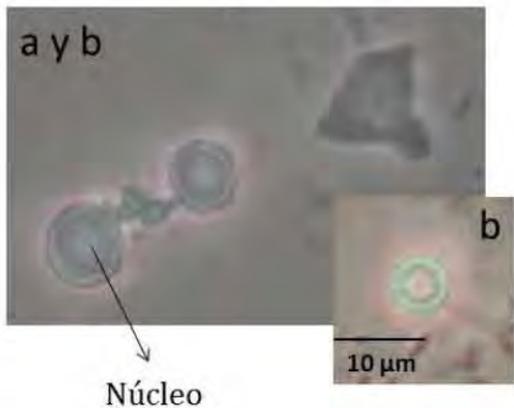
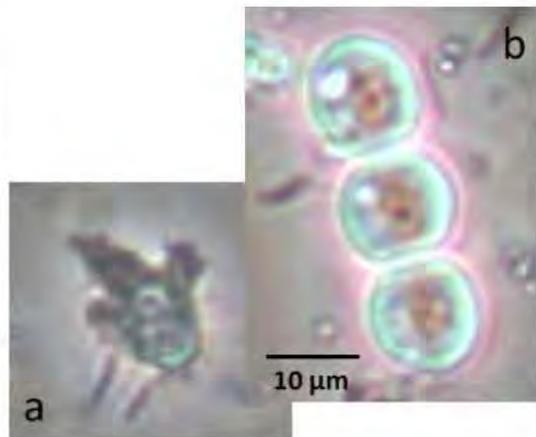
***Vannella* spp. Bovee, 1965:** Este género se distingue por no formar estructura quística, sus dimensiones van de los 25-80 μm , sus núcleos pueden medir de 6-11 μm , generalmente se adhiere mal al vidrio a la hora de ser observada y algunas veces puede presentar algunos filamentos simples.

a: Trofozoíto
b: Quiste

***Naegleria* spp. Alexeieff, 1912**



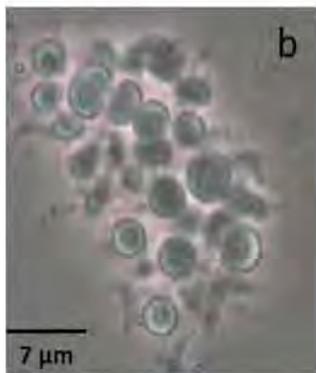
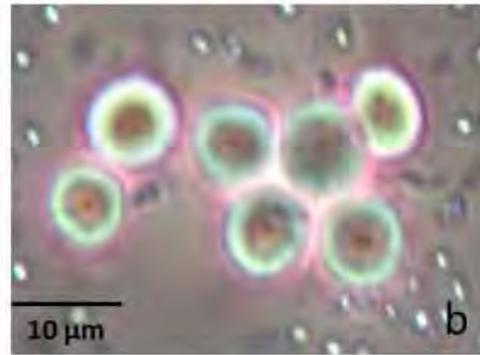
***N. gruberi* Schardinger, 1899:** Esta ameba crece bien a 20 °C, los poros del quiste presentan el borde engrosado notablemente y la pared puede ser lisa, rugosa o angular.



***N. fowleri* Carter, 1970:** Crece incluso hasta los 45 °C, el borde de los poros del quiste no se notan o se ven ligeramente engrosados y no permanecen de manera aglutinada, una característica muy distinguida es el núcleo en posición muy céntrica.

a: Trofozoíto
b: Quiste

Hartmannella spp. Alexeieff, 1912; Page, 1974: Posee una capa hialina que casi siempre está en continua locomoción, sin división nuclear si es que se forma el quiste.



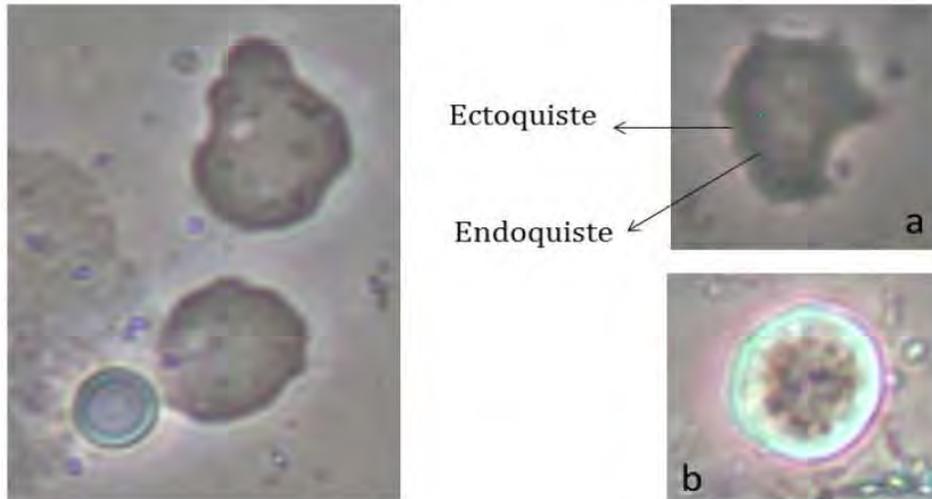
H. vermiformis Page, 1967: Siempre presenta una capa hialina, puede medir de 12- 37 μm de largo, sus núcleos miden de 2.1- 4.1 μm . El quiste es esférico o ligeramente ovoide, la capa de la pared exterior se encuentra un tanto separada y su diámetro va de los 4- 9.5 μm .

Saccamoeba spp. Frenzel, 1892 y Bovee, 1972: Forma limax no eruptiva, pero activa con núcleos vesiculares, con cristales citoplasmáticos, una perilla uroidal, vellosa o papilada y una vacuola contráctil abultada. El quiste puede ser redondeado o ligeramente oval con diámetro que va de los 12- 19 μm .

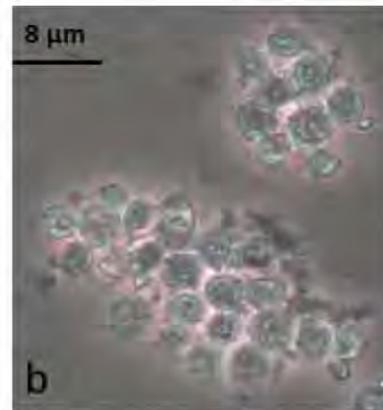


a: Trofozoíto
b: Quiste

***Vahlkampfia* spp. Chatton y Lalung-Bonnaire 1912**



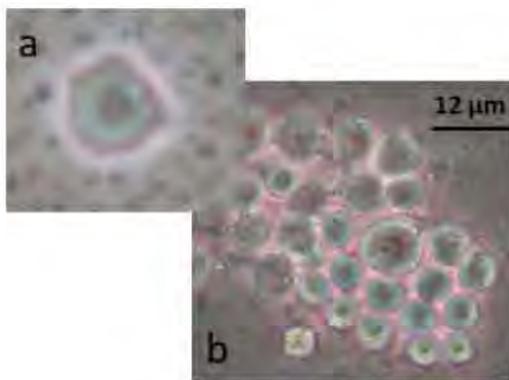
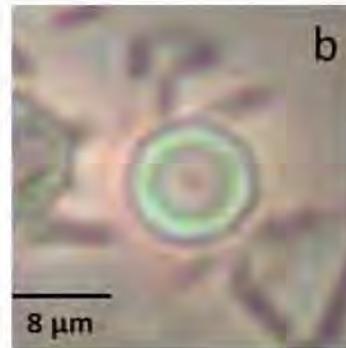
***V. aberdonica* Page, 1974:** Quiste sin distinción de revestimiento gelatinoso (puede ser algo pegajoso). Todos o casi todos los quistes son circulares u ovoides y miden de 6.5–13 μm ; en raros casos la capa externa puede estar muy separada de la interna. Por otra parte, la ameba es elongada y derecha, consistentemente no eruptiva y mide de 18- 37 μm .



***V. avara* Page, 1967:** Quiste distinguido por revestimiento gelatinoso en una pared lisa, algunas veces con ángulos redondeados y otras veces en forma de media luna. El quiste tiene un tamaño de 7-14 μm (x 9.7 μm), la ameba mide de 14.5-33 μm de largo; a menudo presenta filamentos uroidales finales y los núcleos usualmente miden de 3.4- 4.8 μm .

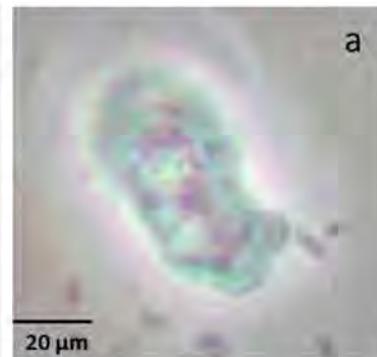
a: Trofozoíto
b: Quiste

***V. lacustris* Nägler, 1909:** Ameba pobremente descrita, sin embargo se sabe que el quiste es de forma irregular y que mide de 6- 8 μm . La ameba raramente es extendida y cambia de forma rápidamente; medie de 8 - 15 μm .



***V. ustiana* Page, 1974:** La ameba mide de 30- 65 μm , el núcleo mide de 5- 6.5 μm . Por su parte el quiste puede ser circular, oval, reniforme o piriforme, usualmente mide de 12.5 – 21 μm , excluyendo la capa externa que puede ser pegajosa.

***Dactylamoeba stella* Schaeffer, 1926:** Presenta largas microescalas con una estructura como cesta, no presenta espigas terminales; la longitud de la ameba varia enormemente entre las cepas, puede estar entre los 20- 120 μm . Las formas flotantes usualmente con pseudópodos doblados, cuya longitud puede superar dos veces el diámetro de masa central, sus núcleos miden de 4- 13 μm ; usualmente es elongada, lobulada, pero no con cuerpo parietal y frecuentemente da la apariencia de ser binucleada.



a: Trofozoíto
b: Quiste

Anexo III. *Legionella* spp.

Muestras negativas para crecimiento de bacterias del género *Legionella*.

T1Na	T9Ec	R2Ec	R26TI	R30Gu	R34Ec	C6Ec	C23Ec	G12Na	P2Ec
T6Ec	T19Na	R9Ec	R27Ec	R31Cu	R35Co	C7Ec	C24Ec	AT4Gu	
T7Na	T20TI	R10Co	R28Ix	R32Gu	C3Ix	C21At	G10Gu	AT5Gu	
T8TI	T21Ec	R25Ec	R29Na	R33Ec	C5Na	C22Ec	G11Na	AT6GU	

Muestras positivas para crecimiento de *Legionella* spp.

T2Na	T17TI	R13Gu	R24TI	C15Ec	G6Ec
T3Na	T18Ec	R14Ix	C1Ec	C16Ec	G7Na
T5Na	R1Ec	R15At	C2Ec	C17Gu	G8Na
T4Na	R3Ix	R16Az	C4Ix	C18Na	G9TI
T10Na	R4Ix	R17Gu	C8Ec	C19TI	AT1
T11Na	R5Ix	R18Na	C9Ix	C20Cu	AT2
T12Na	R6Ix	R19Ec	C10Na	G1Na	AT3
T13Na	R7Ix	R20Ec	C11Ec	G2Ec	A1Ec
T14Na	R8Na	R21Na	C12Gu	G3Na	P1Ix
T15Na	R11Ec	R22Ec	C13Ec	G4Ec	
T16Na	R12Ec	R23Na	C14Na	G5Na	

Anexo IV. Datos fisicoquímicos de cada una de las muestras obtenidas

Muestra	AVL	Legionella spp.	Temperatura	pH	Conductividad ms/ cm ³	Delegación/ Municipio
T1Na	+	-	18 °C	8.0	0.61	Naucalpan, Edo. de México
T2Na	+	+	18 °C	7.33	0.79	Naucalpan, Edo. de México
T3Na	+	+	18 °C	8.22	0.67	Naucalpan, Edo. de México
R1Ec	+	+	34 °C	8.0	0.50	Ecatepec, Edo. de México
R2Ec	+	-	30 °C	7.22	0.79	Ecatepec, Edo. de México
C1Ec	+	+	20 °C	8.0	0.46	Ecatepec, Edo. de México
C2Ec	+	+	19 °C	7.25	0.52	Ecatepec, Edo. de México
C3Ix	+	-	21 °C	8.2	0.34	Ixtapaluca, Edo. de México
R3Ix	+	+	32 °C	8.49	0.46	Ixtapaluca, Edo. de México
R4Ix	+	+	30 °C	7.33	0.28	Ixtapaluca, Edo. de México
P1Ix	+	+	20 °C	8.22	0.41	Ixtapaluca, Edo. de México
C4Ix	+	+	21 °C	7.67	0.41	Ixtapaluca, Edo. de México
R5Ix	+	+	29 °C	7.20	0.17	Ixtapaluca, Edo. de México
R6Ix	+	+	28 °C	8.43	0.42	Ixtapaluca, Edo. de México
R7Ix	-	+	27 °C	8.03	0.33	Ixtapaluca, Edo. de México
R8Na	+	+	23 °C	7.67	0.28	Naucalpan, Edo. de México
G1Na	+	+	23 °C	7.67	0.11	Naucalpan, Edo. de México
C5Na	+	-	17 °C	7.89	0.28	Naucalpan, Edo. de México
C20Cu	+	-	22 °C	8.42	0.60	Cuautitlán Izcalli
R9Ec	+	-	27 °C	8.34	0.61	Ecatepec, Edo. de México
T5Na	+	+	20 °C	7.92	0.67	Naucalpan, Edo. de México
G2Ec	+	+	25 °C	7.88	0.34	Ecatepec, Edo. de México
R10Co	+	-	27 °C	8.16	0.79	Coacalco
R11Ec	+	+	27 °C	8.49	0.52	Ecatepec, Edo. de

						México
R12Ec	-	+	28 °C	8.34	0.41	Ecatepec, Edo. de México
R13Gu	+	+	29 °C	8.15	1.17	Gustavo A. Madero
C6Ec	+	-	24 °C	8.32	0.46	Ecatepec, Edo. de México
T6Ec	+	-	26 °C	8.44	0.53	Ecatepec, Edo. de México
C7Ec	+	-	26 °C	8.33	0.56	Ecatepec, Edo. de México
A1Ec	+	+	21 °C	8.17	0.46	Ecatepec, Edo. de México
T7Na	+	-	25 °C	8.15	0.72	Naucalpan, Edo. de México
T8TI	+	-	26 °C	7.94	0.17	Tlalnepantla, Edo. de México
T17TI	+	+	26 °C	7.95	0.17	Tlalnepantla, Edo. de México
T9Ec	+	-	24 °C	7.94	0.17	Ecatepec, Edo. de México
T4Na	-	+	25 °C	8.40	0.65	Naucalpan, Edo. de México
C8Ec	-	+	19 C	8.44	0.42	Ecatepec, Edo. de México
R25Ec	-	-	27 °C	7.20	0.52	Ecatepec, Edo. de México
R26TI	-	-	29 °C	8.22	0.42	Tlalnepantla, Edo. de México
R27Ec	-	-	28 °C	6.40	0.46	Ecatepec, Edo. de México
R14Ix	-	+	29 °C	8.21	0.39	Ixtapaluca, Edo. de México
R28Ix	-	-	30 °C	8.44	0.43	Ixtapaluca, Edo. de México
C9Ix	-	+	20 °C	7.78	0.63	Ixtapaluca, Edo. de México
Au1Gu	-	+	22 °C	7.2	3.33	Gustavo A. Madero
Au2Gu	-	-	21 °C	6.7	3.12	Gustavo A. Madero
Au3Gu	-	-	23 °C	7.7	1.22	Gustavo A. Madero
Au4Gu	-	+	21 °C	7.8	2.14	Gustavo A. Madero
T10Na	-	+	24 °C	7.95	0.21	Naucalpan, Edo. de México
C10Na	-	+	22 °C	7.78	0.27	Naucalpan, Edo. de México

R29Na	-	-	34 °C	8.14	0.32	Naucalpan, Edo. de México
G3Na	-	+	17 °C	7.60	0.26	Naucalpan, Edo. de México
C21At	-	-	18 °C	7.81	0.30	Atizapán de Zaragoza
R15At	-	+	32 °C	7.81	0.30	Atizapán de Zaragoza
C11Ec	-	+	22 °C	8.37	0.64	Ecatepec, Edo. de México
C12Gu	-	+	21 °C	7.95	0.97	Gustavo A Madero, D.F
R30Gu	-	-	29 °C	8.28	0.97	Gustavo A Madero, D.F
R16Az	-	+	29 °C	8.16	0.32	Azcapotzalco
R31Cu	-	-	30 °C	8.36	0.38	Cuautitlán Izcalli
R17Gu	-	+	28 °C	8.24	1.08	Gustavo A Madero, D.F
R18Na	-	+	30 °C	6.30	0.33	Naucalpan, Edo. de México
GA1Na	-	+	24 °C	7.00	0.33	Naucalpan, Edo. de México
G4Ec	-	+	25 °C	8.06	0.32	Ecatepec, Edo. de México
T11Na	-	+	26 °C	7.90	0.37	Naucalpan, Edo. de México
G5Na	-	+	24 °C	7.93	0.33	Naucalpan, Edo. de México
G6Ec	-	+	24 °C	7.81	0.22	Ecatepec, Edo. de México
C22Ec	-	-	21 °C	8.31	0.56	Ecatepec, Edo. de México
R19Ec	-	+	28 °C	8.31	0.56	Ecatepec, Edo. de México
C13Ec	-	+	21 °C	8.47	0.63	Ecatepec, Edo. de México
C23Ec	-	-	23 °C	8.46	0.83	Ecatepec, Edo. de México
R20Ec	-	+	30 °C	8.05	0.76	Ecatepec, Edo. de México
T19Na	-	-	25 °C	8.26	0.72	Naucalpan, Edo. de México
T12Na	-	+	26 °C	8.25	0.65	Naucalpan, Edo. de México
R21Na	-	+	30 °C	8.25	0.62	Naucalpan, Edo. de México
G7Na	-	+	25 °C	8.36	0.34	Naucalpan, Edo. de México

T14Na	-	+	18 °C	7.93	0.28	Naucalpan, Edo. de México
C14Na	-	+	22 °C	8.40	0.49	Naucalpan, Edo. de México
G8Na	-	+	24 °C	7.96	0.21	Naucalpan, Edo. de México
T15Na	-	+	25 °C	8.15	0.15	Naucalpan, Edo. de México
R22Ec	-	+	30 °C	8.23	0.88	Ecatepec, Edo. de México
C15Ec	-	+	22 °C	8.11	0.56	Ecatepec, Edo. de México
R32Gu	-	-	29 °C	8.17	1.13	Gustavo A. Madero
R33Ec	-	-	30 °C	8.19	0.47	Ecatepec, Edo. de México
C16Ec	-	+	17 °C	8.23	0.43	Ecatepec, Edo. de México
G10Gu	-	-	23 °C	7.68	0.06	Gustavo A. Madero
C17Gu	-	-	22 °C	8.39	1.17	Gustavo A. Madero
R23Na	-	-	28 °C	7.48	0.72	Naucalpan, Edo. de México
G11Na	-	-	25 °C	8.08	0.36	Naucalpan, Edo. de México
C18Na	-	-	24 °C	7.84	0.80	Naucalpan, Edo. de México
T16Na	-	-	26 °C	7.73	0.77	Naucalpan, Edo. de México
G12Na	-	-	25 °C	7.84	0.65	Naucalpan, Edo. de México
R34Ec	-	-	30 °C	8.34	0.66	Ecatepec, Edo. de México
R35Co	-	-	27 °C	8.16	0.79	Coacalco
P2Ec	-	-	25 °C	8.18	0.84	Ecatepec, Edo. de México
T17TI	-	+	26 °C	7.95	0.17	Tlalnepantla, Edo. de México
T20TI	-	-	26 °C	8.12	0.17	Tlalnepantla, Edo. de México
C19TI	-	+	23 °C	8.13	0.21	Tlalnepantla, Edo. de México
R24TI	-	+	29 °C	7.87	0.27	Tlalnepantla, Edo. de México
G9TI	-	+	25 °C	8.35	0.32	Tlalnepantla, Edo. de México
C24Ec	-	-	26 °C	8.26	0.63	Ecatepec, Edo. de México

T21Ec	-	-	26 °C	8.41	0.78	Ecatepec, Edo. de México
T18Ec	-	+	26 °C	8.50	0.78	Ecatepec, Edo. de México