



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**Detección de amibas de vida libre aisladas de
hospitales regionales de la Sierra Norte y los Valles
Centrales del estado de Oaxaca**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

KAREN CASTRO DÍAZ



DIRECTORA DE TESIS:

D. en C. Elvia Manuela Gallegos Neyra

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

A mamá por estar siempre presente, a lo largo de mi carrera y de mi vida, brindando un apoyo incondicional a pesar de cualquier adversidad que se pudiera presentar, gracias por apoyarme en ésta decisión hasta el final y motivarme a seguir adelante, te amo mamá y te dedico mi trabajo y mi título porque sin ti no hubiera llegado a cumplir éste logro en mi vida.

Al profesor Arturo Calderón, gracias por haberme recibido con los brazos abiertos en su laboratorio y adoptarme como su hija académica, gracias por enseñarme con paciencia las técnicas, brindarme todo el material de apoyo y depositar toda su confianza en mí, gracias por ayudarme a darle un enfoque distinto a todo, disfrutando de los pequeños momentos de la vida, gracias por la amistad que me brindó y su apoyo hasta el último momento, siempre lo recordaré con mucho respeto y cariño.

Enseñarás

Enseñarás a volar
pero no volarán tu vuelo.

Enseñarás a soñar,
pero no soñarán tu sueño.

Enseñarás a vivir,
pero no vivirán tu vida.

Pero sabrás que cada vez que ellos
vuelen, piensen, sueñen, canten, vivan...

Estará la semilla del camino
enseñado y aprendido.

Madre Teresa de Calcuta

Agradecimientos

Gracias a mi pequeña familia, por apoyarme incondicionalmente, por estar presentes y ayudarme siempre en lo que podían, las amo mucho Dannya, abuelita , mamá y papá , sin ustedes no lo hubiera logrado.

Le agradezco mucho a mi directora de tesis Dra. Elvia Gallegos Neyra, por haberme adoptado junto con el profesor Arturo como mis padres académicos en mi segunda casa que es la Universidad, gracias su apoyo incondicional, su paciencia y su motivación durante mi estancia en el laboratorio y fuera de él, gracias por el cariño y su amistad a lo largo de todo ese tiempo, es invaluable el conocimiento que me brindo de manera directa e indirecta, las experiencias y los buenos momentos, muchas gracias Doctora.

A mis sinodales: profesora Blanca Nieves Martínez Rodríguez, Dra. María del Rosario Sánchez Rodríguez, Maestra María de los Ángeles Sanabria Espinoza y la Dra. Itzel Sigala Regalado por su tiempo para atender mis dudas, por sus comentarios y sugerencias para la elaboración del presente escrito.

Al profesor Luis Fernando por su asistencia técnica en el laboratorio.

A mis amistades que más que eso son la familia que elegí, gracias por estar siempre presentes y apoyarme, familia Torres Flores y familia Hernández Santiago.

A mi mejor amiga Ana por estar siempre para apoyarme, acompañarme y brindarme su amistad.

A mis compañeros que estuvieron a lo largo de mi larga carrera, a los que se convirtieron en mis amigos, biolocos, del 52 gracias por las experiencias vividas, las aventuras, la amistad y los buenos momentos y el apoyo brindado durante todo ese tiempo, los quiero mucho amigos.

Contenido

RESUMEN	5
I. INTRODUCCIÓN.....	6
1. Amibas de vida libre	6
1.1 Características generales de las amibas de vida libre	6
1.2 Ecología de AVL.....	7
1.3 Taxonomía	8
1.4 Ciclo de vida.....	9
1.5 Morfología de las amibas de vida libre.....	11
1.5.1 Trofozoíto	11
1.5.2 Quiste.....	11
1.6 Amibas de vida libre con importancia médica	12
1.6.1.1 <i>Acanthamoeba</i> spp.....	12
1.6.1.2 Grupos principales de <i>Acanthamoeba</i>	14
1.6.2 <i>Naegleria fowleri</i>	15
1.6.3 <i>Balamuthia mandrillaris</i>	17
1.6.4 <i>Sappinia pedata</i>	19
1.6.5 <i>Hartmannella</i>	19
1.7 Factores de patogenicidad	20
1.7.1 Endosimbiontes	20
1.7.2 Factores de virulencia	21
II. ANTECEDENTES	23
III. JUSTIFICACIÓN	26
IV. OBJETIVOS.....	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos particulares.....	27
V. ÁREAS DE ESTUDIO	28
5.1 Ubicación y características de las áreas de estudio.....	28
5.2 Valles centrales	29
5.4 Sierra Norte	30
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	32
6.1 Trabajo de campo.....	32
6.1.1 Recolecta y transporte de muestras	32

6.2 Registro de parámetros fisicoquímicos del agua <i>in situ</i>	33
6.3 Trabajo de laboratorio.....	33
6.3.1 Aislamiento y cultivo.....	33
6.3.2 Clonación	33
6.3.3 Identificación morfológica de las amibas de vida libre.....	34
6.3.4 Medición de quistes y trofozoítos.....	34
6.3.5 Pruebas de tolerancia a la temperatura	34
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
7.1 Aislados amibianos	36
7.1 Identificación taxonómica del género <i>Acanthamoeba</i>	42
7.2 Distribución de AVL en los sitios muestreados	44
7.3 Parámetros fisicoquímicos de los sistemas hídricos intrahospitalarios muestreados	48
7.4 Temperatura del agua	48
7.5 Cloro libre residual.....	48
7.6 pH.....	49
7.7 Taxonomía	50
7.8 Registro fotográfico de las amibas de vida libre.....	50
7.9 Descripción	50
VIII. CONCLUSIONES	59
IX. RECOMENDACIONES	61
X. BIBLIOGRAFÍA.....	62
XI. ANEXOS.....	72
Anexo 1. Medio de cultivo para amibas de vida libre.....	72
Anexo 2. Preparación de <i>Enterobacter aerogenes</i>	73
Anexo 3. Norma oficial mexicana NOM-045-SSA2-2005.Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales	74

RESUMEN

La información recabada del estudio de la diversidad de las AVL presentes en hospitales del mundo y en particular en México es muy escasa, lo cual resulta complicado el estudio ya que no se tiene un método estandarizado para la recolección de muestras, el aislamiento y la posterior identificación de las AVL.

El presente estudio se realizó en el mes de febrero del 2014, en el estado de Oaxaca, donde se obtuvieron un total de 40 muestras de agua y biopelículas, tomadas de dos hospitales de la región Sierra Norte y dos hospitales de la región de los Valles Centrales, del total de las muestras recolectadas se encontraron 12 muestras positivas, de las que se obtuvieron aislados amibianos, los cuales pertenecen a 12 géneros: *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Gocevia*, *Hartmannella*, *Leptomyxa*, *Naegleria*, *Paratetramitus*, *Rosculus*, *Saccamoeba*, *Stachyamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella*.

De las muestras positivas *Acanthamoeba* fue el organismo predominante sobre los demás géneros (37 %), seguido de *Naegleria* (19 %) y *Vahlkampfia* (17 %). Cabe mencionar que los primeros dos géneros más frecuentes son de importancia médica y se han descrito como organismos patógenos para el ser humano.

Además, se identificaron las zonas intrahospitalarias como el área de quirófanos: mesa de cirugía, regaderas de pacientes, aire acondicionado, nebulizadores y sistemas hídricos: agua de cisternas, agua de grifo, agua de regaderas de pacientes, con presencia de amibas de vida libre potencialmente patógenas, donde las zonas con mayor población de AVL fueron: el aire acondicionado, seguido de nebulizadores, sistemas hídricos y mesa de instrumental quirúrgico.

En conclusión, se demostró la presencia de AVL en distintas zonas nosocomiales, lo que es preocupante, sobre todo en las muestras obtenidas de nebulizadores, ya que si el análisis de estas amibas mostrara que son patógenas, ello implicaría un riesgo muy alto para la salud aún más en aquellos casos de pacientes con inmunodepresión, lo que implicaría un mayor riesgo de infección, sin embargo, aunque estas AVL no fueran patógenas se debe tomar en cuenta el factor de que éstas sirven como reservorios para otros patógenos como bacterias, virus y otros microorganismos.

I.INTRODUCCIÓN

1. Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos, que pertenecen según la nueva clasificación propuesta por Adl y colaboradores (2005) a los super-grupos: Amoebozoa, Excavata y Rhizaria. Estos organismos tienen la capacidad de existir en la naturaleza y en el caso de algunos géneros tienen la capacidad de invadir a un hospedero por lo cual a estos se les han denominado como organismos anfitriónicos (Martínez, 1985; Page, 1988; Martínez y Visvesvara, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004; Visvesvara y McGuire, 2006). Las AVL son organismos cosmopolitas que habitan ambientes húmedos y se pueden encontrar en suelo, en agua y en aire, vehículo que utilizan como medio de dispersión (Bonilla *et al.*, 2001). El estudio de las amibas de vida libre ha demostrado que son un grupo de gran importancia ecológica y médica.

1.1 Características generales de las amibas de vida libre

Éste supergrupo presenta pseudópodos no eruptivos llamados lobópodos, típicos de la mayoría de las amibas, que son anchos y con puntas redondas o achatadas, suelen ser tubulares y están formados por endoplasma y ectoplasma a la vez; y filópodos que se observan en algunas amibas pequeñas, que pueden ser ramificados, en los que las puntas tienden a ser aguzadas y están formados exclusivamente por ectoplasma (Barnes, 1984).

En este supergrupo de protozoos, se incluyen las gimnamebas o amibas desnudas y un número importante de las amibas testadas, cuyo citoplasma se encuentra encerrado dentro de una cubierta (proteínica, aglutinada, silíceo o calcárea), de la cual emergen los pseudópodos (Page, 1974, 1976a; Ogden y Hedley, 1980; Lee *et al.*, 1985; Visvesvara y Stehr-Green, 1990; Charman, 1999; Smirnov y Goodkov, 1999).

El tamaño de las amibas de vida libre varía en gran medida pero su naturaleza unicelular limita la talla que llegan a alcanzar. La mayoría de las especies de gimnamebas en su fase trófica tienen tamaños con un intervalo de 6 a 30 μm y en su fase quística de 6 a 20 μm , aproximadamente (Barnes, 1984).

Pueden encontrarse en biopelículas, las cuales son una comunidad bacteriana inmersa en un medio semisólido, caracterizado por contener bacterias y otros tipos de organismos como algas, hongos y virus que se hallan unidos a un substrato o superficie, o unas a otras, que se encuentran embebidas en una matriz extracelular producida por ellas mismas, y que muestran un fenotipo alterado en cuanto al grado de multiplicación celular o la expresión de sus genes (Costerton *et al.*, 1987).

1.2 Ecología de AVL

Las AVL presentan en general una distribución cosmopolita y son ubicuas en la naturaleza. Su hábitat principal es el suelo y desde ahí pueden llegar a los cuerpos de agua arrastradas por escurrimientos o a través del aire (Rivera *et al.*, 1993; Bonilla, 2015).

En el agua, las amibas desempeñan un papel fundamental en el flujo energético y en el reciclado de los nutrimentos. Los cuerpos de agua son un enlace fundamental entre desintegradores y niveles tróficos superiores, convirtiendo las AVL en un eslabón importante en el circuito microbiano acuático (Fenchel, 1987). Las especies patógenas se observan más frecuentemente en cuerpos de agua con temperaturas mayores a los 30 °C y aguas naturales de los trópicos y subtrópicos. En países templados y fríos las amibas patógenas proliferan mejor durante los meses más cálidos, lo que lleva a pensar en un patrón estacional (Rondanelli, 1987; Rivera *et al.*, 1993). Algunos investigadores, han propuesto que el incremento brusco de temperatura más que una temperatura elevada constante es lo que realmente favorece la predominancia de *Naegleria fowleri* (Pernin *et al.*, 2001). Las especies de AVL patógenas son termotolerantes, aunque no todas las termotolerantes son patógenas (Martínez, 1985).

Las AVL son más frecuentes en cuerpos de agua con temperatura por arriba de los 25° C, con niveles óptimos de oxígeno, pH cercano a la neutralidad, alimento suficiente (bacterias y materia orgánica) y un mínimo de humedad; sin embargo, pueden soportar variaciones amplias en cualquiera de los parámetros anteriormente mencionados (Gallegos, 2001).

En la parte del suelo, las AVL se encuentran en mayor proporción en la microcapa superficial, así como en las hojas desprendidas o sobre las plantas con un alto grado de adaptación debido a la abundancia de nutrientes y al establecimiento de quistes aéreos (Kyle *et al.*, 1986; Sigala, 2008).

1.3 Taxonomía

Desde la clasificación propuesta por la Sociedad de Protozoólogos (Levine *et al.*, 1980), se han hecho muchos cambios para el entendimiento del linaje de los eucariontes.

Como resultado de estos cambios, Simpson y Roger (2002, 2004) y Adl en 2005 (sistema aprobado por la “*International Society of Protistologists*”) proponen un esquema de clasificación con énfasis en los organismos protistas en donde reconocen taxones que están evolutivamente relacionados y al resto los agrupan parafileticamente.

Como se puede ver en el cuadro uno, el grupo de los eucariontes que se divide en seis grupos filogenéticos:

Cuadro 1. Clasificación de los eucariontes con énfasis en los súper grupos con representantes amébidos (Adl *et al.*, 2005)

Super-grupos	Primer rango	Segundo rango
Amoebozoa	Tubulinea	Leptomyxida
	Flabellinea	Tubulinida
	Stereomyxida	Dactylopodia
	Acanthamoebidae	Vannellida
	Entamoebida	Testacealobosia
	Mastigamoebidae	Cochliopodium
	Pelomyxa	Thecamoebida
	Excavata	Fornicata
Malawimonas		
		Cristamonadida,Spirotrichonymphida,Trichomonadida,
Parabasalia		Trichonymphida
Preaxostyla		Oxymonadida, Trimastix
Jakobida		Histionidae, Jakoba

	Heterolobosea	Acrasidae, Gruberellidae, Vahlkampfiidae
	Euglenozoa	Euglenida, Diplonemea, Kinetoplastea
Rhizaria	Cercozoa	Cercomonadida, Chlorarachniophyta, Nucleochelea, Phaeodarea, Phytomyxea, Silicofilosea
	Haplosporidia	
	Foraminifera	
	Gromia	
	Radiolaria	Acantharia, Polycystinea, Sticholonche

En la clasificación con énfasis en los organismos protistas, no se cuenta con designaciones de rango formal como “clase”, “subclase”, “orden”, etc. la decisión de que esto fuera así es para hacerlo más útil y evitar el problema común de que un solo cambio cause una cascada de cambios en el sistema, lo cual hace que este sistema sea más fácil de modificar.

1.4 Ciclo de vida

El ciclo de vida de las AVL (Fig. 1) comprende una fase activa llamada trofozoíto y una forma quística o de latencia; presentándose además en el caso del género *Naegleria*, una forma flagelada, un estadio temporal en el que el organismo no se alimenta ni se reproduce, sólo le sirve para desplazarse a un mejor microambiente. (Bottone, 1993; John, 1993). La forma de quiste es la fase de resistencia en la cual puede permanecer largos períodos en condiciones adversas como: la desecación, concentraciones bajas de oxígeno, escasez de alimento, etc. (John, 1993). Se sabe que en este estadio estos organismos pueden ser resistentes a varios tratamientos de desinfección (Lloyd *et al.*, 2001; Greub y Raoult, 2004; Thomas *et al.*, 2008). La forma activa para estos organismos es la llamada forma de trofozoíto en la cual las amibas se alimentan y reproducen (John, 1993; Marciano *et al.*, 2003).

Tras un periodo de crecimiento, la amiba se reproduce por fisión binaria asexual (mitosis) dando lugar a dos células hijas idénticas (clones) o por fragmentación del plasmodio.

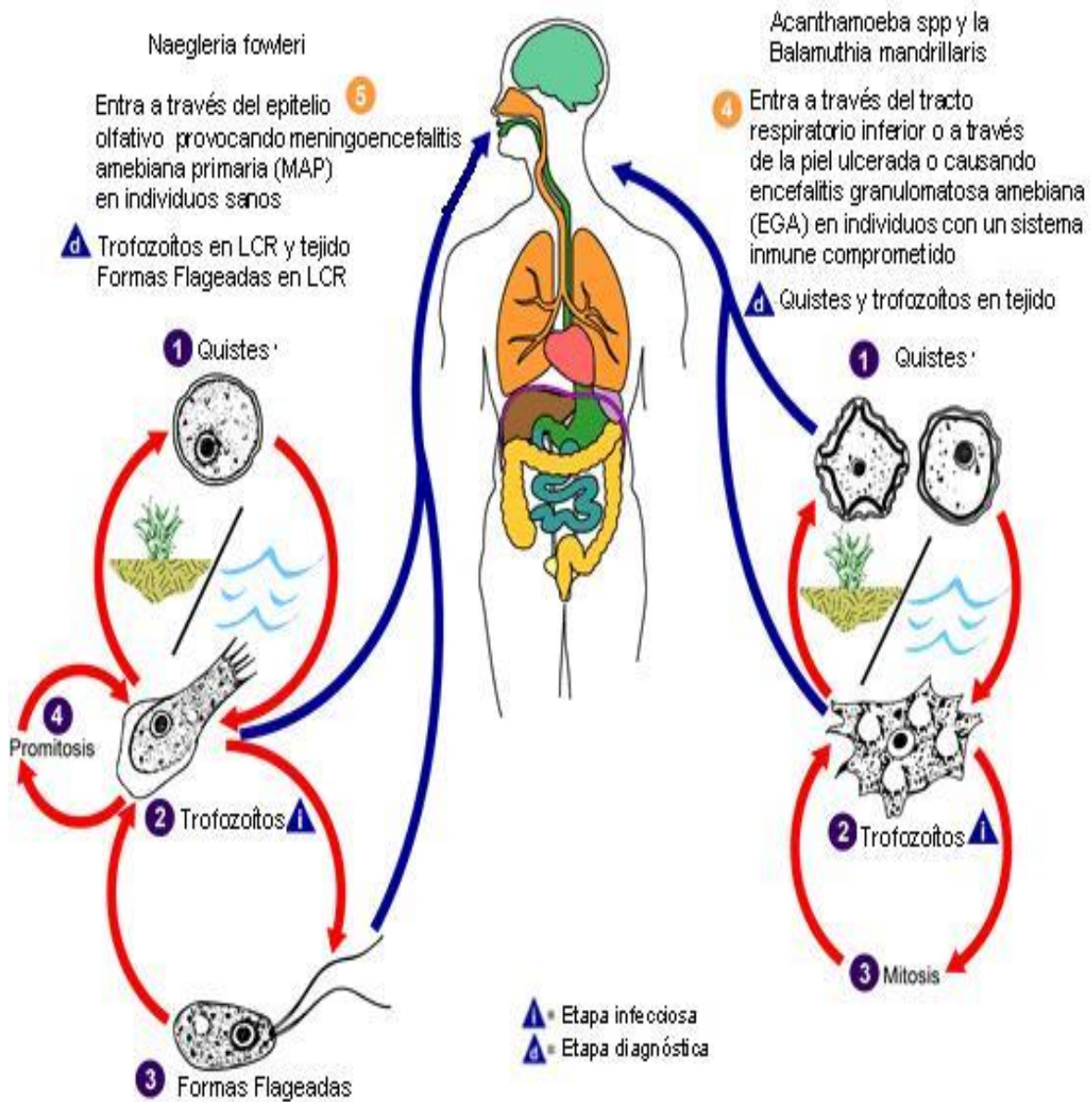


Figura 1. Ciclo de vida en el que se incluye a *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp. y *Balamuthia mandrillaris*, con sus tres fases: trofozoito, quiste y ameboflagelado.(CDC,2013)

1.5 Morfología de las amibas de vida libre

1.5.1 Trofozoíto

El trofozoito de una AVL es la forma invasiva, tiene un diámetro de 10 a 60 μm (intervalo más frecuente 12-15 μm), forma alargada, un núcleo con endosoma central y cromatina periférica fina, distribuída regularmente. Presenta movilidad direccional, progresiva, mediante la emisión de pseudópodos digitiformes explosivos. En el extremo posterior del organismo se encuentra el uroide, que contiene el motor de actina/miosina, el cual impulsa a la amiba hacia adelante. Tras el desenquistamiento, en la forma de trofozoíto con cuatro núcleos, da lugar a ocho trofozoítos uninucleados. La multiplicación se lleva a cabo por fisión binaria (Fig.2)

1.5.2 Quiste

Los quistes presentan una variación morfológica entre cada género y especie de AVL y ésta variación permite identificarlas taxonómicamente, algunos quistes maduros presentan doble pared, lo que les confiere una mayor resistencia a las adversidades que le pueda generar el ambiente.

El quiste se compone de dos partes: ectoquiste y endoquiste. El ectoquiste posee una forma irregular que contiene proteínas y lípidos, y el endoquiste está compuesto principalmente de celulosa y puede tener distintas formas: esférica, hexagonal o poligonal, además de presenta poros u ostiolas, los cuales son conexiones cóncavo convexas que unen ambas partes y es por donde la amiba exquista (Visvesvara *et al.*, 2007; Khan, 2009).

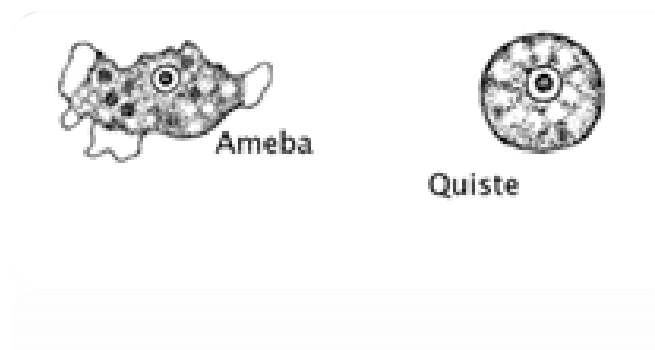


Figura 2. Morfología general de un trofozoito y quiste de amiba

1.6 Amibas de vida libre con importancia médica

El estudio de las amibas de vida libre ha demostrado que son un grupo de protozoos de gran importancia ecológica y médica, del total de especies conocidas sólo un grupo pequeño provoca infecciones humanas incluyendo a los géneros: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia* y *Hartmannella* (Martínez, 1985; De Jonckheere, 1978; Kilvington *et al.*, 1991a; John, 1993; Visvesvara *et al.*, 1993; Centeno *et al.*, 1996; Martínez y Visvesvara, 1997; Khan, 2009; Schuster y Visvesvara, 2004; Lorenzo- Morales, 2010).

Estos organismos son capaces de provocar infecciones en el sistema nervioso central (SNC) como la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) que ocasiona la muerte en el lapso de tres a siete días causada sólo por *Naegleria fowleri*, o encefalitis granulomatosa amibiana crónica (EAG) provocada por algunas especies del género *Acanthamoeba*, que pueden ocasionar la muerte en períodos mayores. *Acanthamoeba* también pueden provocar infecciones muy severas en otros órganos como son pulmón, piel, ojos y oídos (Martínez, 1985; Kilvington *et al.*, 2004; Marciano-Cabral *et al.*, 2003).

Además de su potencial patógeno sobre los humanos, las amibas de vida libre (AVL) son capaces de parasitar a organismos de casi todos los grupos zoológicos y de tener asociaciones endosimbióticas con bacterias patógenas para el humano (John, 1993; Greub y Raoult, 2004).

1.6.1.1 *Acanthamoeba* spp.

El trofozoíto de *Acanthamoeba* mide entre 24 y 56 μm , se caracteriza por presentar pseudópodos finos llamados acantópodos. Se divide por fisión binaria por medio de una mitosis. El quiste mide entre 11 y 25.3 μm de diámetro, presenta una pared doble y poros en la unión del ectoquiste y el endoquiste (Fig.3

Varias especies de *Acanthamoeba* infectan a los humanos, incluyendo: *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. astronyxis*, *A. hatchetti*, *A. rhyodes*, *A. divionensis*, *A. lugdunensis* y *A. lenticulata*, las cuales están implicadas en la causa de alguna enfermedad humana.

Acanthamoeba, es una amiba oportunista capaz de producir encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) o acantamebiasis, una enfermedad subaguda o crónica. Se presenta en individuos inmunosuprimidos o inmunodeficientes, como alcohólicos crónicos, embarazadas, VIH positivos, enfermos con SIDA, con lupus eritematoso sistémico o cáncer (Martínez y Visvesvara, 1997). Las lesiones que produce esta amiba son de tipo granulomatosas, encontrándose en ellas trofozoítos y quistes. Otra infección que provoca es la Queratitis Amebiana (QA) la cual es más frecuente en individuos sanos que utilizan algún tipo de lente de contacto o con menor frecuencia en pacientes inmunosuprimidos. Esta, es una inflamación crónica en la córnea que puede causar la pérdida del ojo. Las amibas invaden el estroma corneal por una solución de continuidad del epitelio, el organismo es capaz de lograr la patología aun sin un traumatismo menor o abrasión previa de la córnea (Omaña, 2011). *Acanthamoeba*, se encuentra distribuida en todos los ambientes y probablemente es la amiba con mayor distribución en la naturaleza, debido a la gran resistencia de sus quistes (Page, 1988; Armstrong, 2000).

Acanthamoeba es una amiba oportunista capaz de causar encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) en personas con sistemas inmunes comprometidos. Las lesiones que produce *Acanthamoeba* son granulomatosas, encontrándose en ellas trofozoítos y quistes. Presenta dos fases morfológicas en su ciclo de vida: trofozoíto y quiste. 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 es la etapa infecciosa. Los quistes son inactivos y protegen al organismo de ambientes nocivos (Da Rocha et al., 2009).

Los géneros de AVL *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria fowleri*, son los agentes etiológicos de casos clínicos mejor descritos a nivel mundial.

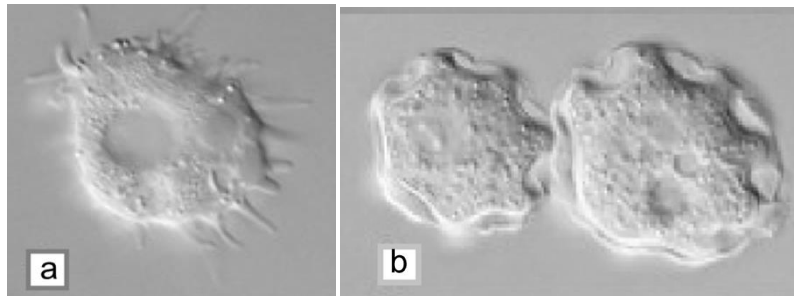


Figura 3. *Acanthamoeba* spp.: a) trofozoíto b) quiste (John, 1993).

1.6.1.2 Grupos principales de *Acanthamoeba*

Para su mejor identificación, Pussard y Pons (1977) dividieron a las especies de *Acanthamoeba* en tres grupos según el tamaño y las características morfológicas de sus quistes.

Grupo I caracterizado por quistes grandes ($>18 \mu\text{m}$) con endoquiste estrellado y ectoquiste esférico (*A. astronyxis*, *A. comandoni*, *A. echinulata*, y *A. tubiashi*). Grupo II, quistes más pequeños ($<18 \mu\text{m}$), endoquiste poligonal y ectoquiste arrugado (*A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes* y *A. triangularis*) y Grupo III, con quistes pequeños ($<18 \mu\text{m}$), endoquiste redondo o suavemente angular y ectoquiste ligeramente arrugado (*A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. palestinesis*, *A. pustulosa* y *A. royreba*). (Fig. 4) (Pussard y Pons, 1977).

Los trofozoítos tienen una forma irregular, se mueven con movimientos cortos por medio de sus lobópodos, los quistes siempre con dos paredes y distintas separaciones en todas las especies; ectoquiste a menudo corrugado; endoquiste redondeado, angular o estrellado, con varios poros de desenquistamiento en los ángulos; opérculo persistente. No poseen un estado flagelar (B. Robinson, 1992).

En la figura 4, podemos observar los principales grupos de *Acanthamoeba* clasificados según su morfología.

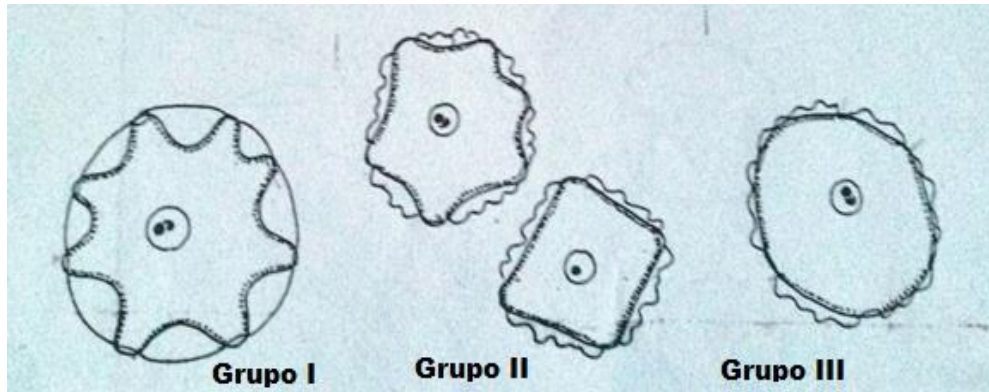


Figura 4. Clasificación de los quistes de amibas en base a características morfológicas en grupos I, II y III (B. Robinson, 1992).

1.6.2 *Naegleria fowleri*

El trofozoíto de *Naegleria* presenta una forma alargada característica, se conoce como amiba “limax”, mide entre 15 y 25 μm ; su locomoción es por medio de lobópodos. Se reproduce por fisión nuclear. El quiste es esférico mide de 8 a 12 μm de diámetro, con una pared doble lisa.

Sólo una especie de *Naegleria*, *Naegleria fowleri* es el agente causal de enfermedad para el ser humano, es un parásito facultativo con un crecimiento favorecido 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).

Naegleria fowleri causa una infección aguda que afecta al sistema nervioso central (SNC) llamada MEAP o naegleriosis. La ruta de invasión de *N. fowleri* es a través de la aspiración por las fosas nasales del agua contaminada, invadiendo la mucosa olfatoria, el nervio olfatorio, la lámina cribiforme, para llegar al espacio subaracnoideo. La enfermedad se caracteriza por presentarse los siguientes síntomas: cefalea intensa, fotofobia, fiebre, náusea, vómito en proyectil y rigidez de cuello; coma, convulsiones y finalmente la muerte. La mayoría de los pacientes mueren en la primera o segunda semana después de la manifestación de los primeros síntomas, dependiendo del manejo y resistencia del paciente, así como de la virulencia de las amibas.

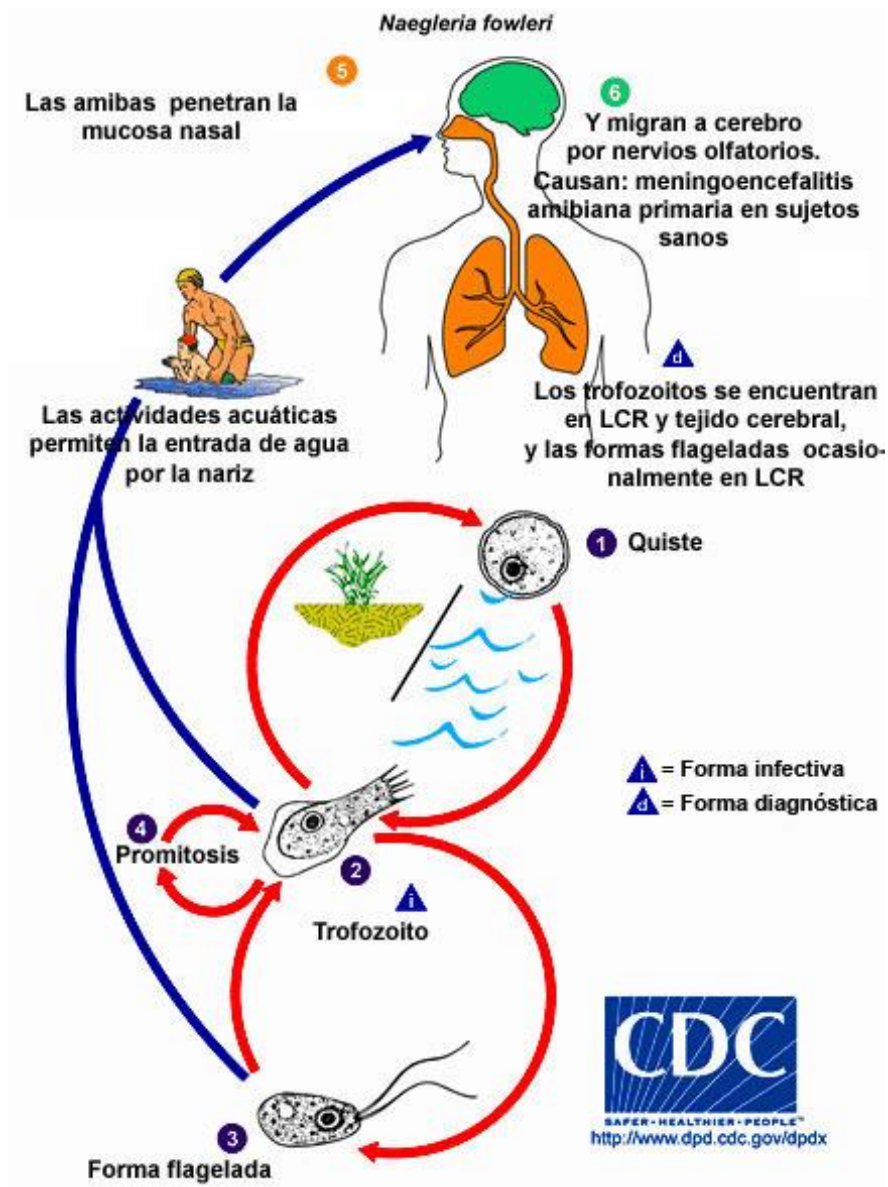


Figura 5 .Ciclo de vida de *Naegleria fowleri* con las vía de infección humana (CDC, 2013).

El ciclo de vida de *Naegleria fowleri* incluye una etapa de alimentación ameboide (trofozoíto), una de natación rápida temporal (flagelado) y un quiste.

1.6.3 *Balamuthia mandrillaris*

Balamuthia mandrillaris presenta dos fases, los trofozoítos miden 15 - 60 μm y el tamaño de los quistes es 10 - 30 μm , con una pared compuesta por tres capas, la interior ondulada, la media, fibrilar, y la exterior delgada e irregular, con proyecciones. Los trofozoítos son apreciablemente pleomórficos. Se identifican formas redondeadas, otras muy elongadas, con ramificaciones peculiares. La microscopía electrónica permite apreciar fragmentos de retículo endoplásmico rugoso en la transición entre ecto y endoplasma. El núcleo es grande y presenta un nucléolo prominente. (González-Robles et al., 2015). En ocasiones es posible identificar 2 núcleos y más de un nucléolo. En la figura cinco se puede ver el ciclo de vida de *Balamuthia mandrillaris* con sus dos fases y la vía de entrada para infectar al ser humano.

Balamuthia mandrillaris y *Acanthamoeba* spp, son organismos oportunistas capaces de producir Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) o acantamebiosis, una enfermedad subaguda o crónica. Se presenta en individuos inmunosuprimidos o inmunodeficientes.

La vía de entrada puede ser a través de los pulmones vía neuroepitelio olfativo y lesiones de la piel. Las principales manifestaciones clínicas son: dolor de cabeza, cambios de personalidad, fiebre leve, convulsiones, hemiparesia, nivel deprimido de la conciencia y coma.

El cuadro clínico puede confundirse con: tuberculosis cerebral, encefalitis viral, cáncer y absceso cerebral. El diagnóstico se hace a través de la visualización de quistes o trofozoítos en líquido cefalorraquídeo o biopsias de tejido cerebral. El cuadro producido por *B. mandrillaris* y *S. pedata* es muy similar al descrito para *Acanthamoeba*, sin embargo, no está claro si estas dos se comportan como organismos oportunistas o si son patógenos primarios letales, que no depende del estado del hospedero. La información al respecto es escasa y los cuadros observados se han presentado principalmente en individuos inmunocompetentes.

Balamuthia mandrillaris solo se puede desarrollar en cultivos de tejido y en un medio axénico tales como: cultivos de células Vero (riñón de mono verde africano) y en el medio axénico BM-3, es por esto que aún se desconoce su hábitat natural (Visvesvara et al., 1993; Gelman et al., 2001;

Schuster, 2002). Esta AVL se aisló por primera vez de un mandril y posteriormente de pacientes con EAG (Visvesvara *et al.*, 1993).

El nicho identificado de *B. mandrillaris* es el suelo; se aisló por primera vez de tierra de maceta en la casa habitación de un paciente de EAG y posteriormente en polvo de una región urbana (Schuster *et al.*, 2003; Dunnebacke *et al.*, 2004; Niyati *et al.*, 2009; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005).

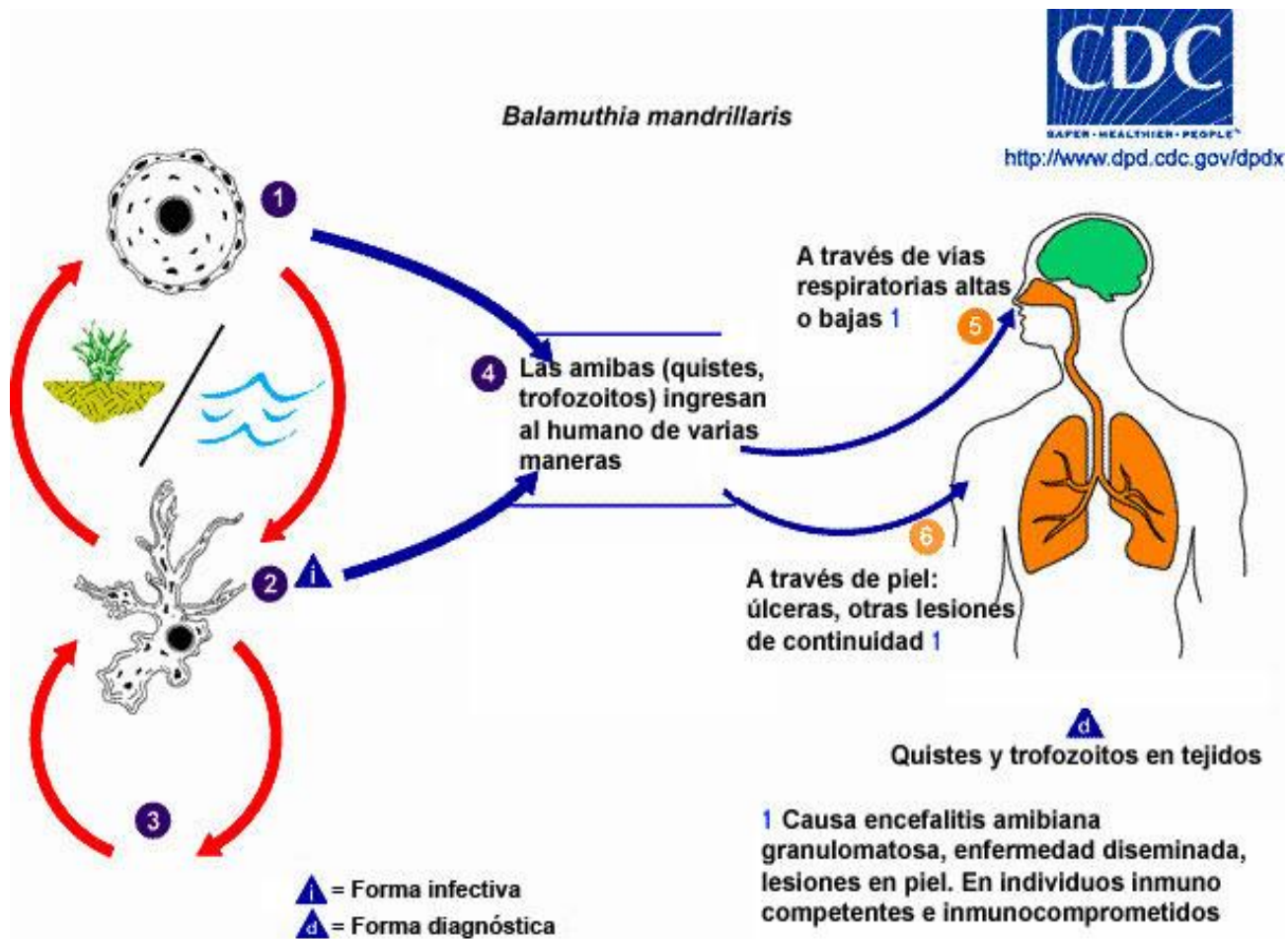


Figura 6. Ciclo de vida de *Balamuthia mandrillaris*, vía de infección en el humano. (CDC, 2013).

1.6.4 *Sappinia pedata*

Sappinia pedata puede presentar grandes núcleos vesiculados con nucléolos múltiples y periféricos. La forma pedicelada es una condición previa al estado de descanso, en que se forman la pseudoespora (Raper, 1960).

Es un género de amibas de vida libre raramente aislado de los seres humanos; quistes y trofozoitos se han encontrado en las heces de muchos animales, incluyendo mamíferos y reptiles.

Sappinia pedata se reportó como agente etiológico en un caso de encefalitis en 2001 y su ultraestructura se dio a conocer en 2003 (Walochnik et al., 2010).

1.6.5 *Hartmannella*

Presenta citoplasma desnudo, es de pequeño tamaño, el trofozoito tiene un cuerpo alargado con medidas menores a 40 μm de longitud. Avanza con relativa rapidez deslizándose sobre el fondo y extendiendo por la parte delantera una sola prolongación de citoplasma hialino, su único pseudópodo. La parte posterior presenta unos pequeños abultamientos verrugosos que en otras especies parecidas como *Saccamoeba* son bastante más largos y conforman una estructura llamada uroide (una especie de cola). El alimento de *Hartmannella* se constituye de bacterias, pequeñas algas y detritus.

1.7 Factores de patogenicidad

1.7.1 Endosimbiontes

Numerosos microorganismos tales como bacterias y amibas de vida libre, viven juntos tanto en la naturaleza como en los sistemas hídricos (Bastian *et al.*, 200; Üstüntürk *et al.*, 2010; Burak y Zeybek, 2011; Üstüntürk y Zeybek, 2012; Türkmen, 2012).

Cuando estos microorganismos viven en el mismo medio acuático, interactúan entre sí de diferentes maneras. Algunas bacterias son fagocitadas por las AVL, mientras que otras pueden tener cierta resistencia a las amibas, las cuales entran a las células amibianas debido a condiciones ambientales inadecuadas que puedan presentarse (antibióticos, desinfectantes, etc.) para poder crecer y multiplicarse dentro de las mismas para eventualmente extenderse en el medio ambiente en grandes cantidades (Tyndall y Domingue, 1982; Wadowsky *et al.*, 1988; Wang y Ahearn, 1997; Andra *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2006, 2008).

Un ejemplo de las bacterias resistentes a las amibas de vida libre, son las micobacterias no tuberculosas (MNT) las cuales pueden compartir hábitats con amibas de vida libre (AVL) y pueden crecer en ellas como parásitos o como endosimbiontes. Las AVL que contienen MNT pueden formar quistes que protegen a estas micobacterias de desinfectantes y antibióticos. La incidencia de enfermedades en pulmón y otras enfermedades debidas a micobacterias no tuberculosas (MNT) está aumentando. Las fuentes de micobacterias no tuberculosas incluyen agua potable, especialmente en los hogares, ya que pueblan tuberías, grifos y duchas. (Ovrutsky *et al.*, 2013)

Otro ejemplo de bacteria resistente y endosimbionte de las amibas de vida libre es *Legionella pneumophila*, la bacteria causante de la enfermedad del legionario, es un patógeno de vida libre, se puede encontrar en agua dulce, incluso en amibas de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Los estudios iniciales con material de sembrado indican que el enriquecimiento de amibas podría ser utilizado para el aislamiento de *Legionella* partir de muestras clínicas y hábitats naturales. Se sugiere que una vacuola o amiba, llena de *Legionella*, en lugar de *Legionella* libre, podría ser la partícula infecciosa para el hombre (Rowbotham, 1980).

Las amibas de vida libre que tienen bacterias resistentes como endosimbiontes, cumplen con la función de reservorios para éstas, ya que resisten y protegen a las mismas de las condiciones adversas que se encuentren en el medio ambiente, además de los agentes usados para la desinfección del agua, especialmente cuando están enquistadas, ésta infección por bacterias resistentes ocurre por inhalación, vía aerosoles. (Bollin *et al.*, 1985.; Thomas *et al.*, 2004).

También existen algunos factores de predisposición y enfermedades asociadas (que afectan al sistema inmune) con infecciones de AVL como *Acanthamoeba* (Gallegos-Neyra, 1997).

Cuadro. 2 Factores de predisposición y enfermedades asociadas (Gallegos-Neyra, 1997)

Factores de predisposición	Enfermedades asociadas
▪ Embarazo	▪ SIDA
▪ Alcoholismo	▪ Diabetes <i>mellitus</i>
▪ Quimioterapia	▪ Falla renal crónica
▪ Radioterapia	▪ Otitis y faringitis
▪ Diálisis peritoneal	▪ Neumonía
▪ Trasplantes	▪ Lupus eritematoso sistémico
▪ Tratamiento con antibiótico y esteroides	▪ Cirrosis hepática
▪ Otros parásitos	▪ Cáncer
	▪ Ulceras en la piel
	▪ Infarto cerebral

1.7.2 Factores de virulencia

Los daños que pueden llegar a causar las amibas de vida libre patógenas pueden ser favorecidos por algunos mecanismos patogénicos distintos, estos mecanismos pueden contribuir de manera directa o indirecta en la invasión al hospedero (Cuadro 3).

Cuadro 3. Factores que contribuyen a la virulencia de las AVL (Khan, 2004)

Factores directos de virulencia	Factores indirectos de virulencia
<p>Mecanismos de contacto-dependientes</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Adhesión ❖ Apoptosis ❖ Fagocitosis ❖ Ecto-ATP-asas 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Ubicuidad ❖ Cambio fenotípico ❖ Morfología ❖ Tolerancia fisiológica ❖ Osmotolerancia
<p>Mecanismos contacto- independientes</p> <ul style="list-style-type: none"> ❖ Enzimas hidrolíticas ❖ Proteínas formadoras de ameboporos 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Tolerancia térmica ❖ Formación de biopelículas ❖ Quimiotaxis ❖ Resistencia a antibióticos ❖ Endosimbiontes

II.ANTECEDENTES

- ❖ *Acanthamoeba* fue descrita por primera vez por Castellani en 1930, cuando reportó la presencia de una ameba en un cultivo de *Cryptococcus pararoseus*.
- ❖ En 1958, Culbertson demostró el potencial patógeno de *Acanthamoeba* spp., y en 1965 Fowler y Carter reportaron el primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria causado por *Naegleria fowleri* en Australia; posteriormente, en Checoslovaquia se identificó, de manera retrospectiva, un brote de 16 casos de MEAP adquirida en una alberca calentada artificialmente (1962-1965).
- ❖ En 1972 se hizo evidente que *Acanthamoeba* spp., causaba enfermedades en los seres humanos; varios genotipos de *Acanthamoeba* (entre ellos, algunas especies conocidas, tales como: *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. healy*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*) son agentes causales de la encefalitis amebiana granulomatosa y queratitis en personas sanas. Se supo que la vía de acceso era la instilación con los trofozoítos de *Acanthamoeba* que invaden la mucosa nasal (Culbertson, 1975; Martínez *et al.*, 1977).
- ❖ *Balamuthia mandrillaris*, aislada del cadáver de un mandril por Visvesvara y cols, en 1990, fue reconocida como agente etiológico de encefalitis granulomatosa en pacientes inmunocomprometidos y más recientemente en personas inmunocomprometidas, sobre todo en los extremos de la vida; asimismo, se ha identificado en forma creciente en individuos de origen latinoamericano y en pacientes receptores de trasplantes.
- ❖ En México los primeros estudios sobre AVL comenzaron con los trabajos de Rivera y cols. en 1978, ellos tomaron muestras de piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la ciudad de México, encontrando así una gran variedad de AVL.
- ❖ Breiman y cols. en 1990, reportaron que el 71 % de las amibas aisladas del agua para beber y agua de una torre eran del género *Hartmannella*, además de *Acanthamoeba* y *Vahlkampfia*.

❖ Rivera y cols. en 1993, estudiaron la presencia de AVL en albercas para fisioterapia en la ciudad de México, en el que registraron al género *Acanthamoeba* como el más frecuentemente aislado en las épocas de primavera y verano.

❖ Gallegos en 1997, realizó un estudio sobre amibas de vida libre con potencial patógeno en la Huasteca Potosina en el estado de San Luis Potosí, en donde encontró seis diferentes géneros: *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Willaertia* relacionando su presencia con diferentes parámetros ambientales, concluyendo que los factores que más influencia tuvieron sobre el crecimiento y distribución de las amibas fueron: la temperatura del agua y la cantidad de materia orgánica.

❖ Rohr y cols. en 1998 tomaron muestras del sistema de agua caliente y zonas húmedas en seis hospitales para determinar la presencia de amibas, su identificación y tolerancia a la temperatura, obteniendo como resultado lo siguiente: un total de 29 de 56 muestras del sistema de agua caliente fueron positivas (52 %), 23 de 49 muestras positivas (47 %) obtenidas de áreas húmedas. Los géneros siguientes fueron identificados: *Acanthamoeba* (22 %), *Naegleria* (22 %), *Vahlkampfia* (20 %), *Hartmannella* (15 %), y *Vannella* (7 %). La tolerancia de temperaturas de las amibas del sistema de agua caliente fue sorprendentemente diferente de las de amibas de áreas húmedas. En el cultivo de las muestras a 44 °C, 59 % de los aislados amibianos provenientes del sistema de agua caliente mostró crecimiento sin embargo para los aislados de áreas húmedas fue sólo del 17%. De las AVL con potencial patógeno se aislaron: *Acanthamoeba*, *Hartmannella* y *Saccamoeba*. La identificación morfológica mostró que *Hartmannella vermiformis* fue la especie dominante en el sistema de agua caliente. De un total de 34 aislados, los organismos siguientes fueron identificados: *Hartmannella vermiformis* (65 %), *Echinamoeba* spp. (15 %), *Saccamoeba* spp. (12 %), y *Vahlkampfia* spp. (9 %).

De las muestras tomadas de biopelículas tomadas con hisopos se obtuvieron 41 aislados, de los cuales se identificaron seis géneros diferentes: *Acanthamoeba* spp. Grupos II y III (22 %), *Naegleria* spp. (22 %), *Vahlkampfia* spp. (20 %), *H. vermiformis* (15 %), amebas no identificadas (10 %), *Vannella* spp. (7 %), y miniamibas no identificadas (5 %).

- ❖ Lares-Villa y cols. en el 2001, aislaron e identificaron en cuerpos de agua de uso recreativo de Hermosillo, Sonora cinco géneros diferentes, donde el género *Acanthamoeba* fue el más frecuentemente encontrado (48 %), seguido por *Hartmannella* (41 %), *Willaertia* (3.6 %), *Platyamoeba* (3.6 %) y *Naegleria* (3.6 %).

- ❖ En 2001, Gelman y sus colegas informaron de un caso de encefalitis grave en un joven no inmunocomprometido causado por *Sappinia pedata*.

- ❖ En 2005 Lorenzo-Morales encontró en España, contaminación por *Acanthamoeba* en 48 de 88 muestras (59.5%) de agua del grifo.

- ❖ En México se han identificado algunos casos de EAG: 23 en Mexicali, Sonora, Monterrey, Huetamo, Michoacán y Tamaulipas. 12 casos de EAG por *B. mandrillaris*: 4 en CDMX, 4 en Jalisco y 2 en Guanajuato, 1 en el Estado de México y uno en Puebla. También un caso de EAG por *Acanthamoeba* spp. el cual sobrevivió y 5 de QA (Bonilla y Ramírez, 2011).

- ❖ Cateau y cols. en 2014 hablan acerca del papel que juegan las amibas de vida libre en las infecciones asociadas a la salud, ya que las amibas que se encuentran en los sistemas hídricos de los hospitales, pueden servir como reservorios de patógenos potenciales y por lo tanto pueden estar indirectamente relacionadas con las infecciones asociadas a la salud. La interacción entre éstas y otros microorganismos se basa en que pueden servir como un depósito para bacterias como *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* o incluso hongos y virus ofreciéndoles la protección contra las condiciones hostiles, proporcionando un vehículo de difusión, permitiéndoles prepararse para la posterior supervivencia en macrófagos.

- ❖ Bagueri y Cols. en 2014 tomaron muestras de agua de la llave de distintos hospitales de 13 ciudades de Irán, obteniendo como resultados que la mayor coincidencia de los casos positivos estuvieron en una categoría de temperatura de 20-30 °C, con 0-2 ppm de cloro libre residual y pH 6-7.

III.JUSTIFICACIÓN

Los casos de meningoencefalitis amebiana primaria, encefalitis amebiana granulomatosa y queratitis amebiana ocasionados por amibas de vida libre, a nivel mundial son frecuentes, sin embargo en México estas enfermedades son casi desconocidas. Actualmente no existe ninguna información acerca de reportes de estas enfermedades por AVL para el estado de Oaxaca lo que podría sugerir desconocimiento de la problemática al respecto. Sin embargo, es importante mencionar que debido a la falta de conocimiento entre los médicos y los laboratoristas clínicos un número de casos de infecciones debidas a las AVL podrían estar sub-diagnosticadas pudiendo pasar desapercibidas y reportando a los pacientes como enfermos debido a otros agentes patógenos como: bacterias, virus, hongos y cisticercos, aun cuando el diagnóstico clínico pueda indicar la ausencia de estos microorganismos (Gallegos-Neyra, 1997).

En el presente estudio pretende detectar AVL patógenas dentro de un ambiente nosocomial debido a la trascendencia de su presencia en el interior de áreas críticas para los pacientes, cómo son: áreas de quirófanos, aire acondicionado; agua de los sistemas hídricos como: agua de cisternas, regaderas y agua de grifo.

Debido al bajo presupuesto que tienen los hospitales en el interior de la república, en este caso los hospitales del estado de Oaxaca, presentan aún rezagos muy grandes, tanto en el número de establecimientos, como en la calidad del servicio es por eso que se espera que los hospitales regionales tengan una mayor presencia de amibas de vida libre en los sitios muestreados, mientras que los hospitales generales, podría esperarse una presencia mínima o nula de las mismas, ya que cuentan con mayor presupuesto, por lo tanto, existe una mayor posibilidad de un mantenimiento regular dentro de las instalaciones, además de que éstos hospitales tienen más vías de acceso, ya que la zona donde se encuentran ubicados está más urbanizada.

IV.OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- ❖ Aislar e identificar amibas de vida libre a partir del agua y biopelículas de dos hospitales generales y dos hospitales regionales de la Sierra Norte y los Valles Centrales del estado de Oaxaca.

4.2 Objetivos particulares

- ❖ Aislar e identificar amibas de vida libre a partir de sistemas hídricos y biopelículas de dos hospitales generales y dos hospitales regionales del estado de Oaxaca.
- ❖ Identificar las zonas intrahospitalarias como el área de quirófanos: mesa de cirugía, regaderas de pacientes, aire acondicionado y nebulizadores y sistemas hídricos: agua de cisternas, agua de grifo, agua de regaderas de pacientes, con presencia de amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuatro hospitales del estado de Oaxaca.
- ❖ Emitir recomendaciones a los hospitales muestreados a partir de los resultados obtenidos.

V.ÁREAS DE ESTUDIO

5.1 Ubicación y características de las áreas de estudio

Por su conformación política, económica y social, Oaxaca cuenta con ocho regiones geoeconómicas: Cañada, Costa, Istmo, Mixteca, Papaloapan, Sierra Norte, Sierra Sur y Valles Centrales; siendo su capital la ciudad de Oaxaca de Juárez, de éstas, las áreas de estudio donde se llevó a cabo el presente estudio comprenden: las regiones de la Sierra Norte y Valles Centrales de Oaxaca, en las cuales se seleccionaron por accesibilidad dos hospitales en cada una, un hospital regional y un hospital general, teniendo un total de cuatro hospitales muestreados (Fig. 7).

En el estado de Oaxaca predomina el clima tropical, su temperatura media anual es de 18 °C. No obstante, la accidentada geografía provoca variaciones del clima, por ejemplo, en los litorales prevalece una temperatura promedio de 27 °C, mientras que en el Valle de Oaxaca la temperatura media es de 22 °C. Por su parte, en las regiones altas de las montañas impera el clima frío. (INEGI. 2000 y 1999).



Figura 7. Mapa de la República donde se señala el estado de Oaxaca con rojo.

5.2 Valles centrales

Los Valles Centrales de Oaxaca se ubican en la parte central del estado. Limitan al oeste con la región de la Mixteca, al noroeste con la Cañada, al norte con la Sierra de Juárez, al este con el Istmo de Tehuantepec y al sur con la Sierra del Sur. En conjunto abarcan 121 municipios en los distritos de Ejutla, Etlá, Ocotlán, Tlacolula, Zaachila, Zimatlán y Centro. Estos contienen uno de los acuíferos más importantes del estado de Oaxaca, que abastece de agua a más de medio millón de personas.

La región presenta una topografía irregular con altitudes de 1,010 m.s.n.m. hasta de 2,600 m.s.n.m. Su área de influencia se encuentra ubicada dentro de la provincia fisiográfica de la Sierra Madre del Sur. El clima es seco y semi-seco. La temperatura media anual es de 18 °C. con precipitación media anual de 725 mm y una evaporación de 1,862 mm.

En la región existen cuatro subcuencas hidrológicas pertenecientes a la vertiente del Pacífico: Etlá, Tlacolula, Zimatlán y la subcuenca de Ocotlán y Ejutla. Las corrientes superficiales que riegan los Valles Centrales son escasas y de poco caudal; el río Atoyac, formador del Río Verde, es la principal fuente de abastecimiento de agua superficial, principalmente en el valle de Etlá. El promedio de precipitación pluvial es de 600 mm (CDI, 2014)

Los servicios de salud en la región de los Valles Centrales presentan aún rezagos muy grandes, tanto en número de establecimientos, como en la calidad del servicio. En Valles centrales la probabilidad de morir durante el primer año de vida es de 84.067 por mil. La región cuenta con varias instancias públicas de salud pertenecientes a la Secretaría de Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social. El acceso a los servicios públicos de salud es restringido a 591,369 derechohabientes del IMSS e ISSSTE, siendo 429,216 los individuos que no cuentan con derechohabiencia. De manera general, quienes pueden gozar de estos servicios son quienes radican en o cerca de las grandes aglomeraciones y principalmente de la capital del estado. Las localidades más alejadas se encuentran en un estado de rezago en esa materia, tanto por la falta de instalaciones como por la escasez de personal, de material y de recursos (INEGI ,2010).

5.4 Sierra Norte

La Sierra Norte, ubicada en el norte del estado de Oaxaca, está compuesta por dos zonas: los distritos políticos de Ixtlán y Villa Alta (51 municipios), donde predominan los bosques templados, y La Chinantla (14 municipios) con predominio de selvas húmedas y bosques mesófilos. Aquí habitan dos de los grupos étnicos más importantes del estado: los zapotecos y los chinantecos.

La sierra norte tiene gran importancia hidrológica, por ser parteaguas de la cuenca del Papaloapan, además de ser una de las zonas con mayor precipitación promedio anual (más de 4,000 mm). La marginación y la falta de alternativas económicas provocan migraciones hacia otros estados o fuera del país. Aún así el manejo forestal de la Sierra Norte se está consolidando.

Hospitales en el estado de Oaxaca, México, en los que se realizó el muestreo son (Fig. 8):

Región de la Sierra Norte:

Hospital General María Lombardo de Caso, San Juan Cotzocón. (A)

Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez, Ixtlán de Juárez. (B)

Región de los Valles Centrales:

Hospital General “Dr. Aurelio Valdivieso”, Oaxaca de Juárez. (C)

Hospital de la Niñez Oaxaqueña. San Bartolo Coyotepec. (D)



Figura 8. Hospitales muestreados en el estado de Oaxaca: (A) Hospital de la Niñez Oaxaqueña, (B) Hospital General María Lombardo de Caso, (C) Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez. (D) Cisternas del Hospital General Dr. Aurelio Valdivieso.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el mes de febrero del 2014, en el estado de Oaxaca, donde se obtuvieron un total de 40 muestras de agua y biopelículas, tomadas de dos hospitales de la región Sierra Norte y dos hospitales de la región de los Valles Centrales, teniendo en total cuatro hospitales muestreados.

6.1 Trabajo de campo

6.1.1 Recolección y transporte de muestras

La toma de muestras de agua (agua de grifo y cisternas) se hizo en frascos de polipropileno de boca ancha de 50 ml, tomando 35 ml para dejar un espacio oxigenado. En cuanto a biopelículas se tomaron muestras de: regaderas, coladeras de las regaderas, aires acondicionados y nebulizadores, con ayuda de hisopos estériles, los cuales se colocaron en tubos de polipropileno con rosca con solución salina de Page al 15 % para su traslado. En todos los casos las muestras de agua fueron transportadas a temperatura ambiente (las amibas de vida libre son sensibles a los cambios drásticos de temperatura) al laboratorio de Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) de la FES-Iztacala UNAM para su procesamiento (Figs. 9 y 10).



Figura 9. Recolección de muestras de los distintos sistemas hídricos, incluyendo agua de regadera, de grifo, de lavabo y de la cisterna de los hospitales.



Figura 10. Recolección de muestras de biopelículas en los distintos hospitales, incluyendo biopelícula de mesa de instrumental quirúrgico, mesa de cirugía, regaderas de pacientes, aire acondicionado y nebulizadores.

6.2 Registro de parámetros fisicoquímicos del agua *in situ*

Para comprobar si hay una relación de los factores ambientales y la presencia de estas amibas se hicieron las siguientes determinaciones en las zonas muestreadas: temperatura del agua ($^{\circ}\text{C}$), cloro libre residual y pH

6.3 Trabajo de laboratorio

6.3.1 Aislamiento y cultivo

De cada muestra de agua se tomaron alícuotas de 50 ml y se concentraron por centrifugación a $1200 \times g$ durante 10 minutos (centrífuga Boeco-U32). Se decantó el sobrenadante hasta dejar un volumen final aproximado de 0.5 ml y el sedimento se resuspendió y se inoculó en una placa de Petri con agar no nutritivo (NNE) con *Enterobacter aerogenes* (De Jonckheere, 1979), (Anexo I).

6.3.2 Clonación

La observación de las placas de medio no nutritivo con *E. aerogenes* (NNE) se realizó con un microscopio invertido para verificar el crecimiento amibiano, revisándolas cada 12 y 24 hrs

después. En las placas de Petri con amibas se marcó la zona de mayor abundancia y se cortó un trozo de agar de aproximadamente 5 mm², y se transfirió a otra placa (NNE) nueva y se mantuvieron a 37 °C en posición invertida dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación, se etiquetó cada caja según el sitio de muestreo.

6.3.3 Identificación morfológica de las amibas de vida libre

Después de la detección del crecimiento amibiano (quistes y trofozoítos) en las placas NNE se realizó la identificación morfológica de las mismas. El procedimiento se realizó en condición estéril, se vertió de medio a 1 ml de solución salina al 9 % sobre la placa y se realizó un barrido con un asa de vidrio, se concentró la suspensión acuosa con amibas y posteriormente se tomó una o dos gotas de la misma para colocarla en un portaobjetos para su observación en el microscopio invertido de contraste de fases a 10, 20 y 40 X (Nikon Eclipse TS100).

Para la identificación taxonómica se observaron las características del quiste y del trofozoito para compararlas con las características descritas en las claves taxonómicas de Page (1988), y a su vez se realizó un registro fotográfico con la cámara (Nikon coolpix 990).

6.3.4 Medición de quistes y trofozoítos

Se hicieron preparaciones en fresco de las amibas aisladas en laminillas y se observaron en un microscopio de contraste de fases a un aumento de 40 X (Nikon Eclipse TS100). De cada aislado se registró la medida de 50 trofozoítos (largo y ancho) y 50 quistes (diámetro, largo y ancho si es el caso).

6.3.5 Pruebas de tolerancia a la temperatura

Esta prueba se realizó para conocer la temperatura máxima y óptima de crecimiento de las amibas aisladas, cada uno de los aislados se sembró por triplicado en medio NNE y se mantuvieron a temperatura ambiente (20 °C a 22 °C), 37,42 y 45 °C, posteriormente las placas se observaron con un microscopio invertido a 10,20 y 40 X aumentos durante una semana para observar y registrar su crecimiento.

Sitios de muestreo

Quirófanos: Lavabo (agua), biopelícula de lavabo, mesa de cirugía, mesa de instrumental quirúrgico .

Sistema hídrico: Agua de grifo, tinaco o cisterna, nebulizadores , regaderas.



Parámetros fisicoquímicos del agua *in situ*
pH, cloro y temperatura

Transporte de muestras recolectadas al laboratorio de la UIICSE.



Aislamiento y cultivo de AVL en agar NNE
Incubación a 37 °C

Clonación por morfotipos de las AVL



Pruebas de tolerancia a la temperatura

Determinación taxonómica de los aislados
Claves de Page (1976 a,b, 1988)



Registro fotográfico



Figura 11. Secuencia de pasos metodológicos para la determinación de AVL termófilas, posiblemente patógenas.

VII.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Aislados amibianos

Del total de las 40 muestras recolectadas en los nosocomios se encontraron 12 muestras positivas, de las que se obtuvieron aislados amibianos, los cuales pertenecen a los siguientes 12 géneros: *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Gocevia*, *Hartmannella*, *Leptomyxa*, *Naegleria*, *Paratetramitus*, *Rosculus*, *Saccamoeba*, *Stachyamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella*, en la figura 11 se observa el porcentaje que ocupó cada género del total de las muestras positivas.

De las muestras positivas se puede observar (Fig.12) que *Acanthamoeba* fue el organismo predominante sobre los demás géneros (37 %), seguido de *Naegleria* (19 %) y *Vahlkampfia* (17 %). Cabe mencionar que los primeros dos géneros más frecuentes son de importancia médica y se han descrito como organismos patógenos para el ser humano (Lehman *et al.*, 1998).

La presencia de las amibas en estos sitios se debe a que las zonas muestreadas fueron principalmente medios acuáticos o biopelículas en contacto con agua, lo cual favorece su crecimiento y reproducción (Smirnov, 2004).

La frecuencia de géneros de amibas de vida libre en el presente trabajo coincide con los resultados obtenidos por Breiman *et al.* en 1990 y Sanden *et al.* en 1992 que citan al género *Acanthamoeba* y *Vahlkampfia* como los más frecuentemente aislados en muestras de agua potable que permanecían con temperaturas templadas o frías.

Además de tener cierta similitud al estudio realizado por Bagueri *et al.* en 2010, quien aisló e identificó AVL de muestras de agua potable obtenidas en distintos hospitales de Irán, teniendo como resultado un total de 48 % positivas para *Acanthamoeba*, mientras que en el presente estudio se obtuvo un 37 % de muestras positivas para éste género.

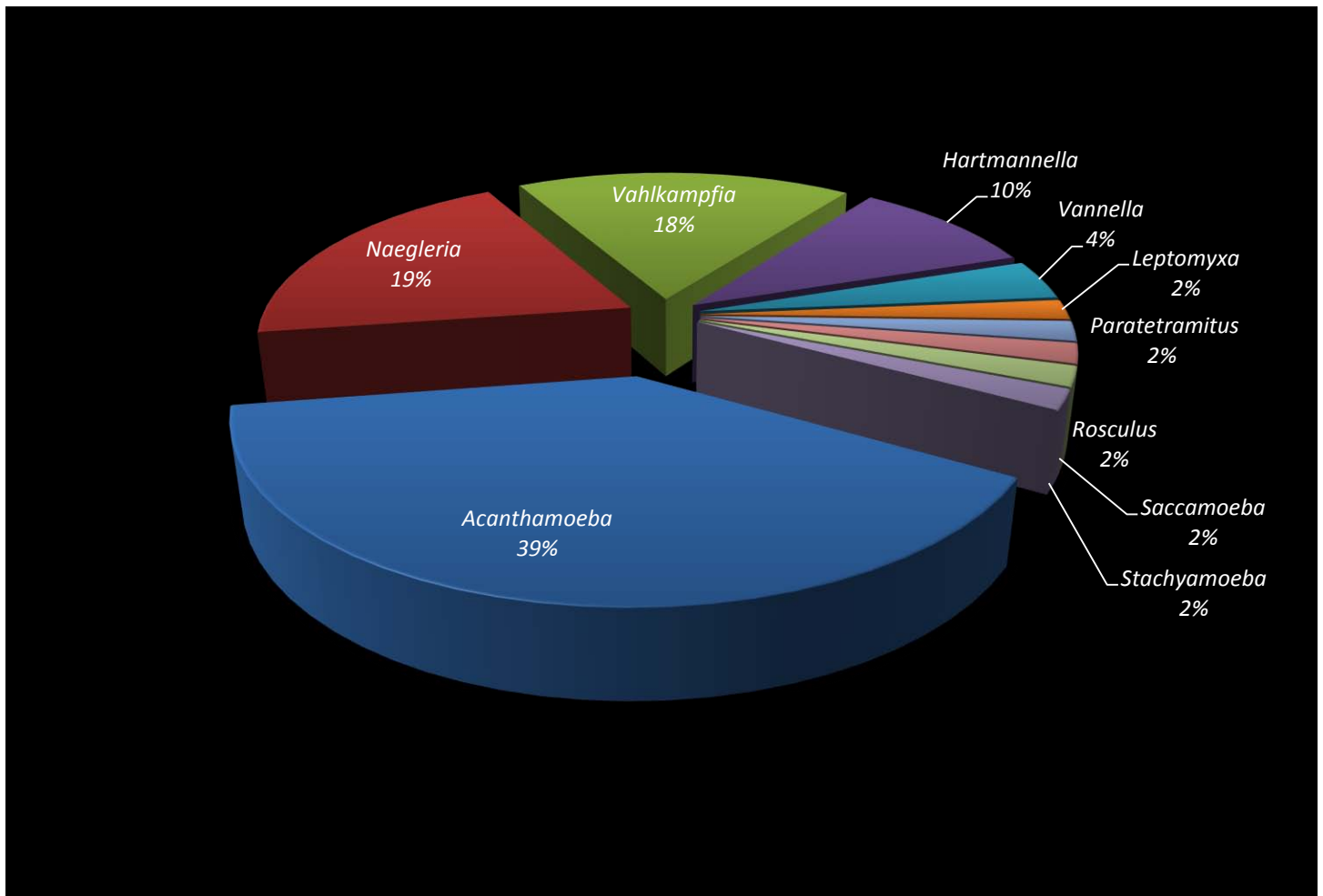


Figura 12. Diversidad y proporción de los géneros de AVL aislados del total de muestras nosocomiales.

Estos resultados son muy similares a los reportados por Rohr en 1998 quien obtuvo un total de 22 % para *Acanthamoeba*, 22 % *Naegleria*, 20 % *Vahlkampfia* y 15 % para *Hartmannella vermiformis* de las muestras tomadas de biopelículas de hospitales, al igual que Carlesso en 2007 quien obtuvo muestras de distintos ambientes nosocomiales de los que reporta con mayor frecuencia al género *Acanthamoeba*.

Como se puede ver en la Fig. 13, del total de muestras analizadas en el presente estudio, la mayor cantidad de aislados fue obtenida de las biopelículas (17 %), la formación de éstas puede deberse a la inadecuada limpieza y en su caso al mal mantenimiento de las cisternas o los lugares de almacenamiento del agua (Shoff et al., 2008).

Uno de los factores que se deben tener en cuenta para el cuidado y mantenimiento de los sitios de almacenaje de agua es el cloro, el cual es utilizado como agente microbiano debido a su carácter fuertemente oxidante, el cual tiene un amplio espectro de eliminación de agentes patógenos, sin embargo como el agua es almacenada por periodos prolongados, el cloro comienza a perderse, favoreciendo el crecimiento y reproducción de estos organismos (Hoffman y Michel, 2001; Jeong y Yu, 2005; Shoff *et al.*, 2008).

Es importante mencionar la formación de biopelículas en los distintos sitios nosocomiales muestreados, ya que éstas están formadas principalmente por bacterias y otros organismos, los cuales forman un micro ecosistema (Thomas *et al.*, 2010). La presencia de biopelículas en un ambiente nosocomial es muy importante ya que les otorgan a los microorganismos que viven en ellas alimento, protección, además de que amortiguan los cambios de pH, temperatura, osmolaridad y la presencia desinfectantes como el cloro. Así que, si no se eliminan las biopelículas de los reservorios de agua, la eficacia del cloro en organismos con potencial patógeno se puede ver inhibida (Serra, 2003; Thomas *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2010) (Fig. 12).

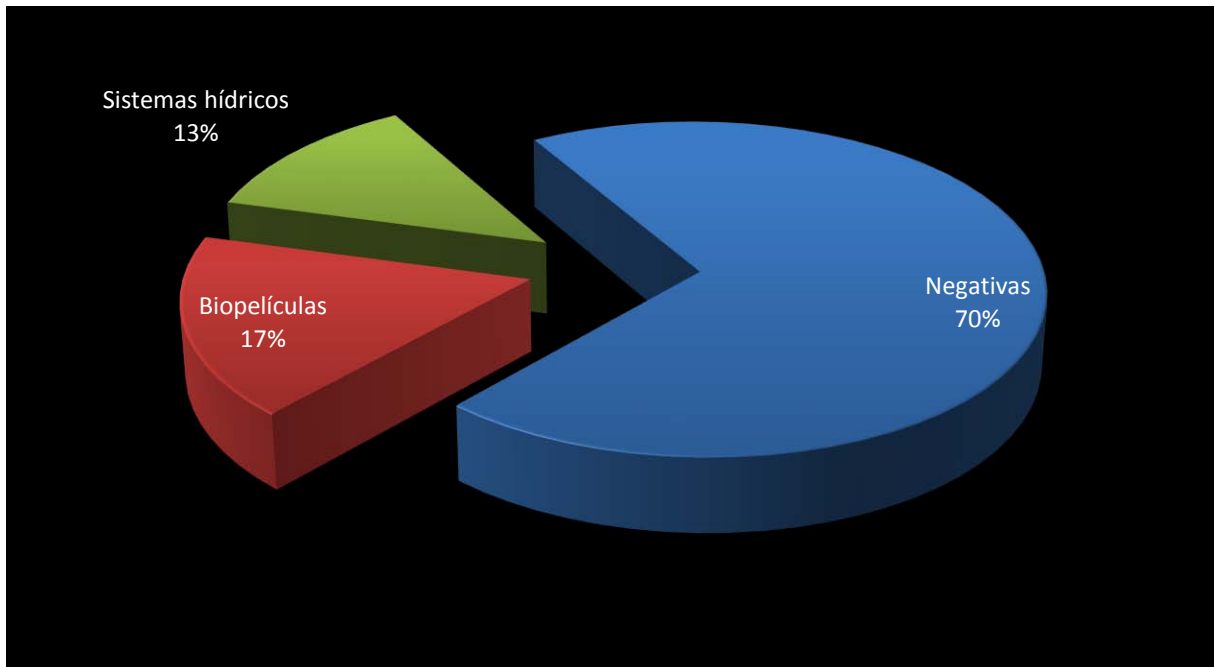


Figura 13. Porcentajes de muestras positivas y negativas en los aislados de las biopelículas, sistemas hídricos y muestras negativas para AVL.

En el cuadro 4 se muestra el listado de géneros y especies de AVL aisladas para cada hospital:

Cuadro 4. Riqueza específica de amibas de vida libre aisladas en cada hospital

Valles Centrales
Hospital General “Dr. Aurelio Valdivieso”
Sistema hídrico, Cisterna de agua no tratada
<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Hartmannella</i>
<i>Hartmannella vermiformis</i>
<i>Naegleria gruberi</i>
<i>Naegleria</i> spp.
<i>Vahlkampfia</i> spp.
<i>Vannella cirrifera</i>
<i>Vannella</i> spp.
Cisterna de agua tratada
<i>Leptomyxa</i> spp.
<i>Naegleria</i> spp.
Biopelícula, nebulizador
<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Echinamoeba</i> spp.
<i>Gocevia</i> spp.
<i>Naegleria gruberi</i>
<i>Naegleria</i> spp.
<i>Paratetramitus</i> spp.
<i>Rosculus ithacus</i>
<i>Vahlkampfia enterica</i>
<i>Vahlkampfia</i> spp.
<i>Vannella</i> spp.
Biopelícula, aire acondicionado
<i>Acanthamoeba castellanii</i>
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>

<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>
<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Acanthamoeba triangularis</i>
<i>Naegleria gruberi</i>
<i>Naegleria</i> spp.
<i>Paratetramitus</i> spp.
<i>Stachyamoeba</i> spp.
<i>Vahlkampfia</i> spp.
<i>Vahlkampfia ustiana</i>
<i>Vannella</i>
<i>Vannella platypodia</i>
Hospital de la Niñez Oaxaqueña
Quirófano, agua de lavabo
<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Hartmannella</i> spp.
<i>Vahlkampfia</i> spp.
Biopelícula, Lavabo
<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Hartmannella</i> spp.
<i>Naegleria</i> spp.
<i>Vahlkampfia</i> spp.
<i>Vannella platypodia</i>
Polvo de mesa de instrumental quirúrgico
<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Acanthamoeba castellanii</i>
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
<i>Acanthamoeba rhyodes</i>
Biopelícula, regadera
<i>Acanthamoeba</i> spp.

<i>Hartmannella</i> spp.
<i>Vahlkampfia</i> spp.
Sierra Norte
Hospital General María Lombardo de Caso
Quirófano, agua de lavabo
<i>Hartmannella</i> spp.
<i>Naegleria gruberi</i>
<i>Rosculus ithacus</i>
Biopelícula, lavabo
<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Naegleria gruberi</i>
<i>Vahlkampfia</i> spp.
Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez
Quirófano, agua de lavabo
<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Acanthamoeba castellanii</i>
<i>Naegleria gruberi</i>
<i>Saccamoeba</i> spp.
<i>Vahlkampfia</i> spp.
Biopelícula, regadera
<i>Acanthamoeba</i> spp.
<i>Vahlkampfia</i> spp.
<i>Naegleria gruberi</i>

7.1 Identificación taxonómica del género *Acanthamoeba*

La identificación de los aislados fue realizada en base a la comparación de las características morfológicas de quistes y trofozoítos con las claves taxonómicas de Page (1988).

Como se muestra en la figura 12, el género con mayor presencia en los aislados amibianos fue *Acanthamoeba*, del que se lograron identificar cinco especies (Fig.14), donde las más frecuentes fueron *A. castellanii*, *A. culbertsoni* y *A. rhyodes*, de éstas las primeras dos están reportadas como patógenas, capaces de infectar al ser humano en órganos como los ojos, pulmón, próstata y piel (Martínez, 1985; Martínez y Janistschke, 1985; Rocha et al., 2009).

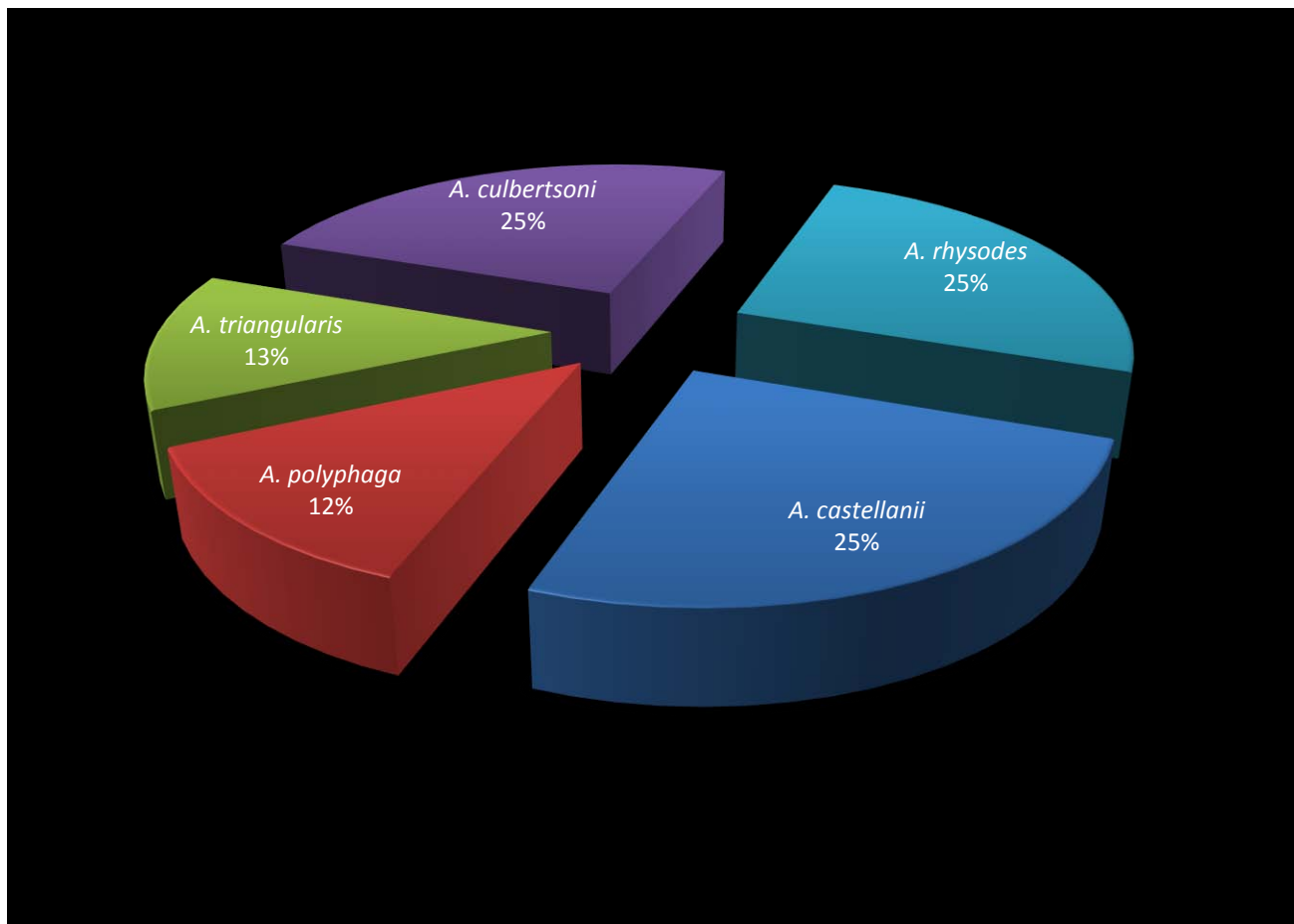


Figura 14. Porcentaje de especies de *Acanthamoeba* aisladas de las muestras nosocomiales.

El género *Acanthamoeba*, está distribuido mundialmente y presenta una gran resistencia a los distintos ambientes que puede tener a su alrededor por lo que ha sido aislado del suelo, agua dulce, agua salobre, agua embotellada mineral, torres de enfriamiento de plantas eléctricas y nucleares, unidades de ventilación, calefacción y aire acondicionado, humidificadores, tubos de jacuzzi, albercas de hidroterapia en hospitales, unidades dentales, en el polvo del aire, cultivos bacterianos, fúngicos, cultivos celulares de mamíferos, lentes de contacto, secreción del oído, secreciones pulmonares, hisopos de frotis nasales de pacientes con problemas respiratorios y de individuos sanos, de senos maxilares, injertos mandibulares, piel y muestras de heces.(Visvesvara *et al.*,2006). También se puede relacionar la mayor presencia de *Acanthamoeba* en las muestras intrahospitalarias debido a que es un género tolerante a una amplia gama de osmolaridad, lo que le permite sobrevivir en una gran variedad de medios, como agua destilada, medios de cultivo de tejidos, fluidos corporales de mamíferos y agua de mar.(Martínez, 1985; Martínez y Visvesvara, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004; Visvesvara y Maguire, 2006).

La supervivencia y la extensión de *Acanthamoeba* en la naturaleza y especialmente en agua demuestra la capacidad potencial de la patogénesis de este protozoo tanto en humanos como en animales (Marciano-Cabral *et al.*, 2003).

Además, estudios anteriores han demostrado que *Acanthamoeba* ha sido aislada de agua de grifo, la cual podría tener cierta capacidad patógena (Kilvington *et al.*, 2004, Lorenzo-Morales ,2005). Esto es alarmante para el presente estudio ya que éste género tuvo mayor presencia en los aislados obtenidos del agua potable de cuatro distintos hospitales, ya que entre las personas susceptibles están los pacientes, que son más propensos a tener infección de *Acanthamoeba* en los hospitales.

Entre las vías de dispersión que puede tener una amiba, las fuentes de agua tienen un papel claro en la prevalencia de queratitis por *Acanthamoeba*, ésta cuenta con una amplia dispersión, por lo que las personas tienen una alta exposición a estos protozoos (Niyati *et al.*, 2009). Por esta razón, ha sido afirmado que más del 80 % de las personas sanas tienen anticuerpos contra *Acanthamoeba* (Chappell *et al.*, 2001).

El riesgo de infección aumenta ya que las tuberías de agua potable en los hospitales a menudo son viejas y pueden estar dañadas, teniendo trazas de metal y contaminantes orgánicos en el agua, además de esto el agua con alta dureza y libre cloro, bajo o alto pH podrían dar lugar a efectos adversos para la salud.

Los sistemas de distribución de agua, así como los tinacos de agua que se encuentran en las azoteas en las ciudades, que se utilizan para satisfacer las necesidades de emergencia tienen un papel importante en la difusión de *Acanthamoeba* entre otras amibas de vida libre, aún más cuando los hospitales tienen este tipo de tanques de agua sin un mantenimiento adecuado, lo que pudiera favorecer la presencia de estos patógenos (Michel *et al.*, 1995).

7.2 Distribución de AVL en los sitios muestreados

La región con mayor número de especies de AVL aisladas fue la de los Valles Centrales, con un total de 24 especies aisladas, mientras que la región de la Sierra Norte tuvo un menor número con 16 especies, sin embargo éstas AVL fueron obtenidas de un área muy importante de los hospitales que es el quirófano. Cabe mencionar que en las especies obtenidas de estos aislados están incluidas *Acanthamoeba* y *Naegleria* las cuales están en el grupo de amibas patógenas para el hombre, ya que pueden provocar patologías, como queratitis y encefalitis amebiana granulomatosa, meningoencefalitis amebiana primaria, encefalitis amebiana granulomatosa y acantamebiosis, sin embargo para lograr asegurar la patogenicidad de estos aislados es necesario someter estas muestras a análisis para conocer si éstos presentan genotipos patógenos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Caumo y Rott, 2011; Magnet *et al.*, 2012).

El sumario de las amibas aisladas de los cuatro hospitales fue de 54 especies y a continuación se muestran una serie de figuras (Figuras. 14,15,16 y 17) en donde se puede observar el porcentaje de AVL en cada sitio de muestreo por cada hospital, teniendo en cuenta el número total de especies aisladas en cada hospital:

Cuadro 5. Número total de especies aisladas e identificadas en cada uno de los hospitales muestreados.

Hospital Dr. Aurelio Valdivieso: 24 especies
Hospital de la Niñez Oaxaqueña: 16 especies
Hospital General María Lombardo de Caso: 6 especies
Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez: 8 especies

La detección de estas AVL en ambientes intrahospitalarios es preocupante debido a que nos indica la mala calidad microbiológica del agua o de la inadecuada limpieza de diversas superficies que pueden llegar a estar en contacto con los pacientes. Cabe destacar que el método más usado para administrar los distintos tratamientos farmacológicos por aerosoles son los nebulizadores y la contaminación microbiana de estos aparatos está bien documentada y estudiada, se sabe que a pesar de una limpieza y desinfección profunda, alrededor del 70 % de los nebulizadores pueden estar contaminados por varios tipos de patógenos.

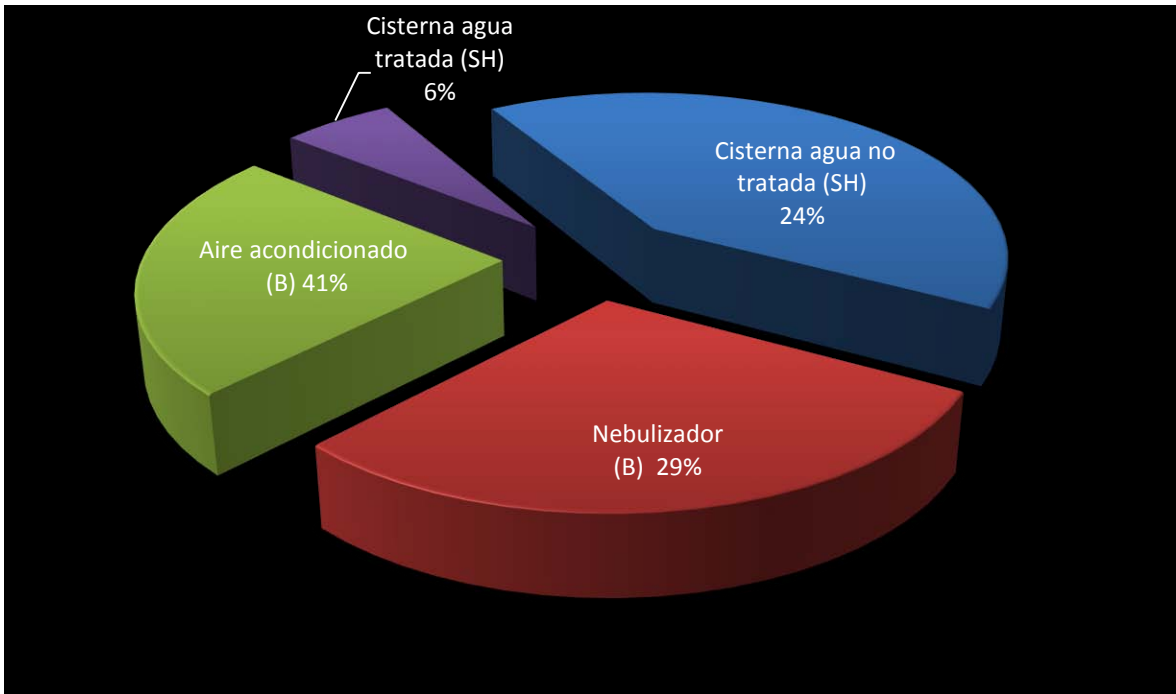


Figura 14. Porcentajes de AVL aisladas por zona de muestreo en el Hospital Aurelio Valdivieso, en sistema hídrico (SH) y biopelículas (B).

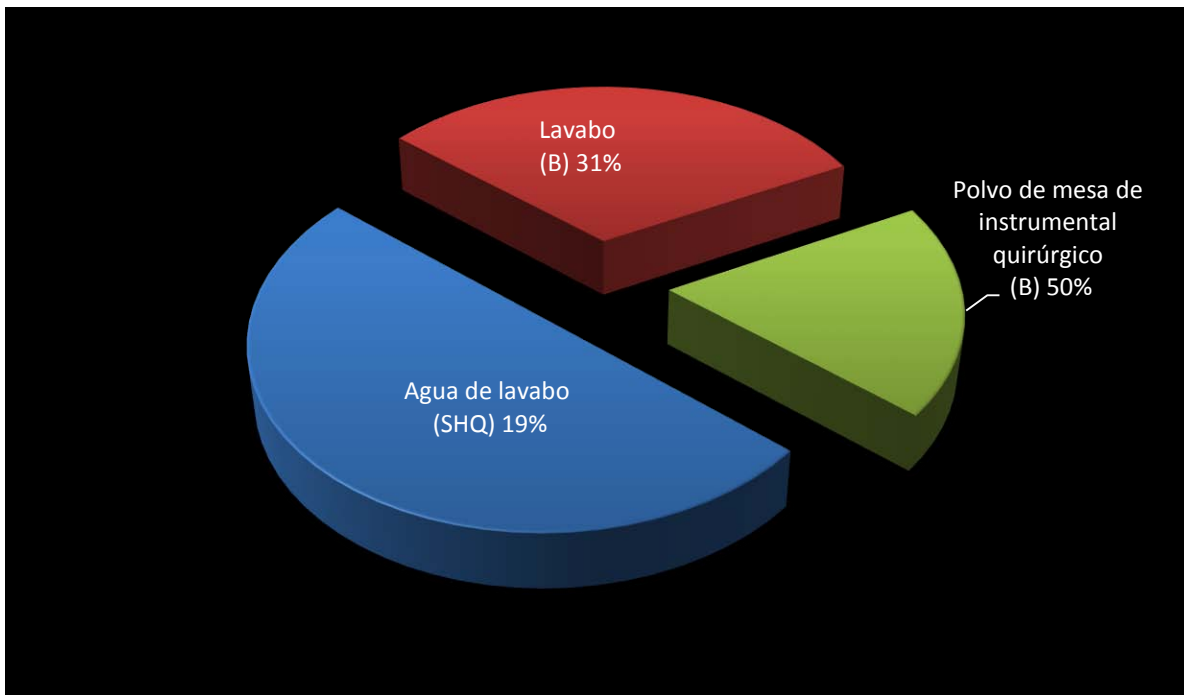


Figura 15. Porcentajes de AVL por ambiente muestreado en el Hospital de la Niñez Oaxaqueña, en sistema hídrico (de quirófanos) (SHQ) y biopelículas (B).

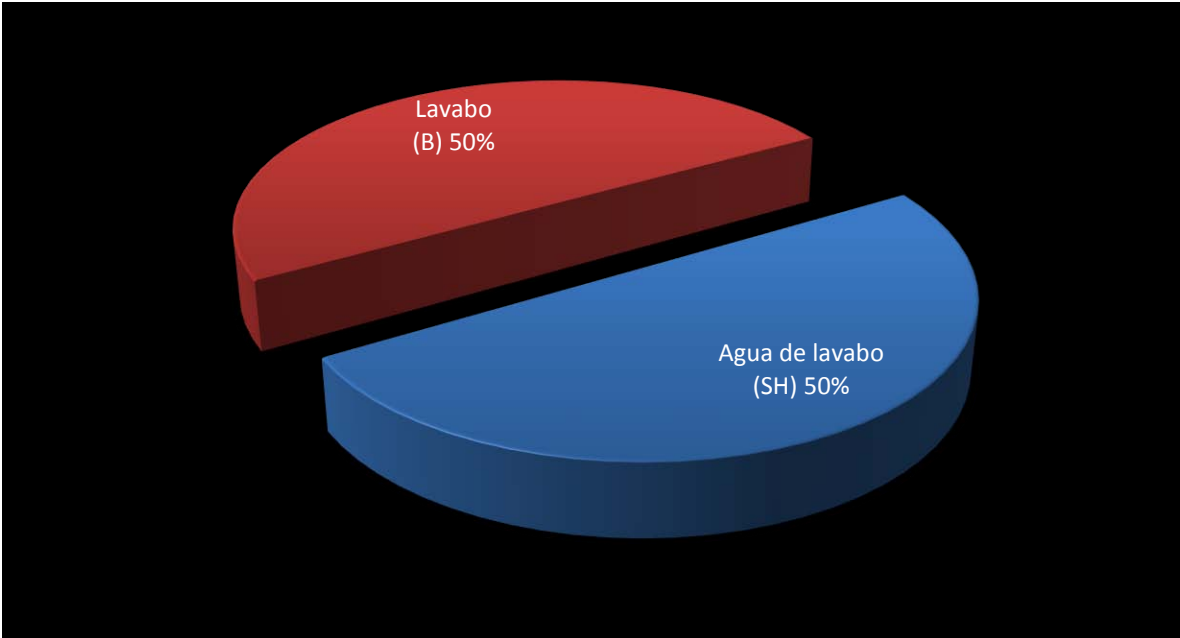


Figura 16. Porcentajes de AVL por zona de muestreo en el Hospital General María de Lombardo de Caso, en sistema hídrico (SH) y biopelículas (B).

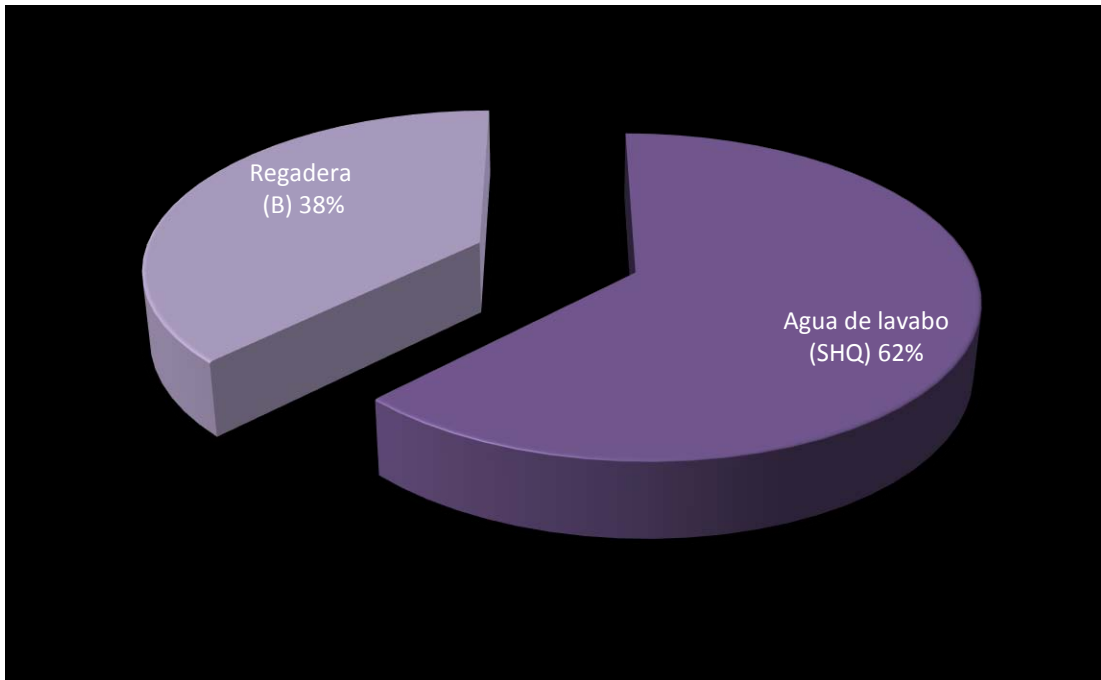


Figura 17. Porcentajes de AVL por zona de muestreo en el Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez, en sistema hídrico (de quirófanos) (SHQ) y biopelículas (B).

7.3 Parámetros fisicoquímicos de los sistemas hídricos intrahospitalarios muestreados

7.4 Temperatura del agua

La temperatura del agua que favoreció el crecimiento de las amibas de vida libre dentro de los ambientes nosocomiales fueron de 17 a 24 °C (Cuadro 6 y 7), además de los 37 °C que se utilizaron como parámetro dentro de la prueba de tolerancia a la temperatura, comprobando la resistencia que tienen estos organismos, sobre todo de los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Hartmannella* los cuales son considerados como amibas termófilas y tienen mayor importancia en este trabajo debido a su potencial patógeno en humanos.

Por otro lado dentro de los ámbitos de temperatura del agua el mayor número de muestras positivas estuvo entre los 19 y 22 °C lo que es muy similar a lo que Bagheri *et al.*, reportan, un mayor número de muestras positivas de hospitales entre los 20 °C y 30 °C.

En el caso de algunos hospitales puede ser que el aumento de temperatura del agua dado que durante el recorrido para llegar a los mismos, a través de la tubería que atraviesa de la manera expuesta sobre la tierra, y abastece al pozo que suministra los sitios donde se almacena el agua, como las cisternas, sin embargo no fue posible tomar las temperaturas de estos puntos del origen del agua para confirmarlo.

7.5 Cloro libre residual

Según Rivera *et al.*, en 1993 el cloro libre residual debe ser de 1.5 ppm para ser eficaz en sistemas hídricos contra AVL, y en este caso los resultados del cloro libre residual varió de 0 a 0.5 mg/l, lo cual nos indica que fue favorecida la proliferación de estos organismos, además de otros microorganismos capaces de formar biopelículas, lo cual puede aumentar la población de AVL, para comparar, Bagheri y cols. en 2010 reportaron un mayor número de muestras nosocomiales positivas con 0.2 mg/l de cloro residual libre, lo que nos indica que los resultados obtenidos son similares en ambos casos.

7.6 pH

Como se puede observar en los cuadros 6 y 7, los valores de pH fueron de neutros a básicos, y el promedio obtenido de todas las muestras fue de 7.4, lo que nos indica que la población de AVL fue beneficiada con este pH, ya que, Bonilla y cols. en 2004 señalan que el parámetro adecuado de pH para las AVL es de 7.1.

Región: Valles Centrales

Cuadro 6. Registro de parámetros fisicoquímicos tomados en cada ambiente de muestreo.

Valles Centrales	Zona muestreada	pH	Cl (mg/l)	Temp. °C
Hospital General "Dr. Aurelio Valdivieso"	Cisterna	8.2	0	22
	Regadera	8.2	0	22
	Lavabo de Quirófano	8.2	0	22
Hospital de la Niñez Oaxaqueña	Cisterna	7.2	0	24
	Regadera	7.2	0	24
	Lavabo de Quirófano	7.2	0	24

Región Sierra Norte

Cuadro 7. Registro de parámetros fisicoquímicos tomados en cada ambiente de muestreo.

Sierra Norte	Zona muestreada	pH	Cl (mg/l)	Temp. °C
Hospital General María Lombardo de Caso	Cisterna	8.2	0	22
	Regadera	8.2	0	22
	Lavabo de Quirófano	8.2	0	22
Hospital Básico Comunitario de Ixtlán de Juárez	Cisterna	7.2	0	24
	Regadera	7.2	0	24
	Lavabo de Quirófano	7.2	0	24

7.7 Taxonomía

7.8 Registro fotográfico de las amibas de vida libre

7.9 Descripción

A continuación se muestran los géneros de AVL identificados taxonómicamente con una breve descripción de los mismos.

***Acanthamoeba* sp.**

Cuadro 8. Jerarquía taxonómica de *Acanthamoeba* sp.

Reino	Protista
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosa -amibas
Orden	Amoebida
Familia	Acanthamoebidae
Género	<i>Acanthamoeba</i>

Cuadro 9. Jerarquía taxonómica de *Acanthamoeba castellanii*

<i>Acanthamoeba castellanii</i>	
Reino	Protozoa
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosa - amibas
Orden	Amoebida
Familia	Acanthamoebidae
Género	<i>Acanthamoeba</i>
Especie	<i>Acanthamoeba castellanii</i>

Acanthamoeba castellanii Douglas, 1930

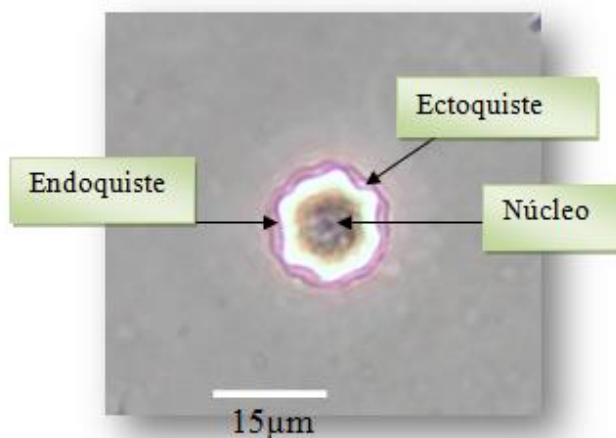


Figura 1. Quiste de *Acanthamoeba castellanii* (microscopía fotónica, 40x)

Endoquiste estrellado, los brazos del endoquiste en depresión formados por el ectoquiste. Ectoquiste grueso y rugoso, de forma poligonal, forma esférica u ovoide. Diámetro de 15 μm .

Cuadro 10. Jerarquía taxonómica de *Acanthamoeba culbertsoni*

<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	
Reino	Protozoa
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosa - amibas
Orden	Amoebida
Familia	Acanthamoebidae
Género	Acanthamoeba
Especie	<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>

Acanthamoeba culbertsoni Singh y Das, 1970

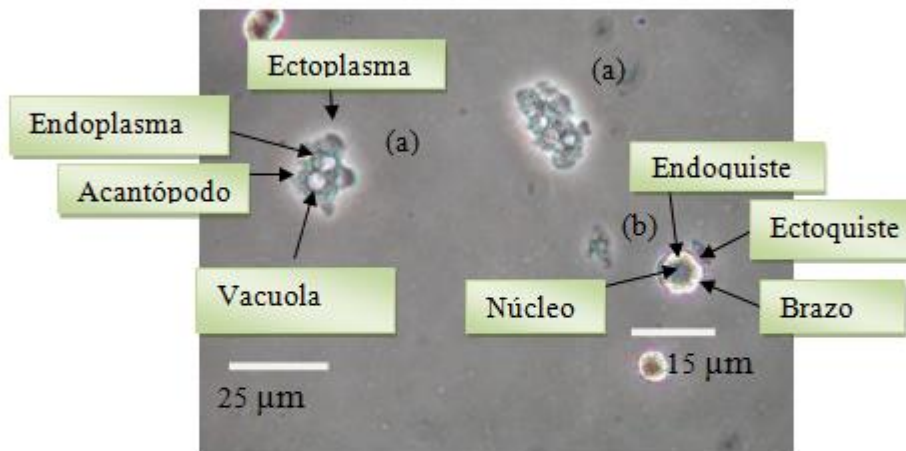


Figura 2. (a) Trofozoitos y (b) quiste de *Acanthamoeba culbertsoni* (microscopía fotónica, 40x)

Pared del ectoquiste muy delgada, endoquiste usualmente redondeado, ocasionalmente en forma poligonal, ectoquiste ondulado o rugoso y muy cercano al endoquiste. De 5-6 poros, aproximadamente de 15-18 µm. Pertenece al grupo III.

Cuadro 11. Jerarquía taxonómica de *Acanthamoeba polyphaga*

<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	
Reino	Protozoa
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosa - amibas
Orden	Amoebida
Familia	Acanthamoebidae
Género	Acanthamoeba
Especie	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>

Acanthamoeba polyphaga Puschkarew, 1913

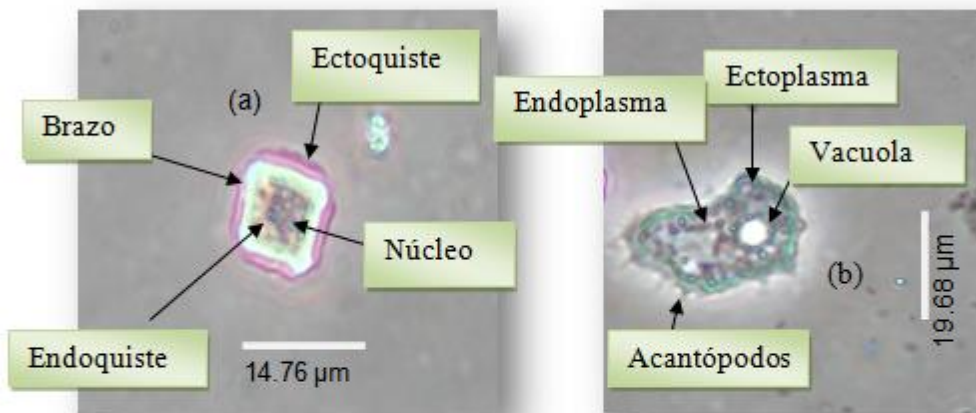


Figura 3. (a) Quiste y (b) trofozoito de *Acanthamoeba polyphaga* (microscopía fotónica, 40x)

Endoquiste irregular, ectoquiste delgado y extensamente separado del endoquiste, forma ovoide, cuatro brazos y aproximadamente 14 µm. Pertenece al grupo II.

Cuadro 12. Jerarquía taxonómica de *Acanthamoeba triangularis*.

<i>Acanthamoeba triangularis</i>	
Reino	Protozoa
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosa - amibas
Orden	Amoebida
Familia	Acanthamoebidae
Género	Acanthamoeba
Especie	<i>Acanthamoeba triangularis</i>

Acanthamoeba triangularis Pussard y Pons, 1977

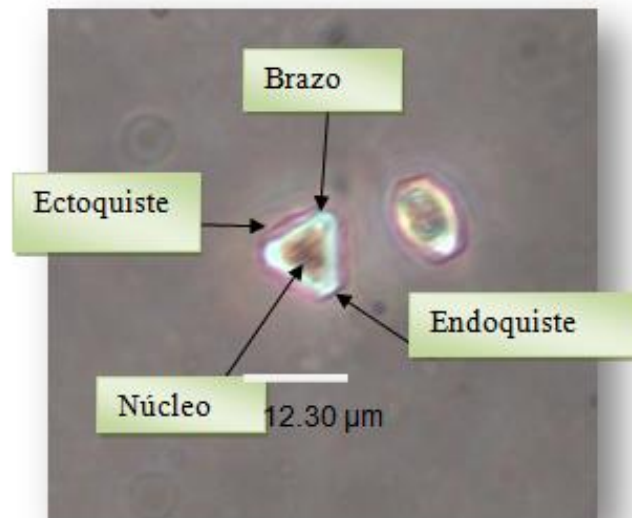


Figura 4. Quiste de *Acanthamoeba triangularis* (microscopía fotónica, 40x)

El ectoquiste es ovoide, el endoquiste es triangular, con 3 brazos, aproximadamente mide 13 µm. Pertenece al grupo II.

***Naegleria* sp.**

Cuadro 13. Jerarquía taxonómica de *Naegleria* sp.

Reino	Protozoa
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosa - amibas
Orden	Amoebida
Familia	Vahlkampfiidae
Género	<i>Naegleria</i>

Cuadro 14. Jerarquía taxonómica de *Naegleria gruberi*.

<i>Naegleria gruberi</i>	
Reino	Protozoa
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosa - amibas
Orden	Amoebida
Familia	Vahlkampfiidae
Género	<i>Naegleria</i>
Especie	<i>Naegleria gruberi</i>

Naegleria gruberi Schardingner, 1899

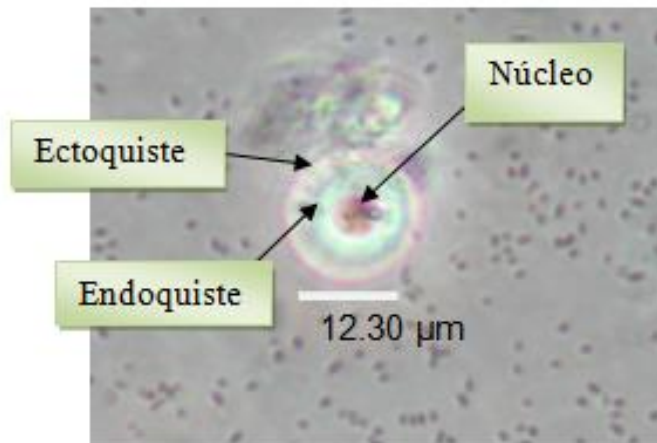


Figura 5. Quiste de *Naegleria gruberi* (Microscopía fotónica, 40x)

El quiste es totalmente liso y está ligeramente engrosado en la zona donde se encuentra el poro, mide aproximadamente de 10-16 μm de diámetro.

Rosculus sp.

Cuadro 15. Jerarquía taxonómica de *Rosculus ithacus*.

<i>Rosculus ithacus</i>	
Reino	Protozoa
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Heterolobosea - amibas
Orden	Schizopyrenida
Familia	Guttulinopsidae
Género	<i>Rosculus</i>
Especie	<i>Rosculus ithacus</i>

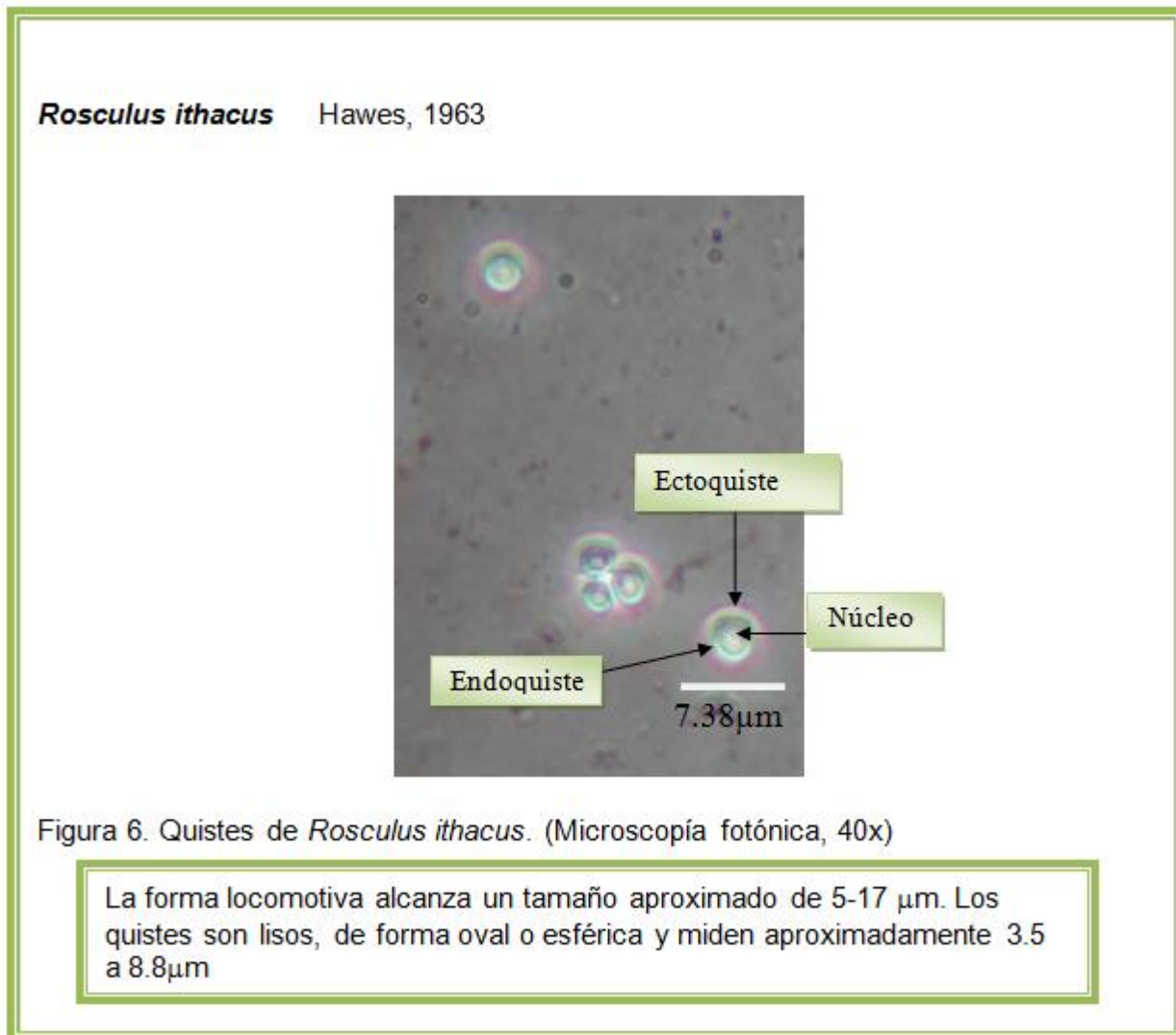


Figura 6. Quistes de *Rosculus ithacus*. (Microscopía fotónica, 40x)

La forma locomotiva alcanza un tamaño aproximado de 5-17 µm. Los quistes son lisos, de forma oval o esférica y miden aproximadamente 3.5 a 8.8µm

Vanella sp.

Cuadro 16. Jerarquía taxonómica de *Vanella* sp.

<i>Vannella</i> sp.	
Reino	Protozoa
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosa - amibas
Orden	Euamoebida
Familia	Vannellidae
Género	<i>Vannella</i>

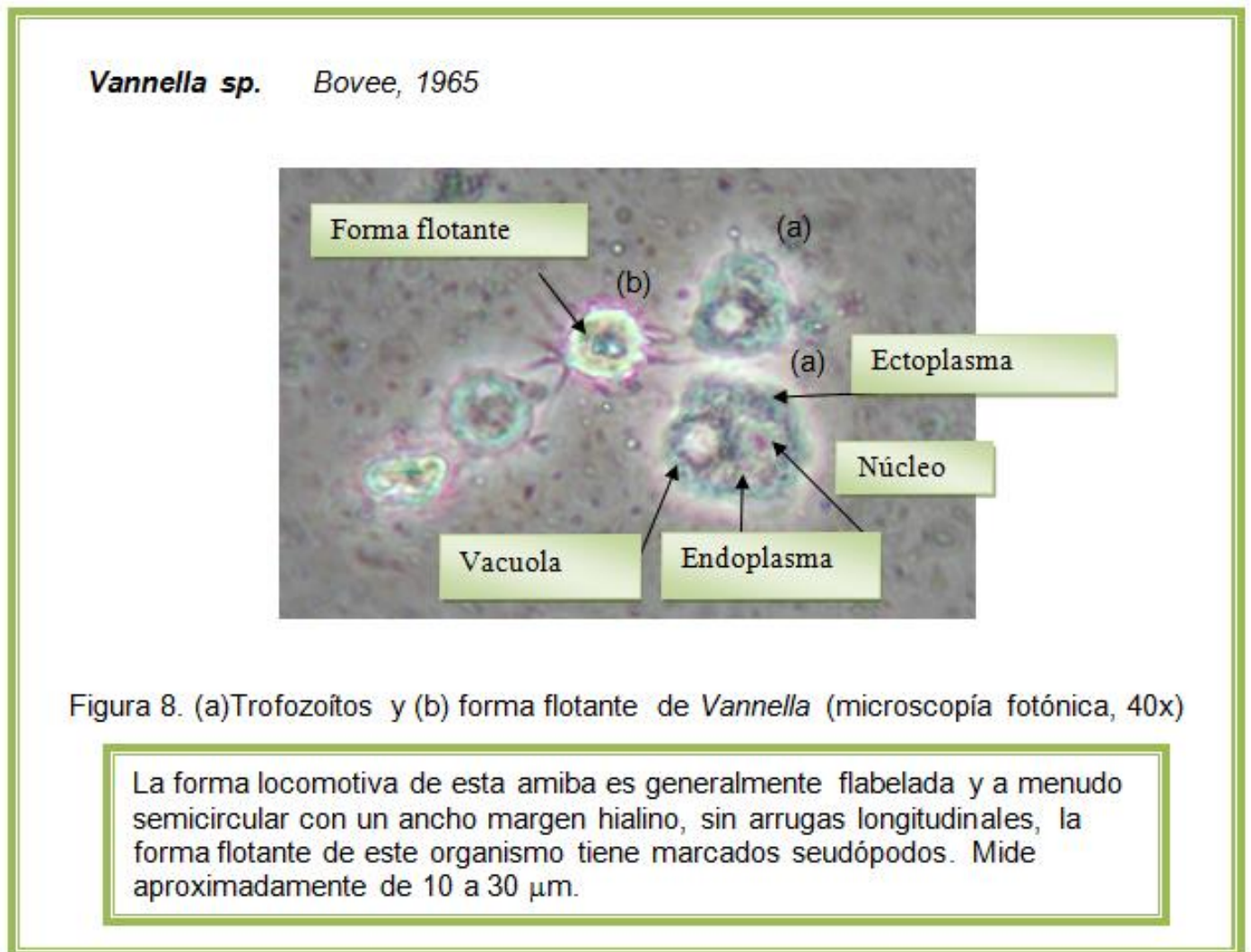


Figura 8. (a) Trofozoitos y (b) forma flotante de *Vannella* (microscopía fotónica, 40x)

La forma locomotiva de esta amiba es generalmente flabelada y a menudo semicircular con un ancho margen hialino, sin arrugas longitudinales, la forma flotante de este organismo tiene marcados pseudópodos. Mide aproximadamente de 10 a 30 μm .

Vahlkampfia sp.

Cuadro 17. Jerarquía taxonómica de *Vahlkampfia ustiana*.

<i>Vahlkampfia ustiana</i>	
Reino	Protozoa
Filo	Protozoa
Subfilo	Sarcodina
Superclase	Rhizopoda
Clase	Lobosa - amibas
Orden	Amoebida
Familia	Vahlkampfiidae
Género	Vahlkampfia
Especie	<i>Vahlkampfia ustiana</i>

Vahlkampfia ustiana Page, 1974

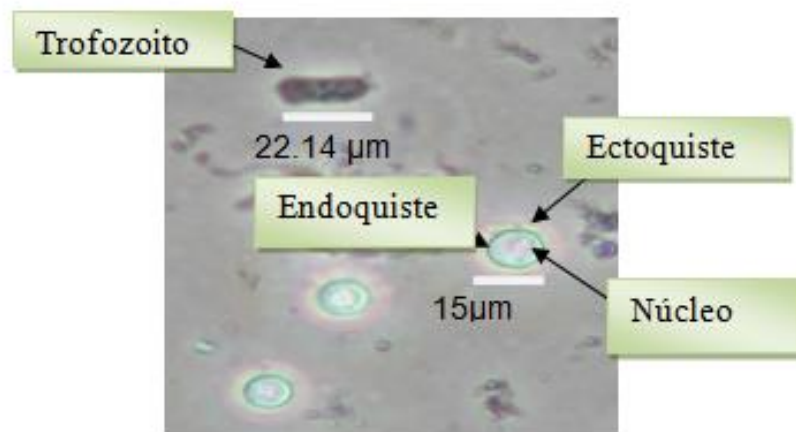


Figura 9. Quistes y trofozoito de *Vahlkampfia ustiana* (Microscopía fotónica, 40x)

El trofozoito mide de 30 a 65 μm, el quiste tiene una forma oval, reniforme o piriforme de forma irregular, pero nunca esférico, mide aproximadamente entre 12-21 μm.

VIII.CONCLUSIONES

La información recabada del estudio de la diversidad de las AVL presentes en hospitales del mundo y en particular en México es muy escasa, lo cual resulta complicado el estudio ya que no se tiene un método estandarizado para la recolección de muestras, el aislamiento y la posterior identificación de las AVL.

El presente, es un estudio pionero que contribuyó al conocimiento de las AVL generando un antecedente de la presencia de estos organismos en cuatro hospitales del estado de Oaxaca y en México.

Se aislaron e identificaron amibas de vida libre a partir del agua y biopelículas de dos hospitales generales y dos hospitales regionales de la Sierra Norte y los Valles Centrales del estado de Oaxaca. Teniendo 12 géneros de AVL, donde los géneros con mayor incidencia fueron *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Vahlkampfia*, lo cual demuestra que el ambiente intrahospitalario no es una limitante para el crecimiento de las AVL, ya que es un lugar que presenta una constante humedad o está en contacto con agua (cisternas, tinacos) y constituye un hábitat ideal para las amibas de vida libre con potencial patógeno como la amiba termófila *Naegleria fowleri* a quien el calentamiento global favorecerá en la colonización de nuevos hábitats (De Jonckheere, 1975; Kyle y Noblet, 1986).

Se identificaron las zonas intrahospitalarias como el área de quirófanos: mesa de cirugía, regaderas de pacientes, aire acondicionado, nebulizadores y sistemas hídricos: agua de cisternas, agua de grifo, agua de regaderas de pacientes, con presencia de amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuatro hospitales del estado de Oaxaca, donde las zonas con mayor población de AVL fueron: el aire acondicionado, seguido de nebulizadores, sistemas hídricos y mesa de instrumental quirúrgico.

Analizado esta situación cabe destacar que el método más usado para administrar los distintos tratamientos aerosoles son los nebulizadores y la contaminación microbiana de estos utensilios está bien documentada y estudiada, se sabe que a pesar de una limpieza y desinfección profunda, alrededor del 70% de los nebulizadores pueden estar contaminados por varios tipos de patógenos.

Por lo que en este trabajo es preocupante la presencia de amibas en todas las muestras obtenidas de nebulizadores, ya que si el análisis de estas amibas mostrara que son patógenas, ello implicaría un riesgo muy alto para la salud sobre todo en aquellos casos de pacientes con inmunodepresión, lo que implicaría un mayor riesgo de infección, aún cuando estas AVL no fueran patógenas se puede volver a mencionar que éstas sirven como reservorios para otros patógenos como bacterias, virus y otros microorganismos.

IX.RECOMENDACIONES

Es de gran importancia tomar una serie de medidas en el control de calidad en la limpieza y desinfección adecuada para evitar la presencia y proliferación de las AVL en ambientes intrahospitalarios.

De manera general se recomienda lo siguiente:

- ❖ Cloración periódica del agua que se distribuye a través del sistema hídrico de los hospitales muestreados.
- ❖ Lavado de las cisternas o tanques donde se almacena el agua que llega directamente a los pacientes para evitar o eliminar las biopelículas que puedan formarse en las paredes de ésta (mínimo cada seis meses)
- ❖ Uso de filtros en los grifos dentro de cada hospital, sobre todo en los que tienen contacto directo los pacientes, además de la sustitución de estos filtros por lo menos dos veces al año.
- ❖ Sería muy recomendable incluir la detección de amibas de vida libre patógenas en las normas de calidad del agua potable de los hospitales.

X.BIBLIOGRAFÍA

Adl,S.,Simpson,A.,Farmer,M.,Andersen,R.,Anderson,R.,Barta,J.,Bowser,S.,Brugerolle,G.,Fensome,R.,Fredericq,S.,James,T.,Karpov,S.,Krugens,P.,Drug,J.,LaneC.,Lewis,L.,Lodge,J.,Lynn,D.,Mann,D.,Mccourt,R.,Mendoza,L.,Moestrup,O.,Mozley-

Standridge,S.,Nerar,T.,Shearer,C.,Smirnov,A.,Spiegel,F.y Taylor, M., 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. **52**(5):399- 451.

Armstrong, M. 2000. The pathogenesis of human *Acanthamoeba* infection. *Infectious Disease Review* **2**:65-73.

Andra, J., Herbst, R., Leippe, M., 2003. Aporesmoeba, archaic effector peptides of protozoan origin are discharged into phagosomes and kill bacteria by permeabilizing their membranes. *Dev. Comp. Immunol.* **27**: 291–304.

Barnes D. R., 1984, *Zoología de los invertebrados*, tercera ed. en español.

Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jiménez, C., 2009. Bacteria and free-living amoeba in the Lascaux Cave. *Res. Microbiol.* **160**: 38–40.

Bagheri H.R., R. Shafie2, F. Shafiei, S.A. Sajjadi, 2010. Isolation of *Acanthamoeba Spp.* from Drinking Waters in Several Hospitals of Iran. *Iranian J Parasitol.* **5**(2)19-25.

Bravo FG, Seas C. 2012. Balamuthia Mandrillaris Amoebic Encephalitis: An Emerging Parasitic Infection. *Curr Infect Dis Rep.* **14** (4):391-396.

Breiman, R. F., B. S. Fields, G. N. Sanden, L. J. Volmer, A. Meier, and J. S. Spika. 1990. Association of shower use with Legionnaires' disease. *JAMA* **263**:2924–2926.

Bonilla P., Ramírez E. 2011. Amibas de vida libre con potencial patógeno. En: Becerril M. A. Parasitología médica. Mc.Graw-Hill Interamericana Editores S.A. de C.V. México, 31-42pp.

Caumo, K. y Rott, M.B.2011.Acanthamoeba T3, T4,T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Tropica*.**117**: 233-235.

Carlesso A.M , Simonetti A.B., Artuso G.L., Rott M.B. 2007 ,Isolation and identification of potentially pathogenic free-living amoebae in samples from environments in a public hospital in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **40**(3):316-320, mai-jun.

Cateau E., Delafont V., Hechard Y., Rodier M.H., 2014. Free-living amoebae: what part do they play in healthcare-associated infections?. *Journal of Hospital Infection* (**87**)131-140.

Centeno, M., F. Rivera, L. Cerva, V. Tsutsumi, E. Gallegos, A. Calderón, R. Ortíz, P. Bonilla, E. Ramírez y G. Suárez, 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Archives of Medical Research*, **27**(4) 579-586.

Charman, D. J. 1999. Testate amoebae and the fossil record: issues in biodiversity. *Journal of Biogeography* **26**:89-96.

Chappell CL, Wright JA, Coletta M, 2001.Newsome AL. Standardized method of measuring *Acanthamoeba* antibodies in sera from healthy human subjects. *Clin Diagn Lab Immunol*. **8**(4):724-30

Chang,C.W.,Wu,Y.C. y Ming,K.W. 2010.Evaluation of real time PCR methods for quantification of *Acanthamoeba* in antropogenic water and biofilms. *Journal of Applied Microbiology*.**109**:799-807

Costerton, J. W., K.-J. Cheng, G. G. Geesey, T. I. Ladd, J. C. Nickel, M. Dasgupta, and T. J. Marrie. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**:435-464

Culbertson, C.G.1975.Soil ameba infection. *Am. J. Pathol.* **63**:475-482

De Jonckheere J F. 1978.Pathogenic free-living amoebae in swimming pools: survey in Belgium. *Ann Microbiol.***130** (2):205–212.

Fenchel, T. 1987. Ecology of Protozoa: The biology of free-living phagotrophic protists. Springer Verlag, Wisconsin. 197 p

Gallegos- Neyra, E. M. 1997. *Amebas de vida libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí*. Tesis Doctoral en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias UNAM. México.130 pp.

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

Gertiser,M.L.,Giagante,E.,Basabe,N.,Rivero,F.,Luján,H.,Occhionero.,Paniccia,L., Visciarelli,E. y Costamagna,S.R. 2010. Queratitis por *Acanthamoeba* sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires,Argentina. *Revista Argentina de Microbiología.***42**: 122-125.

Greub, G. y D. Raoult. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical of Microbiology Review.* **17**:413-433.

Hoffman, R. y Michel,R. 2001. Distribution of free-living amoeba (FLA) during preparation and supply of drinking water. *International Journal of hygiene and environmental health.***203**:215.

John, D. T. 1993. Oportunistically pathogenic free-living amoebae. In Parasitic Protozoa, J. P. Kreier y J. R. Baker (eds.). Academic Press, Nueva York. 140-246p.

Khan, N. A. 2001. Pathogenicity, morphology, and differentiation of *Acanthamoeba*. *Current Microbiology* 43:391-395.

Khan, N. A. 2009. *Acanthamoeba: Biology and pathogenesis*. Caister Academic Press. Norfolk, UK. 271 p.

Kilvington, S., P. G. Mann y D. C. Warhurst. 1991a. Pathogenic *Naegleria* amoebae in the waters of Bath, a fatality and its consequences. *In* Hot Springs of Bath, G. A. Kellaway (ed.). Bath City Council, Reino Unido. p. 89-96.

Kilvington, S., J. R. Beeching y G. D. White. 1991b. Differentiation of *Acanthamoeba* strains from infected corneas and the environment by using restriction endonuclease digestion of whole cell DNA. *Journal of Clinical Microbiology* 29:310-314.

Kilvington S, Gray T, Dart J, Morlet N, Beeching JR, Frazer DG. 2004. *Acanthamoeba* keratitis: the role of domestic tap water contamination in the United Kingdom. *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, **45**(1):165-9p.

Kyle, D. E. y G. P. Noblet. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoebae. *Journal of Protozoology* 33:422-434.

Lorenzo-Morales, J., F. Marciano-Cabral, J. F. Lindo, G. S. Visvesvara y S. K. MacIver. 2010. Pathogenicity of amoebae. *Experimental Parasitology* 126:2-3.

Martínez, A. J., Dos Santos. J.G., Nelson, E.C., Stamm, W.P. y Willaert E. 1977. Primary amoebic meningoencephalitis. *In* :Sheldon, S.S. y Rosen. P.P. N.Y. *Pathology Annual* Parte 2. **12**: 225-248.

Martínez, A. J. 1985. Free-living amebas: natural history prevention, diagnosis, pathology and treatment of disease. CRC Press, Boca Ratón. 156 p.

Méndez, R. M., Ramírez, E., P. Bonilla y Ortiz, R., 1996. Amibas de vida libre de la familia Leptomyxidae como causa de septicemia. En Memorias del XII Congreso Nacional de Parasitología, Aguascalientes, Ags., México.

Marciano-Cabral, F., Han, K., Powell, E., Ferguson T. Cabral, G. 2003. Interactions of an *Acanthamoeba* human isolate harboring bacteria with murine peritoneal macrophages. *J. Eukariotic Microbiology*. **50**:516-519

Magnet, A., Galvan, A. L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernandez-Vadillo, C., Perez-Irezabal, J., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G. S., Da Silva, A. J. y Del Aguila, C. 2012. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitology Research*. **111** (1):383-892pp

Martinez, A. J. 1985. *Free-living Amebic: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology and Treatment of Disease*. Press. Boca Raton, Florida. 156 pp.

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

Michel R, Burghardt H, Bergmann H. 1995. *Acanthamoeba*, naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg Umweltmed*. **196**(6):532-44.

Niyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Mohebbi M, Maghsood AH. 2009. Genotyping of *Acanthamoeba* isolates from clinical and environmental specimens in Iran. *Exp Parasitol.*; **121**(3):242-5.

Lorenzo-Morales J, Lindo JF, Martinez E, Calder D, Figueruelo E, Ildares B, et al. 2005. Pathogenic *Acanthamoeba* strains from water sources in Jamaica, West Indies. *Ann Trop Med Parasitol.*; **99**(8):751-8.

Ovrutsky AR, Merkel PA, Schonteich E, Bai X, Kinney W, Iseman MD, Kartalija M, Knight V, Chan ED. 2013. Patients with non-tuberculous mycobacterial lung disease have elevated transforming growth factor-beta following ex vivo stimulation of blood with live *Mycobacterium intracellulare*. *Scand J Infect Dis*. Sep;**45**(9):711-4

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

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

Page, F. C. 1976b. Some comparative notes on the occurrence of *Gimnamoebia* (Protozoa: Sarcodina) in British and American habitats. *Transactions of the American Microscopical Society* **95**:385-394.

Page, F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae*, Freshwater Biological Association. Cumbria, England. 122 pp.

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

Robinson B., 1992. Manual of analytical methods. Protozoology. SWL Report no.39

Rohr U., Weber S., Michel R., Selenika F., and Wilhem M. 1998. Comparison of Free-Living Amoebae in Hot Water Systems of Hospitals with Isolates from Moist Sanitary Areas by Identifying Genera and Determining Temperature Tolerance. *Applied and environmental microbiology.* **64** (5): 1822-1824.

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

Sanden, G. N., W. E. Morrill, B. S. Fields, R. F. Breiman, and J. M. Barbaree. 1992. Incubation of water samples containing amoebae improves detection of legionellae by the culture method. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**:2001–2004.

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

Shoff, M., Rogerson, A., Kessler, K., Schatz, S., Seal, D. 2008. Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South of Florida domestic water. *Journal of water and health.* **6**(1):99-104.

Sigala-Regalado, I. y R. Mayén-Estrada. 2008. Diversidad y aspectos ecológicos de protozoos en el Sistema Xaltégoxtli I, Puebla, México. *Mundos Subterráneos* **18-19**:1-7.

Simpson, A. G. B. y A. Roger. 2004. Excavata and the origin of the amitochondriate eukaryotes. *In* *Organelles, genomes and eukaryotic phylogeny*, P. H. Hirt y D. S. Horner. CRC Press, Boca Raton. p. 27-53.

Smirnov, A. y A. Goodkov. 1999. An illustrate list of basic morphotypes of *Gymnamoeba* (Rhizopoda, Lobosea). *Journal of Protistology* **1**:20-29.

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

Thomas, V., Rimann, K.H., Blanc, D.S., Greub, G., 2006. Biodiversity of amoebae and amoeba-resisting bacteria in a hospital water network. *Appl. Environ. Microbiol.* **72** (4), 428–2438.

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

Tyndall, R.L., Domingue, E.L., 1982. Cocultivation of *Legionella pneumophila* and freeliving amoebae. *Appl. Environ. Microbiol.* **44** (4), 954–959.

Turkmen, A., 2012. Microbiological Analysis of Water and Biofilm Specimens Taken from Swimming Pools in Istanbul. MSc., Istanbul University, Istanbul.

Ustunturk, M., Zeybek, Z., 2012. Microbial contamination of contact lens storage cases and domestic tap waters of contact lens wearers. *Wien. Klin. Wochenschr.* **124**: 17–22.

Visvesvara, G.S y Stehr G.J., 1990. Epidemiology of Free-Living Ameba Infections. *J Protosod.*, **37**(4), 1990, pp. 294-333

Visvesvara, G. S., Schuster, F. L. & Martinez, A. J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. Sp., agent of amebic meningoencephalitis in human and other animals. *J Euk Microbiol* . **40**(4):504-514.

Visvesvara G.S., Maguire J.H. (2006) Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea*. *Tropical Infectious Diseases*, Vol. **2** (Guerrant R.L., Walker D.H., Weller P.F., eds), pp. 1114–1125. Churchill Livingstone.

Visvesvara, G.S., Moura, H. y Schuster, F.L. 2007 Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri y Sappinia diploidea*. *Federation of European Microbiological Societies* **50**: 1-26

Wang, X., Ahearn, D.G., 1997. Effect of bacteria on survival and growth of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr. Microbiol.* **34**: 212–215.

Wadowsky, R.M., Butler, L.J., Cook, M.K., Verma, S.M., Paul, M.A., Fields, B.S., Keleti, G., Sykora, J.L., Yee, R.B., 1988. Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of Hartmannellid amoebae as growth factors. *Appl. Environ. Microbiol.* **54** (11), 2677–2682.

Walochnik J, Wylezich C, Michel R. 2010. The genus *Sappinia*: history, phylogeny and medical relevance. *Exp Parasitol.* **126**(1):4-13.

XI ANEXOS

XI.ANEXOS

Anexo 1. Medio de cultivo para amibas de vida libre

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

Reactivos

- NaCl0.12g
- MgSO₄·7H₂O0.004g
- NA₂HPO₄0.146g
- CaCl₂·7H₂O0.004g
- KH₂PO₄.....0.136g
- Bactoagar15g
- Agua destilada1000ml

Procedimiento

- ✚ Mezclar los componentes en seco, primero se agregan 500 ml y se agita hasta homogenizar la solución, posteriormente se afora a 1l.
- ✚ Calentar hasta la ebullición y disolver el agar.
- ✚ Esterilizar a 121 °C durante 15 min.
- ✚ Verter en una placa Petri (15 a 20 ml).
- ✚ Al solidificar el agar, se colocan tres gotas de un cultivo puro de *Enterobacter aerogenes* inactivado por calor y se distribuyen homogéneamente con un asa de vidrio estéril.
- ✚ Se deja reposar aproximadamente una hora.
- ✚ Se refrigera de manera invertida en una bolsa plástica hasta que se requiere.

Anexo 2. Preparación de *Enterobacter aerogenes*

La bacteria se utiliza para enriquecer el medio NNE.

- ✚ Se prepara agar nutritivo diluido en agua destilada.
- ✚ Se esteriliza el medio a 15 lb y a 121 °C durante 20 minutos.
- ✚ Se vacía en cajas de Petri y se deja reposar hasta que gelifican. Una vez gelificado el medio, con ayuda de un hisopo, se coloca y distribuye en toda la superficie un poco de bacteria, asegurándose que la bacteria cubra toda la superficie del agar, posteriormente se incuban a 37 °C por 24 horas.
- ✚ Para cosechar la bacteria después de las 24 horas, se agrega agua destilada a las cajas y con la varilla de vidrio se barre la superficie del agar y se concentra la bacteria para recolectarla posteriormente con pipetas Pasteur. La bacteria cosechada se deposita en tubos de ensayo estériles con tapa.
- ✚ Para inactivar a la bacteria viva se colocan los tubos en la autoclave a 121 °C por 5 minutos.
- ✚ Una vez inactivada, la bacteria se guarda en el refrigerador hasta su uso.

Anexo 3. Norma oficial mexicana NOM-045-SSA2-2005. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales

Las enfermedades relacionadas con la contaminación del agua de consumo tienen una gran repercusión en la salud de las personas, en particular las hospitalizadas.

Es por esto que las medidas destinadas a mejorar la calidad del agua de consumo proporcionan beneficios significativos para la salud.

En México estas medidas están indicadas en la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-045-SSA2-2005. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de las infecciones nosocomiales, específicamente en 10.6.7.10 Vigilancia de la calidad de la red de agua corriente hospitalaria (2005).

La vigilancia epidemiológica de las infecciones nosocomiales se inscribe dentro de estos propósitos al permitir la aplicación de normas, procedimientos, criterios y sistemas de trabajo multidisciplinario para la identificación temprana y el estudio, prevención y control de las infecciones de este tipo. Constituye un instrumento de apoyo para el funcionamiento de los servicios y programas de salud que se brindan en los hospitales.

Actualmente se reconoce la necesidad de consolidar los mecanismos vigentes de vigilancia epidemiológica y ampliar su cobertura mediante el manejo ágil y eficiente de la información necesaria para la prevención y el control de las infecciones nosocomiales, por lo que se considera indispensable homogeneizar los procedimientos y criterios institucionales que orienten y faciliten el trabajo del personal que se encarga de estas actividades dentro de los hospitales.

Las infecciones nosocomiales representan un problema de gran importancia clínica y epidemiológica debido a que condicionan mayores tasas de morbilidad y mortalidad.

Dentro de los parámetros bacteriológicos y fisicoquímicos establecidos por las Directrices Internacionales (OMS) se encuentran los siguientes:

Cuadro 18. Parámetros críticos en agua potable de los nosocomios.

Parámetro **Rango aceptable**

Coliformes fecales	0/100ml
Turbidez	< 5 NTU
Desinfectante residual	0.2-0.5 mg/l
pH	6.5-8.5