



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**RIQUEZA ESPECÍFICA DE AMIBAS DE VIDA LIBRE  
POTENCIALMENTE PATÓGENAS DE LAGUNA  
LARGA, MICHOACÁN**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**B I Ó L O G O**

**PRESENTA:**

**LUIS RODRIGO TAMÉZ HERNÁNDEZ**

**DIRECTORA DE TESIS:**

**D. en C. ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA**

**LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2018**





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.

## AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto de investigación está dedicado a mis padres, quienes me han enseñado que cualquier meta es alcanzable con responsabilidad y pasión por lo que uno hace. A mi papá, quién le enseñó a trabajar duro y a ser disciplinado para alcanzar mis objetivos. A mí abuelita Rayo de Luna por apoyarme y cuidarme a lo largo de mi vida, a mí abuelito Alfredo por acercarme desde mi niñez a la ciencia e inculcar en mí la pasión por la investigación científica. Sin ustedes, no habría podido llegar hasta dónde estoy ahora, gracias.

Agradezco a todos mis profesores y amigos que han contribuido a mi formación personal y académica. Sobretodo a mi amigo Miguel Ángel Beltrán Villanueva por haber colaborado en la presente investigación y en muchos otros proyectos tanto académicos como personales a lo largo de la licenciatura y su familia por apoyarnos siempre. A los profesores Saharay Gabriela Cruz Miranda y Luis Enrique Páez Gerardo quienes brindaron su valiosa amistad, apoyo y conocimiento que despertaron en mí la pasión por esta maravillosa e increíble profesión.

Le soy gracias a la Dra. Elvia Gallegos Neyra por su amistad, tiempo y confianza brindada durante mi estancia en el laboratorio y por su supervisión del presente proyecto de investigación. Alós doctores Luz Gloria Paniagua Contreras y Eric Monroy Pérez, al maestro José Luis Viveros Legorreta y al biólogo José Ángel Lara Vázquez por la supervisión brindada.

A los biólogos Armando Corona y Jimena Mendoza y mis compañeros Víctor, Mauricio, Monserrat y América por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio.

Finalmente agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por poner a mi alcance los espacios y medios necesarios para mi desarrollo académico y profesional. Es un orgullo poder pertenecer a la mejor institución educativa de México y poder honrarla a lo largo de mi vida profesional y personal.

*"Seguimos avanzando, abriendo nuevas puertas y haciendo cosas nuevas,  
porque somos curiosos y la curiosidad nos lleva por caminos nuevos"*

*-Walt Disney-*



## CONTENIDO

I. Introducción .....	01
1. Amibas de vida libre.....	01
2. Taxonomía.....	04
3. Amibas de vida libre potencialmente patógenas.....	06
3.1 <i>Naegleria fowleri</i> .....	06
3.1.1 Características morfológicas de <i>Naegleria fowleri</i> .....	06
3.2 <i>Acanthamoeba</i> spp.....	08
3.2.1 Características morfológicas de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	10
3.3 <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	11
3.3.1 Características morfológicas de <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	11
3.4 <i>Sappinia</i> .....	12
3.4.1 Características morfológicas de <i>Sappinia pedata</i> .....	12
4. Ciclos de vida.....	14
5. Infecciones amibianas del sistema nervioso central por amibas de vida libre.....	15
5.1 Meningoencefalitis amibiana primaria.....	15
5.2 Encefalitis amibiana granulomatosa.....	16
6. Infecciones derivadas por amibas de vida libre.....	17
6.1 Queratitis amibiana.....	17
6.2 Infección cutánea por <i>Acanthamoeba</i> spp.....	18
6.3 Infección cutánea por <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	18
7. Epidemiología por amibas de vida libre en México.....	19
II. Antecedentes .....	20
1. Registro de amibas de vida libre en el mundo.....	20
2. Registro de amibas de vida libre en México.....	22



III. Justificación.....	26
IV. Objetivos.....	28
1. Objetivo general.....	28
2. Objetivos particulares .....	28
V. Área de estudio.....	29
1. Ubicación .....	29
2. Descripción general del balneario Laguna Larga, Los Azufres.....	29
VI. Materiales y métodos.....	32
1. Trabajo en campo.....	32
1.1 Recolección y transporte de muestras.....	32
1.2 Registro de factores fisicoquímicas del agua “ <i>in situ</i> ” y transporte.....	32
1.2.1 Temperatura del agua.....	33
1.2.2 pH.....	33
1.2.3 Conductividad.....	33
2. Trabajo en laboratorio.....	33
2.1 Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre.....	33
2.1.1 Biopelículas y sedimento.....	33
2.2 Clonación.....	34
2.3 Identificación morfológica de las amibas de vida libre.....	34
2.4 Análisis estadístico.....	34
VII. Resultados y discusión.....	35
1. Aislados amibianos.....	35
2. Posición taxonómica de las especies de amibas de vida libre potencialmente patógenas registradas.....	41
3. Descripción y registro fotográfico de amibas de vida libre potencialmente patógenas .....	43
4. Parámetros fisicoquímicos del agua.....	48



5. Análisis estadísticos.....	53
5.2 Análisis de vairanza.....	53
5.1 Índice de Jaccard.....	54
VII. Conclusiones.....	56
IX. Literatura citada.....	58
X. Anexos.....	72
1. Anexo 1. Casos de infecciones por amibas de vida libre en el país.....	72
2. Anexo 2. Descripción taxonómica de AVL del balneario Laguna Larga, Los Azufres.....	77
3. Anexo 3. Parámetros fisicoquímicos del balneario Laguna Larga.....	86
4. Riqueza específica de amibas de vida libre del balneario Laguna Larga, Los Azufres.....	89
5. Anexo 5. Soluciones e infusiones para medios de cultivo semisólido y líquido.....	91



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre (AVL), son un grupo de protozoos que se ha encontrado en toda la biosfera incluyendo los glaciares del continente antártico. Habitan principalmente sistemas acuáticos tales como: ríos, arroyos, lagos, estanques, estuarios, plantas de tratamiento de agua residual, piscinas e incluso en agua embotellada y de uso doméstico, se les puede encontrar en las interfases: agua-suelo, agua-plantas agua-aire y agua-animal. Presentan dos fases durante su ciclo de vida: “trofozoíto” (vegetativa) y “quiste” (resistencia) a excepción de *Naegleria fowleri* y otros valkanfidos, que presenta una tercera etapa conocida como fase flagelada (Lares, 2010; Gallegos, 2014; Niyyati, 2018).

Las amibas de vida libre son organismos termófilos, ya que cuando la temperatura del agua es elevada, favorece su proliferación, por lo que su presencia en aguas termales naturales y contaminadas por descargas industriales es muy común. Estos protozoos son capaces de sobrevivir a temperaturas extremas que oscilan entre los 4 y 45 °C y otras condiciones que pueden llegar a ser extremas tales como presión, humedad, altitud y radiación solar. Debido a estas características se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza (Rivera, 1993; Ávila, 2007). Las AVL han demostrado resistencia a desinfectantes como el cloro, dióxido de cloro, ozono, entre otros dificultando la desinfección en ambientes contaminados (Carlesso, 2007). Las AVL no dependen de un huésped para su transmisión, son protozoos que por su capacidad de sobrevivir en vida libre y como endoparásitos facultativos se han clasificado como “anfízóicos” (Schuster, 2004; Visvesvara, 2007, 2008; Scheid, 2018).

El estudio de las AVL ha indicado que son un grupo con una gran importancia ecológica debido al papel que desempeñan en el ciclo de nutrientes y en el circuito microbiano de las comunidades naturales acuáticas, alimentándose y asociándose con bacterias, algas, diatomeas, hongos, virus y otros protozoos, además desempeñan un papel importante en el ciclo del nitrógeno y fósforo (Ávila, 2007; Scheid, 2018). En años recientes se ha reconocido que las



AVL pueden interactuar con una amplia variedad de microorganismos, especialmente las bacterias, con varias especies de importancia médica, las cuales pueden resistir los procesos de fagocitosis y crecer intracelularmente en el protozoo, algunas de dichas especies son: *Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter jejuni*, *Clamydophila pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Vibrio cholerae*, entre otras (Thomas, 2010). Ecke y colaboradores en el 2005, elaboraron una amplia lista de las asociaciones entre bacterias y estos protozoos.

Las amibas de vida libre reconocidas como potencialmente patógenas (AVLPP) y oportunistas para el ser humano se restringen a varias especies del género *Acanthamoeba*, así como: *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia diploidea* y *Vermamoeba vermiformis* (Martínez, 1997; Schuster, 2004; Visvesvara, 2007, 2008, 2013; Gallegos, 2014; Visvesvara, 2014; Yamanouchi, 2018). En relación con el huésped, los factores que parecen ser determinantes para que la infección tenga lugar son: la temperatura corporal, dosis infectiva, respuesta inmune a nivel de mucosas, deficiencias inmunológicas y de virulencia, siendo más frecuente en adultos jóvenes hombres (Ávila, 2007).

Varias especies de AVL han destacado en el ámbito médico, ya que se han establecido como agentes causales de infecciones del Sistema Nervioso Central (SNC) con cuadros clínicos diversos, agudos y casi siempre mortales (Oddó, 2006; Thomas, 2010; Gallegos, 2014). Se reconocen cinco manifestaciones clínicas debidas a las AVL: 1) Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), 2) Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), 3) Queratitis amibiana (QA), 4) Amebiosis cutánea (AC) y 5) Amebiosis diseminada (Marciano-Cabral, 2003; Hall, 2012). Las patologías que causan algunas AVL se muestran en el Cuadro 1.



<b>Género</b>	<b><i>Acanthamoeba spp</i></b>			<b><i>Balamuthia mandrillaris</i></b>	<b><i>Naegleria fowleri</i></b>
Infección	EAG	Queratitis amibiana	Amebiosis cutánea	EAG	MEAP
Vías de entrada	Epitelio olfatorio senos paranasales, tracto respiratorio, piel	Abrasión corneal	Lesiones cutáneas, sinusitis	Lesiones cutáneas, sinusitis	Epitelio olfatorio
Periodo de incubación y manifestaciones clínicas	Semanas-meses. Confusión, dolor de cabeza, rigidez de cuello, irritabilidad	Días. Visión borrosa, fotofobia, inflamación, anillo corneal	Semanas-meses. Lesiones en la piel, nódulos, lesiones en senos paranasales, sinusitis	Semanas-meses. Debilidad muscular, dolor de cabeza, náusea, convulsiones	Días. Dolor de cabeza, náuseas, confusión, fiebre, rigidez de cuello
Patología	Necrosis focal, granuloma	Ulceración de la córnea	Granulomas en la piel, inflamación	Múltiples focos necróticos, inflamación, edema cerebral	Necrosis hemorrágica
Diagnosís	Biopsia cerebral, frotis, LCR*/preparación húmeda, cultivo IIF*, PCR*	Raspado corneal, biopsia corneal, microscopía confocal	Biopsia de lesiones cutáneas, cultivo IIF* de tejido	Biopsia cerebral, cultivo celular en mamíferos, IIF* de tejido	Biopsia cerebral, preparación húmeda de LCR*, IIF* de tejido, PCR*

Cuadro 1. Patologías que causan algunos géneros y especies de AVL (Marciano-Cabral, 2003)

\*LCR. Líquido cefalorraquídeo. PCR. Reacción en cadena de la polimerasa. IIF. Prueba serológica.



## 2. Taxonomía

Los protozoos son eucariontes cuya clasificación se basó por muchos años en caracteres morfológicos, sin embargo, en estudios taxonómicos modernos se ha demostrado que se trata de un grupo polifilético. Adl y colaboradores en el 2018 reclasificaron a los eucariontes en general basándose en análisis poligenéticos y filogenias basadas en el rRNA, agrupando a las amibas en cuatro super grupos: Amebozoa, Opisthokonta, Excavata y SAR (Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria) (Fig. 1).

En el supergrupo Amebozoa (Lühe 1913; Cavalier Smith, 1998) se incluyen a amibas desnudas o tecadas con crestas mitocondriales tubulares y a menudo ramificadas, dichas amibas pueden ser uninucleadas, binucleadas o multinucleadas, la formación de quistes es común, son de morfología variable, pueden presentar reproducción sexual o asexual y presentan pseudópodos no eruptivos de forma variable.

El supergrupo Opisthokonta (Cavalier Smith; 1987, Adl, *et al.*, 2005) incluye a los organismos con un único núcleo posterior sin mastigonemas presente en al menos una etapa de su ciclo de vida, poseen un par de centriolos usualmente modificados, con crestas mitocondriales planas. En este grupo se han incluido animales, hongos, algunos protistas flagelados, ameboides y esporozoos.

El supergrupo SAR deriva del acrónimo de tres grupos pertenecientes al clado: Stramenopiles (Cleve, 1873), Alveolata (Nanney y McCoy, 1976) y Rhizaria (Moestroup y Sengco, 2001):

- **Stramenopiles.** En este grupo se incluyen organismos que presentan motilidad, son usualmente biciliadas, poseen típicamente un cilio anterior con mastigonemas dispuestos en dos hileras y un cilio posterior, las crestas mitocondriales son tubulares.
- **Alveolata.** Se caracteriza por poseer alveolos corticales, tiene crestas mitocondriales tubulares o ampuliformes. En este grupo se incluyen organismos que tienen cilios o flagelos, pueden ser de vida libre o parasítica.



- **Rhizaria.** Incluye a organismos con pseudópodos finos simples, ramificados o anastomosados.

El supergrupo Excavata incluye a amibas que en algunos casos pueden tener una fase flagelada en su ciclo de vida. En este grupo predominan los pseudópodos eruptivos.

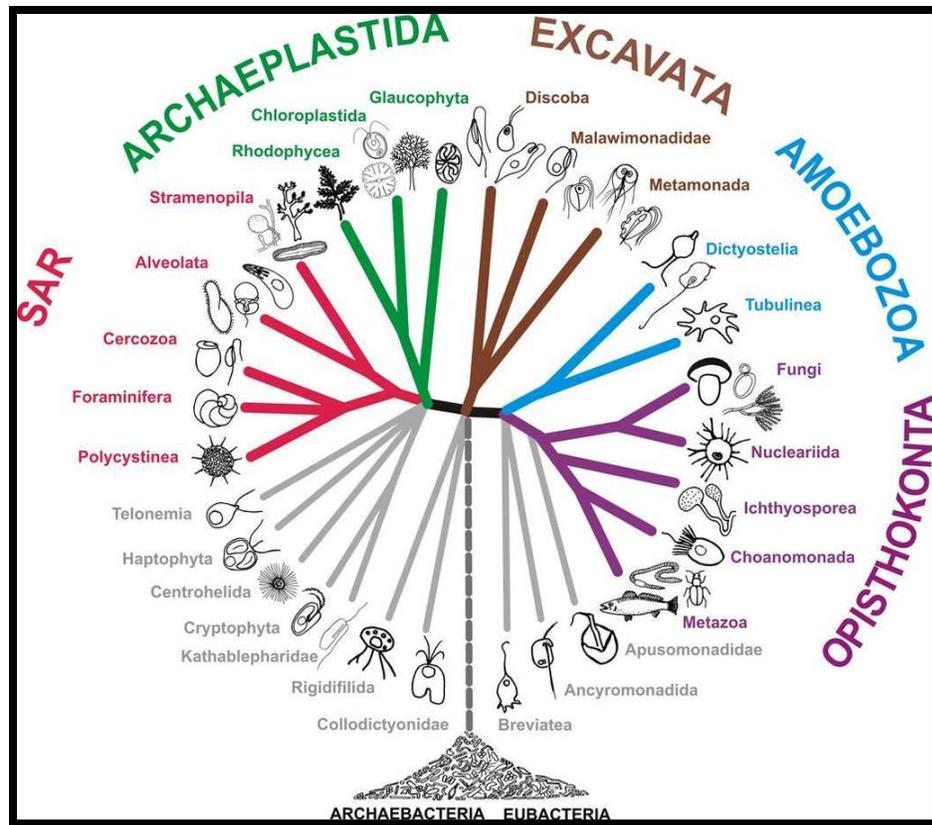


Figura 1. Clasificación filogenética de los eucariontes, las amibas quedan agrupadas en los supergrupos: SAR, Excavata, Amebozoa y Opisthokonta (Adl *et al.* 2018).



### 3. Amibas de vida libre potencialmente patógenas

#### 3.1 *Naegleria fowleri*

*Naegleria fowleri* ha sido aislada de muestras de agua provenientes de albercas, lagos, suministros domésticos, drenaje, aire atmosférico y acondicionado, sistemas de humidificación, cultivos celulares, aguas termales, y ha sido también aislada del epitelio nasal de individuos clínicamente sanos (Rivera, 1984, 1986; Marciano-Cabral, 1988). Esta amiba prolifera en verano cuando la temperatura ambiental aumenta, además la presencia de bacterias y materia orgánica suspendida en el agua pareciera tener una correlación con la incidencia de *N. fowleri*. Se han aislado cepas patógenas en agua con temperaturas oscilantes entre los 10-45 °C, en lodo a 16 °C y suelo a 8 °C. (Marciano-Cabral, 1988; De Jonckheere, 2002; Martínez-Castillo, 2016).

Debido a la naturaleza termofílica de *Naegleria fowleri*, se ha postulado recientemente que la incidencia y epidemiología de podría ser considerado como indicador de cambio climático (Cope, 2016). Fue hasta 1965 que este protozoo fue reconocido como patógeno para el ser humano (Fowler y Carter, 1965). Se ha reportado presente en todos los continentes a excepción de la Antártida (De Jonckheere, 2014).

#### 3.1.1 Características morfológicas de *Naegleria fowleri*

- **Trofozoíto:** mide de 10-25  $\mu\text{m}$ ., tiene un patrón de locomoción predominantemente monopodial llevado a cabo por proyecciones eruptivas del citoplasma llamadas pseudópodos. En su porción terminal posee un uroide, que en ocasiones puede presentar filamentos terminales a los cuales las bacterias se adhieren para ser ingeridas por el protozoo. Presenta también unas “copas alimenticias” o amebostomas, los cuales pueden funcionar también como organelos de anclaje. El citoplasma exhibe un gran número de ribosomas, mitocondrias, vacuolas contráctiles y alimenticias. El núcleo es evidente, contiene un nucléolo prominente y su envoltura nuclear posee varios poros (Marciano-Cabral, 1988; Visvesvara, 2008; Martínez-Castillo, 2016) (Fig. 2 A).



- **Quiste:** es la forma de resistencia es esférica, tiene una doble pared y mide aproximadamente 20  $\mu\text{m}$ ., de diámetro con uno o dos poros planos (Martínez-Castillo, 2016) (Fig. 2 B).
- **Fase de ameboflagelar:** mide de 10-16  $\mu\text{m}$ . también posee un núcleo que contiene a un gran nucléolo. Usualmente presenta dos flagelos anteriores (Chalmers, 2014). Durante esta etapa *N. fowleri* no se reproduce ni forma quistes (Siddiqui, 2016) (Fig. 2 C).

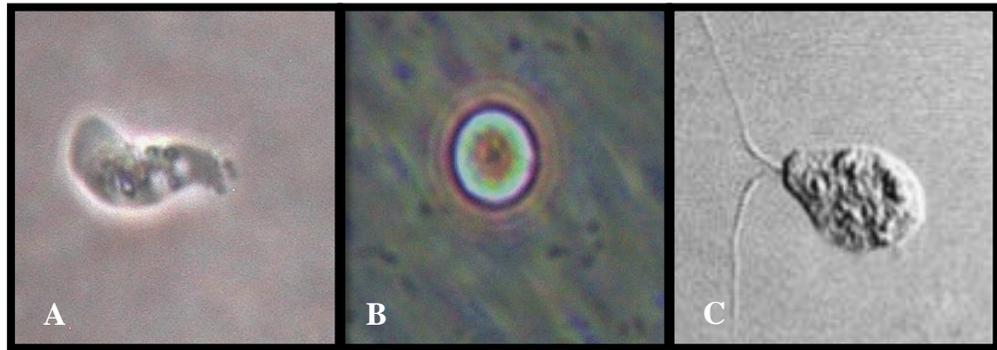


Figura 2. Fases del ciclo de vida de *Naegleria fowleri*. Trofozoíto (A), quiste (B) (Taméz-Hernández, 2016) y ameboflagelado, (C) (tomado de Visvesvara, 2007).



### 3.2 *Acanthamoeba* spp

*Acanthamoeba* spp. puede ser considerada como un patógeno oportunista contra el ser humano debido a que algunas especies ocasionan infecciones en el sistema nervioso central, las cuales han demostrado una tasa de mortalidad del 90 % o bien, pueden provocar queratitis o infecciones diseminadas a los pulmones, piel, próstata, tiroides, vejiga o útero en individuos inmunocomprometidos (Khan, 2001; Jeong, 2007; Visvesvara, 2010; Baig, 2015). En el ciclo de vida de *Acanthamoeba* se incluyen dos fases: la vegetativa o trófica y de resistencia. Durante la etapa trófica, la amiba se alimenta de algas, bacterias, partículas orgánicas, células humanas y se reproduce por fisión binaria (Khan, 2008). Los quistes han demostrado ser muy resistentes a agentes antifúngicos, antibacteriales y antivirales, toleran un amplio rango de temperatura, pH, osmolaridad, desecación y falta de alimento, lo que puede explicar su ubicuidad (Bonilla, 2010).

El género *Acanthamoeba* fue establecido en 1931 (Visvesvara, 1991) y desde entonces hubo una gran discusión en torno a su taxonomía, ya que esta fue basada únicamente en la morfología de los trofozoítos y quistes. Statford y Griffin en 1978, demostraron experimentalmente que las identificaciones no podían basarse únicamente en caracteres morfológicos, ya que la forma de los quistes de muchas especies de *Acanthamoeba* pueden variar de acuerdo con las condiciones en las que son cultivados. Fue hasta 1978 cuando De Jonckheere y Page aceptaron y modificaron una clasificación propuesta por Pussard y Pons en 1977 (Cuadro 2). Se agregaron algunas modificaciones a dicha clasificación, en las que se pueden mencionar: perfiles isoenzimáticos y polimorfismos del ADN mitocondrial.



Cuadro 2. Subclasificación de quistes de *Acanthamoeba* spp de acuerdo con las características morfológicas propuestas por Pussard y Pons en 1977 y modificadas por De Jonckheere (1978).

Grupo	Morfología	Estructura del quiste	Especies de <i>Acanthamoeba</i>
I	Se caracteriza por ser trofozoítos y quistes grandes. El diámetro del quiste es de $\geq 18 \mu\text{m}$ . El ectoquiste es liso o ligeramente rugoso, el endoquiste tiene forma de estrella y se une al ectoquiste al final de cada brazo.		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. astronyxis</i></li> <li>• <i>A. comandoni</i></li> <li>• <i>A. echinulata</i></li> <li>• <i>A. tubiashi</i></li> </ul>
II	El diámetro del quiste es de $< 18 \mu\text{m}$ . En este grupo se incluyen las especies que son aisladas con mayor frecuencia en los estudios de este género. El ectoquiste puede estar muy cerca del endoquiste o ampliamente separado. El ectoquiste puede ser grueso o delgado, usualmente es rugoso o mamilar. El endoquiste puede tener forma de estrella, ser poligonal, triangular o en ocasiones oval o redondo, a veces, los brazos no llegan a desarrollarse en su totalidad.		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. polyphaga</i></li> <li>• <i>A. rhyodes</i></li> <li>• <i>A. griffini</i></li> <li>• <i>A. hatchetti</i></li> <li>• <i>A. triangularis</i></li> <li>• <i>A. divionensis</i></li> <li>• <i>A. paradiionensis</i></li> <li>• <i>A. quina</i></li> <li>• <i>A. mauritaniensis</i></li> <li>• <i>A. lugdunensis</i></li> </ul>



Cuadro 2. Subclasificación de quistes de *Acanthamoeba* spp de acuerdo con las características morfológicas propuestas por Pussard y Pons en 1977 y modificadas por De Jonckheere (1978).

<p><b>III</b></p>	<p>El diámetro del quiste es de &lt;math&gt;&lt;18\ \mu\text{m}&lt;/math&gt;. El quiste es parcialmente ondulado o liso. El endoquiste es totalmente redondo, pero puede tener de tres a cinco esquinas. En este grupo se deben de tomar en cuenta otros aspectos para la identificación de las especies, tales como antígenos y diferencias en isoenzimas</p>		<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>A. culbertsoni</i></li> <li>• <i>A. palestinensis</i></li> <li>• <i>A. pustulosa</i></li> <li>• <i>A. royreba</i></li> <li>• <i>A. lenticulata</i></li> </ul>
-------------------	--	--	---

### 3.2.1 Características morfológicas

- Trofozoíto: puede adoptar diferentes formas, principalmente aplanada, sin embargo, su principal característica es la formación de proyecciones citoplasmáticas muy finas y delgadas llamadas acantópodos. La amiba normalmente tiene un diámetro que varía entre los 12 y 35  $\mu\text{m}$ , sin embargo, se ha demostrado que el tamaño del trofozoíto puede variar según el genotipo (Visvesvara, 1991; Khan, 2008) (Fig. 3 A).
- Quiste: puede ser poliédrico o convexo, posee dos paredes: una interna y otra externa llamadas endoquiste y ectoquiste respectivamente, el diámetro puede variar entre las 12 y 35  $\mu\text{m}$ . En 1977 Pussard y Pons reconocieron tres grupos dentro del género *Acanthamoeba* basándose en criterios morfológicos del quiste, estableciendo 18 especies (Cuadro 2) (Visvesvara, 1991) (Fig. 3 B).



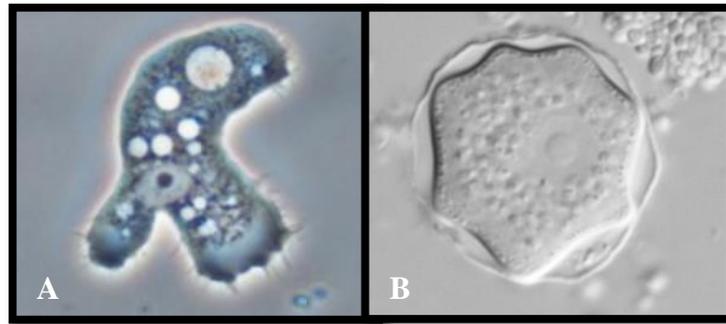


Figura 3. Micrografías de *Acanthamoeba* sp: Trofozoíto (A) y quiste (B) (Lorenzo-Morales, 2015).

### 3.3 *Balamuthia mandrillaris*

*Balamuthia mandrillaris* fue aislada por primera vez de un babuino que falleció en el zoológico de San Diego, California en 1990 (Bravo, 2011). Sólo se tienen dos reportes del aislamiento de este protozoo en muestras de suelo en California, por lo que no se tienen datos precisos acerca de su distribución y abundancia en el ambiente (Cabello-Vílchez, 2014; Lares-Villa, 2018). En condiciones de laboratorio, *Balamuthia mandrillaris* crece de manera óptima a una temperatura entre los 35 y 37°C sobre placas con cultivo celular de riñón de mono, fibroblasto pulmonar o células endoteliales microvasculares (Bravo, *op cit.*). Este parásito es responsable de producir encefalitis hemorrágicas necrosantes similares a las de *Acanthamoeba* (Siddiqui, 2015).

Dependiendo del sitio de infección, se pueden distinguir diferentes manifestaciones clínicas, las cuales pueden derivar en encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), infecciones diseminadas en piel, pulmones glándulas adrenales, riñones y queratitis (Chalmers, 2014).

#### 3.3.1 Características morfológicas

- Trofozoíto: mide entre 12 y 60  $\mu\text{m}$ , es extremadamente pleomórfico, ya que se pueden observar formas redondas, alargadas y/o ramificadas. Generalmente es uninucleado, aunque se tienen reportes de varias formas binucleadas, su nucléolo es denso, el



citoplasma es fibroglandular y posee pseudópodos espinosos (Cabello-Vílchez, 2014; González-Robles, 2015; Cabello-Vílchez, 2016) (Fig. 4 A).

- Quiste: es esférico, multinucleado, más o menos esférico, no tiene poros, mide entre 10 y 30  $\mu\text{m}$ , y posee una pared trilaminar (Lorenzo-Morales, 2013) (Fig. 4 B).

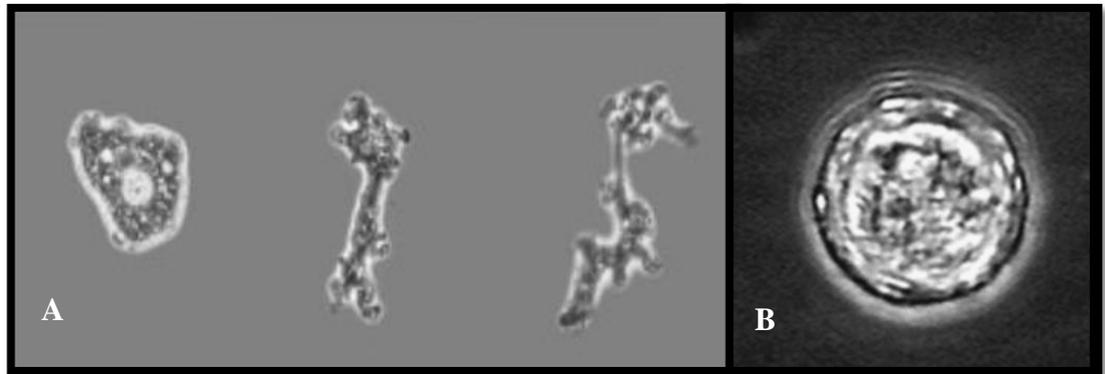


Figura 4. Trofozoíto (A) y quiste (B) de *Balamuthia mandrillaris* (Visvesvara, 2007; González-Robles, 2015).

### 3.4 *Sappinia pedata*

*Sappinia diploidea* ha sido aislada de heces de mamíferos, cuerpos de agua, hojarasca y del recto de algunas lagartijas. Su presencia se ha reportado en Europa, América del Norte, Egipto, India y Japón (Visvesvara, 2007). En el 2009, Qvanstrom y colaboradores reidentificaron a *S. diploidea* basándose en pruebas moleculares. Hasta el momento solo se tiene el reporte de un caso de infección en una persona por esta amiba de vida libre (Gelman, 2001).

#### 3.4.1 Características morfológicas

- Trofozoíto: mide entre 50 y 60  $\mu\text{m}$  de longitud por 20-30  $\mu\text{m}$ , de ancho, puede ser ovoide, aplanado y presentar o no estrías sobre su superficie. Una de sus principales características es que es binucleado y con alveolos estrechamente yuxtapuestos. (Walochnik, 2010; Visvesvara, 2013) (Fig. 5 A).



- Quiste: es más pequeño, con un diámetro de 18 a 25  $\mu\text{m}$ . Son binucleares y han demostrado tener reproducción de tipo sexual (Walochnik, 2010; Visvesvara, 2013) (Fig. 5 B)

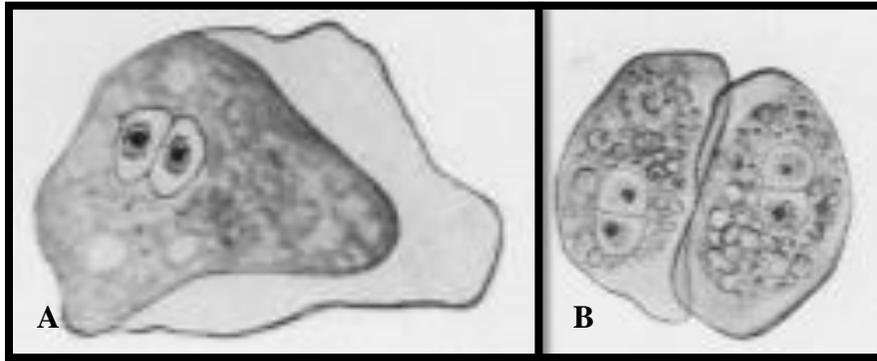


Figura 5. Trofozoíto (A) y quiste (B) de *Sappinia pedata*, ilustraciones realizadas por Hartmann y Näegler (1908), tomados de Walochnik (2010)



#### 4. Ciclos de vida

Los ciclos de vida de las AVLPP para el ser humano son directos y presentan dos fases durante dicho ciclo: trofozoíto (fase infectante) y quiste. *Naegleria fowleri*, es la única AVLPP que presenta tres fases, las ya mencionadas y una más, conocida como forma flagelar (Schuster, 2004). Las vías preferenciales de entrada al hospedero pueden ser mediante abrasiones en la piel, ulceraciones o por el tracto respiratorio bajo como sucede en el caso de *Balamuthia mandrillaris* y *Acanthamoeba* spp., *Naegleria fowleri* únicamente puede ingresar al hospedero penetrando el neuroepitelio olfatorio (Fig. 6). Se han logrado aislar quistes y/o trofozoítos de tejido humano y en el caso de *Naegleria fowleri*, formas flageladas en líquido cefalorraquídeo (Oddó, 2006)

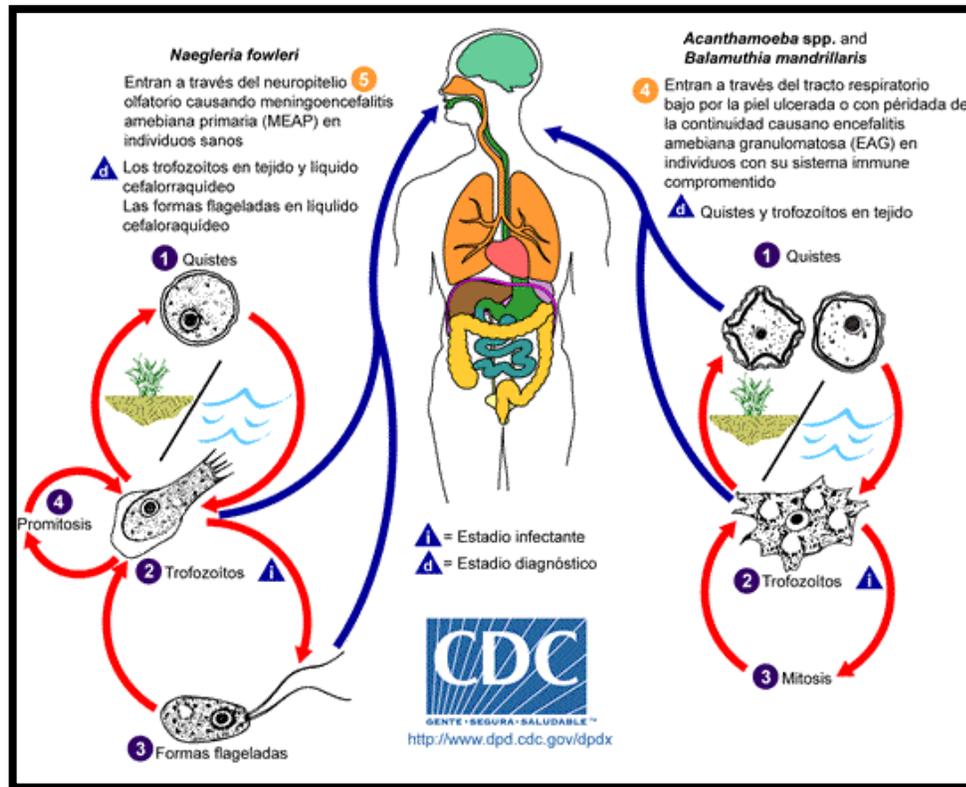


Figura 6. Ciclos de vida de vida, vías preferenciales de entrada y estadios de *Acanthamoeba* spp, *Balamuthia mandrillaris* y *Naegleria fowleri* (CDC, 2004)



## 5. Infecciones amibianas del sistema nervioso central por amibas de vida libre

Entre la gran variedad de estos protozoos conocidos, los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*, y *Sappinia* han sido de especial interés en los últimos 40 años debido al potencial riesgo que representan para la salud de seres humanos y otros animales (Lares-Villa, 2001). Además, estos protozoos pueden ser portadores de otros patógenos como virus y bacterias de importancia médica pertenecientes a los géneros: *Legionella*, *Vibrio* y *Listeria*, entre otros (Trabelsi, 2012).

Se han detectado aproximadamente 300 casos de MEAP en todo el mundo, la mayoría en los Estados Unidos de Norte América, Australia y Europa, únicamente hasta el año de 1996 se tenían contabilizados 750 casos de infecciones por *Acanthamoeba* (Jain, 2002; Trabelsi, 2012). Se han reportado, además 200 casos por *Balamuthia mandrillaris* y un sólo caso por *Sappinia pedata* (Gelman, 2001; Bravo, 2011).

### 5.1 Meningoencefalitis amibiana primaria

La meningoencefalitis amibiana primaria es un padecimiento agudo y fulminante que se presenta en niños, adolescentes y adultos jóvenes hombres clínicamente sanos con historial reciente de contacto con cuerpos de agua (Siddiqui, 2016). La infección se adquiere a través de las vías respiratorias superiores, las amibas alcanzan el techo de la cavidad nasal, se adhieren a la mucosa olfatoria, ascienden por el nervio olfatorio, penetran la lámina cribosa del etmoides y llegan al espacio subaracnoideo (Romero, 2007; Tapia, 2012).

Uno de los aspectos más alarmantes de la MEAP, es su elevada tasa de mortalidad, la cual se ha mantenido desde la primera vez que se detectó en la década de los años 60's, en un 99 % (Baig, 2016). Los síntomas que se generan no son distinguibles de aquellos ocasionados por meningitis de origen viral o bacteriana y pueden presentarse pasadas 24 horas posteriores a la infección o hasta siete días después (Chalmers, 2014). Los pacientes cursan la enfermedad con irritabilidad, confusión, alucinaciones, somnolencia, dolor de cabeza bifrontal severo, fiebre, náusea, vómito, cuello rígido, crisis convulsivas, hemiparesia, bulbos olfatorios con



inflamación y hemorragia, congestión en leptomeninges y coma seguido por la muerte (Tapia, 2012).

## 5.2 Encefalitis amibiana granulomatosa

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), puede ser producida por varias especies del género *Acanthamoeba* y por *Balamuthia mandrillaris*, esta infección puede afectar tanto a personas inmunocomprometidas como inmunocompetentes. La enfermedad corresponde a una encefalitis necrosante y hemorrágica, aguda o subaguda, crónica y multifocal con angeítis necrótica. Además, se han aislado amibas de los géneros *Acanthamoeba* y *Vermamoeba* del tracto superior de individuos sanos, sin embargo, en el caso de *Vermamoeba* nunca se ha demostrado que esta amiba sea el agente etiológico de alguna infección en el SNC, sino más bien es reconocida como un protozoo oportunista que puede desencadenar una infección secundaria cuando el paciente está inmunocomprometido por algún otro patógeno (Martínez, 1997; Oddo, 2006).

Existen varias investigaciones que demuestran que las amibas invaden la piel y pulmones alcanzando el espacio intravascular, esparciéndose vía hematógica seguida de la penetración de la barrera hematoencefálica, llegando así al SNC (Baig, 2015).

El curso de la enfermedad puede ser crónico y manifestarse de 7 a 120 días posteriores a la exposición, las manifestaciones clínicas se caracterizan por dolor de cabeza, cambios de personalidad, fiebre, hemiparesias, parálisis en los nervios craneales, signos de irritación meníngea, aletargamiento y coma. Suelen haber lesiones multifocales en el SNC localizadas en el cerebro medio, tálamo, tallo cerebral, cuerpo caloso, cerebelo y en ocasiones aparecen afecciones en la porción cervical de la espina dorsal. La presentación clínica es insidiosa y puede confundirse con leptomeningitis bacterial, meningitis por tuberculosis o encefalitis viral (Martínez, 1997; Oddó, 2006).



## 6. Infecciones derivadas por amibas de vida libre

### 6.1 Queratitis amibiana

Corresponde a un proceso inflamatorio crónico, activo que afecta la córnea, conjuntiva y otras estructuras oculares. La queratitis amibiana (QA) se considera una enfermedad rara con una prevalencia estimada de 1-9/100,000 individuos. La infección se presenta de manera particular en individuos inmunocompetentes que utilizan lentes de contacto blandos durante largos periodos de tiempo y/o practican natación con los lentes puestos, sobre todo, en quienes poseen malos hábitos de higiene en el manejo y desinfección de estos (Lorenzo-Morales, 2015).

La QA usualmente es unilateral y de lenta evolución. Al inicio de la infección se puede observar una queratopatía difusa y posteriormente aparecen infiltrados multifocales en el estroma. A diferencia de otras amibiosis, *Acanthamoeba* puede formar quistes en el tejido, por lo que un solo quiste puede llevar a la reinfección, de esta forma el tratamiento debe de tener seguimiento con regularidad y por largos periodos de tiempo. Los síntomas comienzan con dolor creciente, epifora y fotofobia, otros pacientes presentan una queratitis superficial, erosiones y opacidades subepiteliales, infiltrados, líneas y puede desarrollarse en una conjuntivitis e iritis, vascularización y queratitis de córnea (Fig. 7 A). Un anillo de infiltrado estromal se desarrolla en más de dos tercios de los individuos infectados (Oddó, 2006; Tapia, 2012; Lorenzo-Morales, *et al.*, 2015) (Fig. 7 B).

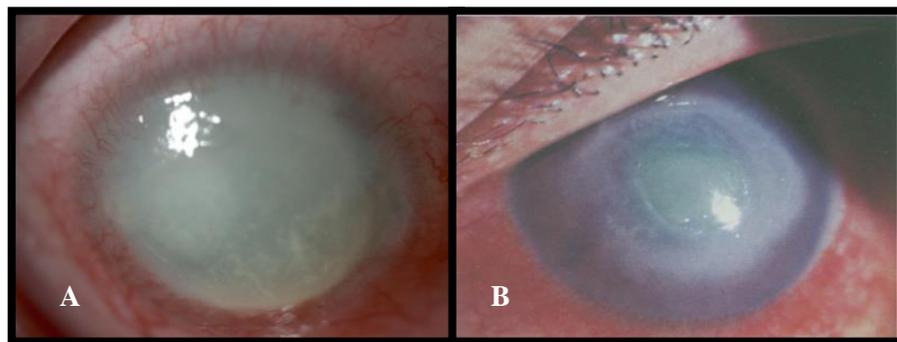


Figura 7. Vascularización y queratitis de córnea (A). Anillo de infiltrado estromal en paciente (B) (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015; Samples, 1984).



### 6.2 Infección cutánea por *Acanthamoeba* spp.

La infección cutánea por *Acanthamoeba* es más frecuente en pacientes inmunosuprimidos. Las lesiones cutáneas consisten en nódulos duros eritematosos. Los infectados con lesiones cutáneas presentan una tasa de mortalidad de hasta el 70 % (Tapia, 2012).

### 6.3 Infección cutánea por *Balamuthia mandrillaris*

La infección por *Balamuthia mandrillaris* se ha reportado en Europa, Asia, Australia y en varios países de América Latina como México, Venezuela, Argentina, Brasil, Chile y con una gran prevalencia en Perú. El ámbito de edad de los pacientes varía entre los 1 a los 85 años con un 55 % de aparición en menores de 15 años. Las manifestaciones clínicas de *B. mandrillaris* son lesiones en la piel localizadas en la cara central, sobre todo en la parte dorsal de la nariz (Fig. 8 A), también pueden aparecer lesiones en las rodillas, codos o pecho (Fig. 8 B). La infección puede extenderse al SNC vía hematógena o por continuidad a través del nervio olfatorio (Siddiqui, 2007; Bravo, 2011;).

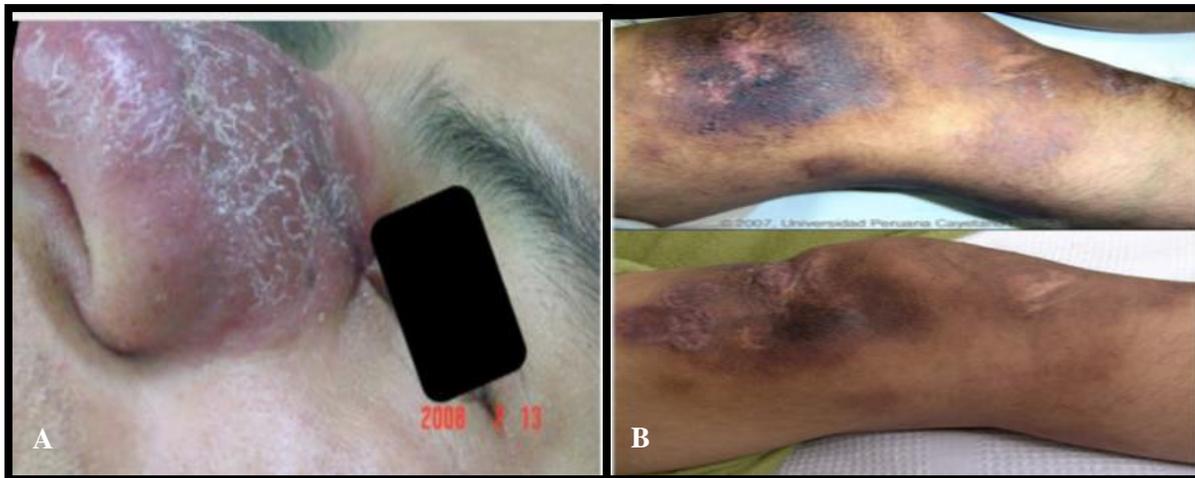


Figura 8. Lesiones por infección cutánea de *B. mandrillaris* en cara (A) y rodillas (B) (Cabello-Vílchez *et al.*, 2014).



## 7. Epidemiología por amibas de vida libre en México

Se han reportado hasta el año de 2014 un total de 46 casos de infecciones por amibas de vida libre (AVL) en el país (Anexo 1. Cuadros 8 y 9) (Lares-Villa, 2001; Cabello-Vílchez *et al.*, 2014). La mayoría de los casos registrados han sido por Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), los cuales quedan restringidos casi exclusivamente al noroeste de la República, principalmente a los estados de Baja California y Sonora con una tasa de incidencia de 0.001 por 100,000 habitantes, con prevalencia en individuos de sexo masculino de entre 9 y 15 años. Las detecciones de los casos en estos estados probablemente se deban a su programa de vigilancia epidemiológica, altas temperaturas presentadas durante el verano y su extensa red de cuerpos de agua naturales recreativos. (Lares-Villa, *op cit.*; Chertorivski, 2012). Se han contabilizado un total de 29 casos por MEAP en México, el primero de ellos fue publicado en 1984 cuando se detectó a *N. fowleri* en un adolescente de 16 años en el Valle de Mexicali, Baja California y Sonora (Valenzuela, *et al.*, 1984). Es importante mencionar que se ha logrado aislar a *Naegleria lovaniensis* y a *Vermamoeba vermiformis* en dos pacientes con síntomas de meningoencefalitis, sin embargo, después de realizar las pruebas de patogenicidad en modelos murinos, ningún aislado resultó positivo (Rivera, *et al.*, 1989, 1992). Se han registrado un total de 16 casos de Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) por *Balamuthia mandrillaris* y solo cuatro casos de queratitis amibiana (QA) por *Acanthamoeba* (Fig. 9) (Lares-Villa, 2001; Cabello-Vílchez, 2014).

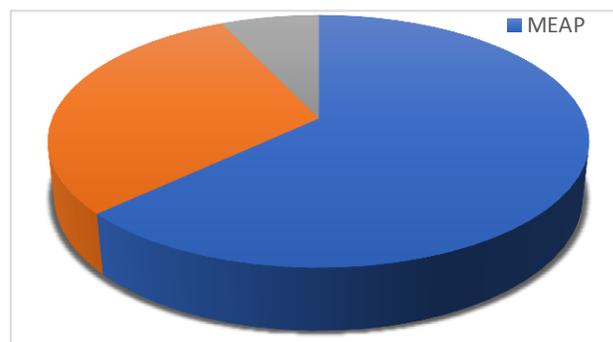


Figura 9. Porcentaje de casos reportados de infecciones por AVL patógenas en México.



## II. ANTECEDENTES.

### 1. Registro de amibas de vida libre en el mundo

- Visvesvara en 1990 recopiló los casos registrados de infecciones causadas a AVL en los Estados Unidos de América (EUA), documentando 66 casos de infecciones por *Naegleria fowleri*, 30 casos de Encefalitis Amibiana Granulomatosa y 208 casos de queratitis provocadas por *Acanthamoeba*.
- Jain y cols. en el 2002 reportaron el caso de una paciente con síntomas de meningitis, después de examinar el líquido cefalorraquídeo se encontraron trofozoítos consistentes con la morfología de *Naegleria*, se inició el tratamiento administrando anfotericina B, rifampicina y ornidazol, dicho tratamiento se reportó como exitoso.
- Marciano-Cabral en el 2003 tomó muestras de agua de uso doméstico en hogares de Arizona, Estados Unidos de América (EUA) debido al reporte de la muerte de dos infantes. Se tomaron 19 muestras de agua de diferentes partes de los hogares, de las cuales 17 resultaron positivas para la presencia de *N. fowleri*.
- Carlesso y cols. en el 2007 aislaron amibas de vida libre provenientes de un hospital público en Porto Alegre, Brasil. Recolectaron 135 muestras de agua, de las cuales 47 muestras resultaron positivas para AVL. El 35 % de los aislados amibianos cumplieron con las características morfológicas propias del género *Acanthamoeba*.
- Siddiqui y Khan en el 2008 recopilaron datos epidemiológicos de las infecciones por *Balamuthia mandrillaris* concluyendo lo siguiente: 52 % de los casos tuvieron lugar en países de América del Sur, del 71 % de la incidencia de esta enfermedad se dio en individuos masculinos, presentando una tasa de mortalidad del 93 %



- De Jonckheere en el 2011, informó 24 casos de MEAP en Europa, 19 en Australia, 39 en Asia, seis en África, 120 casos en Norte América y 13 casos en América del Sur.
- Bravo y cols. en el 2011 informaron 200 casos en el mundo debidos a *Balamuthia mandrillaris*, dichos casos fueron reportados en América del Sur, Europa, Asia y Australia.
- Yolder en el 2012 reportaron dos casos de meningoencefalitis amibiana primaria asociadas con agua de uso doméstico para irrigación nasal.
- Lorenzo-Morales y cols. en el 2013 contabilizaron 200 casos de infecciones por *Balamuthia mandrillaris* en el mundo, sin embargo, la mayoría de los casos se concentraron en los países: México, Venezuela, Argentina, Brasil, Chile y declararon a Perú como “hot spot” por la incidencia de *B. mandrillaris*.
- Cabello-Vílchez y cols. en el año 2014 notificaron 177 casos de infección debidos a *Balamuthia mandrillaris*, siendo las infecciones más frecuentes en individuos de 15 años. Reportaron casos en Argentina, Brasil, Chile, México y Perú, siendo este último país el de mayor incidencia para esta infección.
- De Jonckheere en el 2014 reportó a *Naegleria fowleri* como agente causal de una enfermedad rara y fatal que tiene 95 % de mortalidad, estando esta amiba presente en todos los continentes a excepción de la Antártica, siendo responsable de 250 casos de infecciones de meningoencefalitis amibiana primaria en todo el mundo.



- Cope y cols. en el 2016 contabilizaron que desde 1962 y hasta el 2015, se han registrado en Estados Unidos de América 138 casos de meningoencefalitis amibiana primaria en un ámbito de 0 a 8 casos por año.
- Martínez-Castillo y cols. en el 2016 reportaron entre 255 y 300 casos de Meningoencefalitis Amibiana Primaria debidas a *Naegleria fowleri* a nivel mundial.

## 2. Registro de amibas de vida libre en México.

- Rivera y cols. en 1984 aislaron a las especies *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni* y *Naegleria fowleri* de la nariz, boca y faringe de 30 pacientes femeninos de una clínica de odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rivera y colaboradores en 1987 aislaron amibas de vida libre de la atmósfera de la Ciudad de México y áreas conurbadas. Entre las especies que fueron identificadas están *Naegleria* spp., *Acanthamoeba polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *Vahlkampfia* sp., entre otras.
- Rivera y cols. en 1988 colectaron muestras de agua en tres balnearios de agua termal en Tecozautla, Hidalgo. Se identificaron amibas de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Willaertia*.
- Rivera y colaboradores en 1993 lograron aislar a los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Naegleria* y *Vermamoeba* (ex *Hartmannella*) en tres bañeras de fisioterapia y en 11 albercas de uso recreativo con niveles de cloro inferiores a 5.31 mg/ml en la Ciudad de México.



- López-Corella y cols. en 1989 reportaron el fallecimiento de un adolescente de 13 años en Huetamo, Michoacán. Se realizó una necropsia, la cual reveló numerosos trofozoítos que fueron identificados por inmunohistoquímica como *Naegleria fowleri*.
- Lares en 1991 realizó un estudio amebológico en tres tinas de hidroterapia, tres jacuzzis y nueve piscinas de uso recreativo en Sonora. Identificó a 42 especies de AVL, entre las que destacan *Acanthamoeba polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. ryoreba* y *A. quina*.
- Lares y cols. en 1993 aislaron cinco cepas de *Naegleria* de muestras de pacientes con meningoencefalitis amibiana primaria y una cepa de un canal de artificial. Las características de crecimiento, resultados serológicos, patrones de isoenzimas y pruebas de patogenicidad en modelos murinos permitieron la identificación de estos aislados como *Naegleria fowleri*.
- Rivera y cols. en 1993 aislaron e identificaron amibas de vida libre obtenidas de albercas recreativas y de fisioterapia. Identificaron varias especies pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Naegleria*.
- Rivera en 1994 colectó muestras de amibas suspendidas en el aire de la Ciudad de México- Se obtuvieron 108 cepas, de las cuales 19 fueron patógenas después de ser inoculadas vía intranasal e intracerebral en modelos murinos. Las especies más abundantes pertenecieron a los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Vermamoeba* (ex *Hartmannella*). Este estudio demostró la viabilidad de los quistes de las amibas aisladas del aire de la Ciudad de México.
- Centeno y cols. en 1996 documentaron el caso clínico de un paciente con meningoencefalitis y bronconeumonía en Puebla. Identificaron la presencia de



*Vermamoeba vermiformis* en el LCR del paciente, sin embargo, no se relacionó a este protozoo como agente causal de la infección sino como un colonizador oportunista.

- Lares en el 2001 registró los casos de infecciones por amibas de vida libre en México, concluyendo que los casos por meningoencefalitis amibiana primaria fueron los más frecuentes, seguido por EAG causada por *Balamuthia mandrillaris* y con sólo cuatro casos de QA.
- Cervantes en el 2007 caracterizó cepas de *N. fowleri* aislados de líquido cefalorraquídeo de dos pacientes en el Noreste de México. Se realizaron como pruebas confirmatorias estudios de flagelación, de ultraestructura, patrones proteicos y proteasas, así como de PCR. Los resultados de las pruebas determinaron como agente causal de la infección a *N. fowleri*.
- Guzmán-Fierros y cols. en el 2008 identificaron 15 cepas del género *Naegleria* pertenecientes a las especies: *N. lovaniensi*, *N. tihangesis* y *N. americana* en nueve sitios de uso recreativo en Hornos, Sonora.
- Lares en el 2009 tomo muestras de diez sitios diferentes del Valle de Mayo, Sonora con el objetivo de identificar especies de AVL nativas del lugar, así como la búsqueda de *Naegleria fowleri*. Logró identificar 11 géneros de AVL en aguas superficiales de la región, el aislamiento de *Naegleria fowleri* resultó negativo, sin embargo, no descartó su presencia.
- Lares en el 2010 midió la concentración de *Naegleria* en áreas recreacionales de Hornos, Sonora. Encontró que *Naegleria* presenta su máxima concentración durante el verano y el otoño.



- Bonilla y cols. en el 2010 tomaron muestras de agua provenientes de 27 casas de la Ciudad de México y área metropolitana y de solución salina de lentes de contacto. Obtuvieron cinco aislados de *Acanthamoeba* de 200 muestras, la gran mayoría resultaron no patógenas.
- Gallegos y cols. en 2014 realizaron una revisión taxonómica de 142 publicaciones, registrando 315 especies de amibas. Reportaron además que nueve estados de la República Mexicana no tienen ningún estudio de amibas de vida libre.
- Bonilla-Lemus y cols. en el 2014 tomaron muestras en 32 sitios de 18 cuerpos de agua de la cuenca de México, encontrando 120 especies de amibas de vida libre agrupadas en 18 géneros, de los cuales, los más frecuentes fueron *Vannella*, *Rosculus* y *Acanthamoeba*.
- Ortiz-Ortega y cols. en el 2014 aislaron 46 cepas del género *Acanthamoeba*, de las cuales 30 resultaron patógenas en pruebas con modelos murinos en nueve sitios de la Huasteca Potosina.
- Lares-Jiménez y cols, en el 2018 realizaron en agua caliente un estudio amebológico en el cual, identificaron mediante PCR a las especies: *Naegleria lovansensis*, *Acanthamoeba jacobsi*, *Stenamoeba* spp. y *Vermamoeba vermiformis* de cuerpos de agua termales en “Agua Caliente”



### III. JUSTIFICACIÓN.

La investigación de protistas, sobre todo de aquellos que representan un peligro potencial para la salud del ser humano en nuestro país es escasa, de los 819 estudios realizados, únicamente 41 han tenido lugar en el estado de Michoacán (Gallegos, 2014), lo que representa el 5 % del total de estudios amebológicos y en lo que respecta a la zona de Laguna Larga en Los Azufres, Michoacán, no se cuenta con ningún registro previo al presente. Esta zona se caracteriza por sus cuerpos de agua recreativos y termales, lo que ofrece las condiciones óptimas para la proliferación de amibas de vida libre con potencial patógeno (Ávila, 2007), además generan una importante afluencia de turistas debido a que se les atribuyen propiedades curativas y efectos positivos sobre el ser humano que se imputan a sus aguas termales (Arévalo-Pacheco, 2014). Son por estas razones que puede considerarse como un posible foco importante de infección.

De acuerdo con la OMS (WHO, 2001), cuando un cuerpo de agua se utiliza para actividades recreativas (deportes acuáticos, natación, buceo, etc.) se debe realizar un estudio microbiológico de la calidad del agua para garantizar la seguridad de los usuarios además, en el 2010, en el Diario Oficial de la Federación se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas con el fin de prevenir y minimizar los riesgos a la salud pública”, en la cual se contempla como lineamiento operativo la ausencia de *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba*. En el 2015 la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) publicó el Manual Operativo de Vigilancia de Agua de Contacto Primario en Playas y Cuerpos de Agua Dulce, el cual, al igual que la NOM-245-SSA1-2010 tiene como finalidad prevenir riesgos a la salud, sin embargo, no se tiene contemplada la búsqueda de AVL como posibles agentes infecciosos en dicho Manual Operativo.

Debido al poco conocimiento de los profesionales de la salud de estos protozoos como agentes infecciosos emergentes, el antecedente de un caso de Meningoencefalitis Amibiana Primaria en el estado de Michoacán, la falta de centros de vigilancia epidemiológica y la alta probabilidad



de un mal diagnóstico de estas infecciones han hecho que la importancia e impacto real de estos protozoos sobre la salud pública pase desapercibida (Lares-Villa, 2001; Visvesvara, 2008, 2014; Lorenzo-Morales, 2010). La importancia de realizar un estudio para confirmar la presencia de amibas de vida libre con potencial patógeno estriba no solo en las razones antes mencionadas, sino también en dar un panorama de posibles focos de infección en el territorio nacional a los turistas y autoridades sanitarias pertinentes, además de contribuir al conocimiento de la riqueza y distribución de estos microorganismos, así como servir como base para posteriores estudios



#### **IV. OBJETIVOS.**

##### **1. Objetivo general.**

- Aislar e identificar amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuerpos de agua de uso recreativo del balneario Laguna Larga, Los Azufres, Michoacán en las épocas de lluvia y secas.

##### **2. Objetivos particulares.**

- Aislar y cultivar amibas de vida libre potencialmente patógenas a partir de diferentes biotopos presentes en las muestras de agua del balneario Laguna Larga, Los Azufres.
- Identificar y ubicar taxonómicamente mediante sus características morfológicas a las amibas de vida libre potencialmente patógenas.
- Determinar la distribución estacional y por biotopos de las AVL e identificar la época del año con mayor diversidad de estos protozoos.
- Correlacionar los factores fisicoquímicos (temperatura del agua y ambiental, pH y conductividad) con la presencia de amibas de vida libre en el balneario Laguna Larga, Los Azufres, Michoacán.
- Analizar mediante el índice de Jaccard el grado de similitud entre cuerpos de agua del balneario Laguna Larga, Los Azufres.
- Ubicar los cuerpos de agua donde se encuentran las amibas de vida libre potencialmente patógenas que representen una amenaza para la salud pública y emitir recomendaciones preventivas a usuarios y administradores del balneario.



## **V. ÁREA DE ESTUDIO.**

### **1. Ubicación**

El balneario Laguna Larga está ubicado en el Parque Nacional Los Azufres, en el Municipio de Ciudad Hidalgo, Michoacán, ubicado entre los 19°45'47'' y 19°50'15'' N y 100°38'44'' O, con una vegetación de bosque de pino-encino y oyamel. Dicha área contiene varios balnearios considerados de interés turístico por sus propiedades termales y terapéuticas que se les han atribuido a dichos cuerpos de agua. La zona posee climas que van de: semicálido-subhúmedo, templado-subhúmedo y semifrío-subhúmedo, todos con lluvias en verano. La temperatura media anual oscila entre los 8 y 20 °C. Tiene una precipitación total anual de 1,000-1,500 mm. Entre sus principales actividades económicas se encuentra la agricultura temporal y de riego, ganadería, comercial y turística. (Gutiérrez, 1982; Stanford, 2015; CONABIO, 2017).

### **2. Descripción general del balneario Laguna Larga, Los Azufres**

El balneario Laguna Larga está dividido en tres secciones: San Alejo, Viveros y Laguna. La sección San Alejo está formada por seis albercas y un yacimiento de agua termal (Fig.10 A-F), dichos cuerpos de agua están localizados en un gradiente de altitud que va desde los 5 hasta los 70 metros (tomando como referencia la orilla de la Laguna (Fig. 11), siendo el yacimiento de agua termal el cuerpo de agua localizado a una mayor altitud. Esta diferencia de altitud permitió a los administradores del lugar crear un sistema de tuberías que alimentara a todas las albercas del balneario. La sección Viveros solo cuenta con dos albercas, una de las cuales no pudo ser muestreada debido a reparaciones y remodelaciones en dicha alberca (Fig. 12). La última sección es Laguna Larga, en la cual no hay ninguna alberca, solo como su nombre hace referencia, la Laguna (Fig. 13).





Figura 10. Albercas de la sección San Alejo (A-F). Fotos tomadas por Taméz-Hernández, 2017





Figura 11. Balneario Laguna Larga, Los Azufres, Michoacán y representación de elevación topográfica (Google Earth, 2018).



Figura 12. Alberca de la sección Viveros. Foto tomada por Taméz-Hernández, 2017



Figura 13. Sección Laguna. Foto tomada por Taméz-Hernández, 2017



## VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

Se llevaron a cabo dos muestreos en el balneario “Laguna Larga” Los Azufres, el primer muestreo se efectuó a principios de agosto (temporada de lluvia) y el segundo a finales de octubre (temporada de sequía) del 2016.

### 1. Trabajo en campo

#### 1.1 Recolecta y transporte de muestras

En cada muestreo se recolectó un total de 45 muestras provenientes de siete albercas, un yacimiento de agua termal y de la orilla de “Laguna Larga”. En cada alberca se realizaron cinco tomas de muestra y 10 en Laguna Larga. Se incluyeron diferentes biotopos, los cuales fueron:

- a) Biopelícula flotante (recolección manual)
- b) Biopelícula adherida (recolección por raspado de la superficie de las paredes interiores de las albercas)
- c) Sedimentos (recolección manual)
- d) Muestra mixta de agua de superficie, a media profundidad y del fondo

La toma de muestras de agua, biopelículas se llevaron a cabo en tubos estériles de polipropileno de boca ancha de 100 ml. Todas las técnicas se realizaron de acuerdo con Baird (1999).

#### 1.2 Registro de factores fisicoquímicos del agua “*in situ*” y transporte

Para correlacionar los parámetros fisicoquímicos del agua con la presencia/ausencia de amibas se midieron los siguientes parámetros fisicoquímicos en cada cuerpo de agua del balneario durante todo el año: temperatura del agua (°C), pH y conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ). Las muestras se transportaron a temperatura ambiente al Laboratorio de Patógenos Emergentes (LIPE) de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM para su procesamiento.



### 1.2.1 Temperatura del agua

Se registró la temperatura del agua (°C) con un medidor digital HANNA waterproof modelo H19040, las lecturas fueron tomadas de la siguiente manera: se sumergió el electrodo en el agua a una profundidad aproximada de 15 cm esperando la estabilización la lectura del electrodo.

### 1.2.2 pH

Se registró el pH con un medidor HANNA waterproof. modelo H19040. Se realizó el mismo procedimiento, sumergiendo el electrodo en el agua y se esperó a la estabilización para la toma de lectura.

### 1.2.3 Conductividad

El parámetro de conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) se tomó con un medidor HANNA Waterproof modelo H19040 sumergiendo el electrodo en el agua y se esperó su estabilización para la toma de la lectura.

## 2. Trabajo en laboratorio

### 2.1 Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre

#### 2.1.1 Biopelículas y sedimento

Las muestras fueron procesadas de acuerdo con el método descrito por De Jonckheere (1984) tomando alícuotas de 50 ml y se centrifugaron a 2,500 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Boeco-U32. El sobrenadante fue desechado, se resuspendió la pastilla y se sembró una muestra sobre placas con medio de agar no nutritivo (NNE) (Anexo 5) previamente inoculadas con *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 37 °C durante 24 horas.



## **2.2 Clonación**

Una vez transcurridas las 24 horas se procedió a hacer las primeras observaciones de las placas en un microscopio óptico invertido Nikon Eclipse TS100 cada placa se marcó donde se observó una mayor abundancia de amibas con un morfotipo similar para cortar con un bisturí estéril 1 de agar y colocarlo en una nueva placa con medio NNE y se conservaron a temperatura ambiente durante 24 horas dentro de bolsas de plásticos para evitar la desecación (De Jonckheere. 1984).

## **2.3 Identificación morfológica de las amibas de vida libre**

Transcurridas 24 horas se observó bajo microscopio cada caja Petri y se hicieron las resiembras necesarias para separar trofozoítos. La identificación de los aislados amibianos fue llevada a cabo tomando en cuenta los criterios morfológicos de quistes y trofozoítos basados en las claves taxonómicas dicotómicas de Page (1988) y Pussard y Pons (1977). Se tomaron muestras de cada placa haciendo un barrido con solución salina, se colocaron en un portaobjetos, se observaron en un microscopio óptico invertido modelo Nikon TS100 a 10, 20 y 40x y se llevó a cabo un registro fotográfico con una cámara Nikon coolpix 9.

## **2.4 Análisis estadístico**

Para correlacionar la presencia/ausencia de las amibas con los parámetros fisicoquímicos de los cuerpos de agua en los que fueron aislados, se realizó un análisis de varianza ANOVA multifactorial con ayuda del programa Sigma Plot ®. Se utilizó el coeficiente de Jaccard para medir el grado de similitud entre cada cuerpo de agua, así como entre temporadas y se construyó un dendograma con el programa Primer 6 (Chao, 2004).



## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Aislados amibianos

Se aislaron 23 especies de amibas durante este estudio (Anexos 2 y 4. Cuadros 16 y 17). En el primer muestreo realizado durante el mes de agosto (temporada de lluvias) se identificaron un total de 21 especies pertenecientes a 12 géneros (Cuadro 3).

Géneros	Especies
<i>Acanthamoeba</i>	<i>A. polyphaga</i> * <i>A. culbertsoni</i> * <i>A. triangularis</i> *
<i>Arcella</i>	<i>A. sp</i> <i>A. vulgaris</i>
<i>Vermamoeba</i>	<i>V. vermiformis</i>
<i>Mayorella</i>	<i>M. sp</i>
<i>Naegleria</i>	<i>N. fowleri</i> * <i>N. gruberi</i> <i>N. jadidni</i>
<i>Paratetramitus</i>	<i>P. jugosus</i>
<i>Saccamoeba</i>	<i>S. sp</i>
<i>Sappinia</i>	<i>S. pedata</i> *
<i>Thecamoeba</i>	<i>T. striata</i>
<i>Trinema</i>	<i>T. sp</i>

Cuadro 3. Géneros y especies amibianas aisladas durante el mes de agosto en el balneario Laguna Larga, Los Azufres. Amibas consideradas como potencialmente patógenas para el ser humano (\*).



Géneros	Especies
<i>Vannella</i>	<i>V. mira</i> <i>V. platypodia</i> <i>V. simplex</i> <i>V. sp</i>
<i>Vahlkampfia</i>	<i>V. sp</i>

Cuadro 3. Géneros y especies amibianas aisladas durante el mes de agosto en el balneario Laguna Larga, Los Azufres. Amibas consideradas como potencialmente patógenas para el ser humano (\*).

En el segundo muestreo, realizado durante el mes de octubre (temporada de sequía) se aislaron 13 especies (ver Anexo, Cuadro 17) agrupadas en ocho géneros. (Cuadro 4).

Géneros	Especies
<i>Arcella</i>	<i>A. sp</i> <i>A. vulgaris</i>
<i>Korotnevella</i>	<i>K. bulla</i> <i>K. stella</i>
<i>Mayorella</i>	<i>M. sp</i>
<i>Naegleria</i>	<i>N. fowleri</i> * <i>N. jadini</i>
<i>Saccamoeba</i>	<i>S. sp</i>
<i>Trinema</i>	<i>T. sp</i>

Cuadro 4. Géneros y especies amibianas aisladas durante la época de sequía en el balneario Laguna Larga, Los Azufres. Amibas consideradas como potencialmente patógenas para el ser humano (\*).



Géneros	Especies
<i>Vannella</i>	<i>V. lata</i> <i>V. platypodia</i> <i>V. simplex</i>
<i>Vahlkampfia</i>	<i>V. sp</i>

Cuadro 4. Géneros y especies amibianas aisladas durante la época de sequía en el balneario Laguna Larga, Los Azufres. Amibas consideradas como potencialmente patógenas para el ser humano (\*).

El balneario Laguna Larga, Los Azufres es un sistema de albercas alimentado por un yacimiento de agua subterráneo termal. Debido al movimiento del agua provocado por la actividad de los bañistas de la zona y la corriente que se genera por la diferencia de altitud en la que se encuentran ubicadas las albercas, la formación de biopelículas resulta complicada, por lo que la toma de muestras de este biotopo en particular fue realizada cuando no había actividad de los bañistas. Además, todas las albercas son lavadas y cloradas de manera frecuente por la administración del lugar, lo que también evita la formación de biopelículas en las paredes de las albercas, por lo que este biotopo no fue encontrado con mucha frecuencia durante el muestreo. Cabe señalar que la administración no cuenta con un horario establecido para dicha desinfección ni cuenta con protocolos estandarizados para el trato sanitario de los cuerpos de agua como lo marca la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas con el fin de prevenir y minimizar los riesgos a la salud pública”.

Los biotopos donde se lograron obtener el mayor número de aislados amibianos en ambos muestreos (temporada de lluvia y de sequía) fueron las muestras mixtas seguidas de las biopelículas flotantes (Fig. 14). De acuerdo con Rodríguez-Zaragoza (1994) los procesos de resuspensión permiten que las amibas se desplacen a lo largo de toda la columna de agua, permitiéndoles alcanzar la interfase agua-aire donde disponen de condiciones más favorables para su desarrollo y proliferación, dichos procesos pueden ser provocados por la actividad de



los bañistas de la zona. Además, Wingender en el 2011 remarca la importancia de las biopelículas flotantes para el desarrollo de las amibas de vida libre, por lo que encontrarlas con frecuencia en este biotopo en particular es muy común

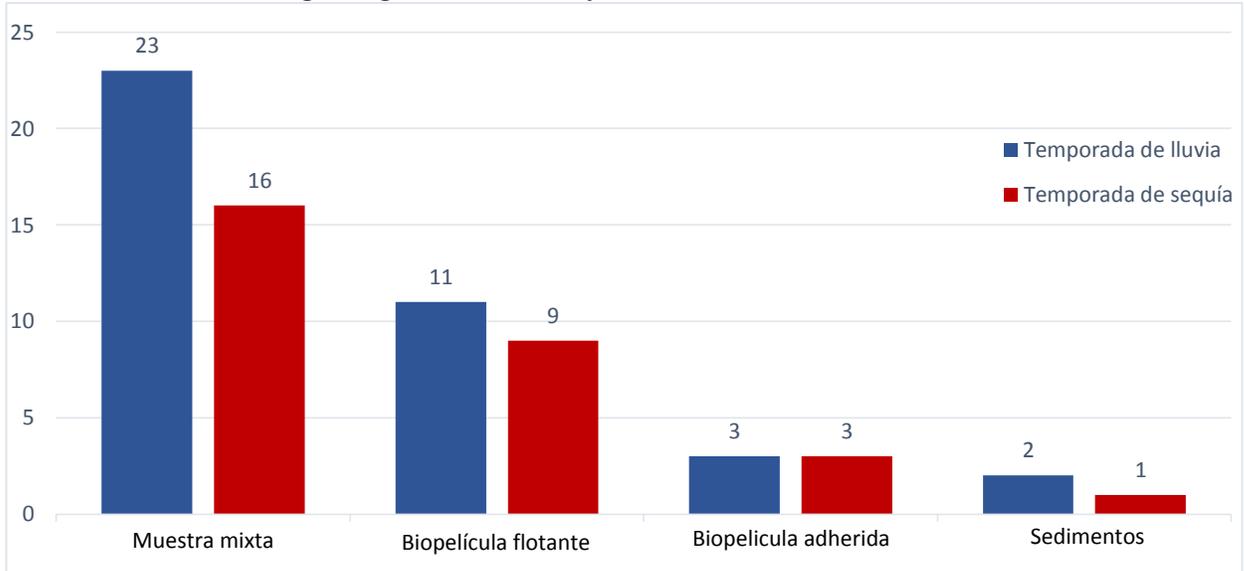


Figura 14. Muestras positivas de aislados amibianos de los diferentes biotopos presentes en los cuerpos de agua del balneario Laguna Larga, Los Azufres.

En la Figura 15 se aprecian las frecuencias de las especies amibianas aisladas de los cuerpos de agua en ambos muestreos. La época del año en la cual se registró la mayor riqueza específica de amibas de vida libre fue durante la temporada de lluvias, en la que se registraron 21 de las 23 especies totales presentes en el estudio, siendo *Naegleria fowleri* la más frecuente, ya que se logró aislar en el 66 % de los cuerpos de agua que fueron muestreados.



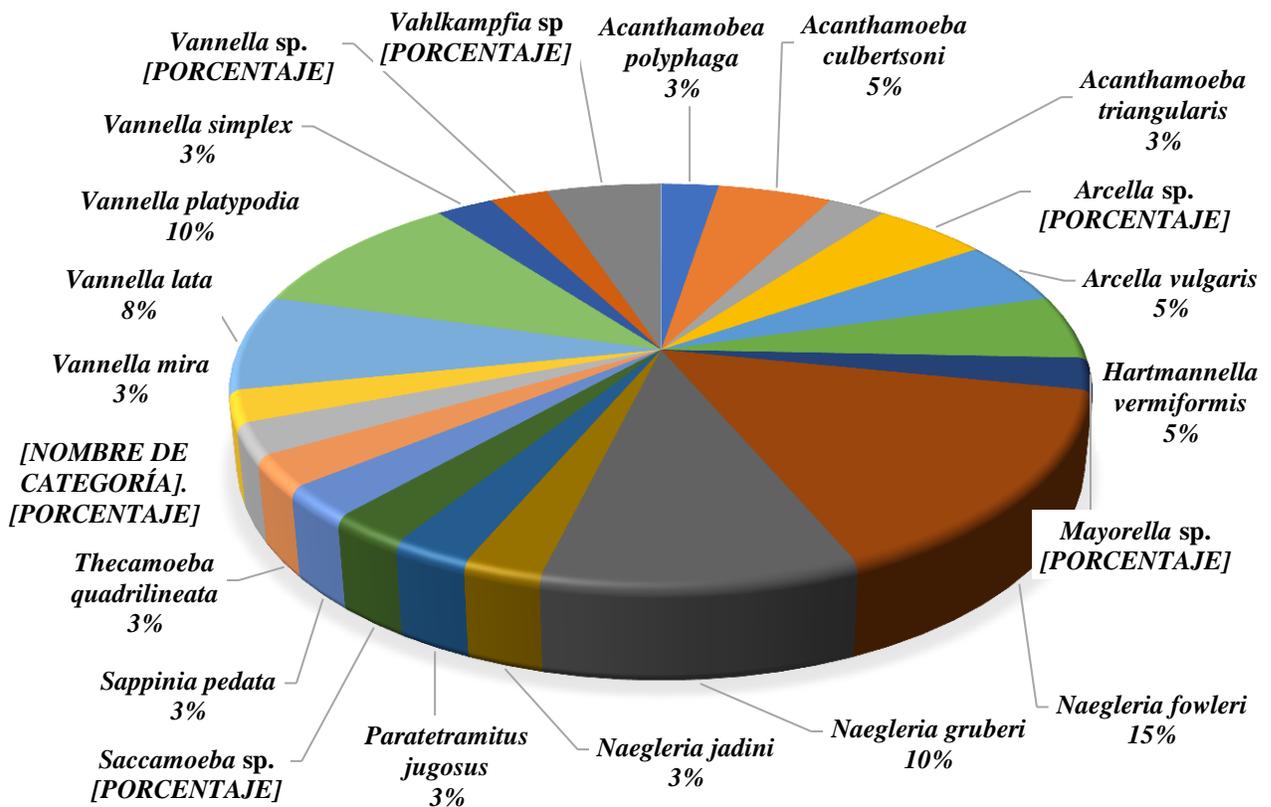


Figura 15. Frecuencia de aislados amibianos durante la temporada de lluvias en el balneario Laguna Larga, Los Azufres, Michoacán.

En contraste, durante la temporada de sequía se aislaron únicamente 13 especies; y de nueva cuenta *Naegleria fowleri* fue la amiba con mayor frecuencia en los cuerpos de agua muestreados (Fig. 16)

Se lograron aislar a los géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Sappinia* los cuales son protozoos que han sido reportados de importancia médica (Schuster, *et al.*, 2004; Visvesvara, 2006; Lorenzo-Morales, *et al.*, 2010; Trabelsi, *et al.*, 2012). La prevalencia de *Vannella* puede ser el reflejo de su habilidad para habitar la columna de agua cuando el trofozoíto cambia a su forma flotante (Page, 1988). Rodríguez-Zaragoza (1994) reporta que los géneros encontrados con mayor frecuencia en los cuerpos de agua son: *Naegleria*, *Paratetramitus*, *Vahlkampfia* y *Vermamoeba*, dichos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio. todos



presentan una fase quística que les permite sobrevivir cuando las condiciones del medio en el que se desarrollan no son favorables. La prevalencia de *Naegleria* y de otros vahlkampfidos en sistemas acuáticos puede ser explicada no solo por su amplio ámbito de tolerancia a diferentes parámetros fisicoquímicos, sino también por su fase ameboflagelar, la cual le permite migrar a lo largo de la columna de agua, tal y como lo propone Griffin en 1985.

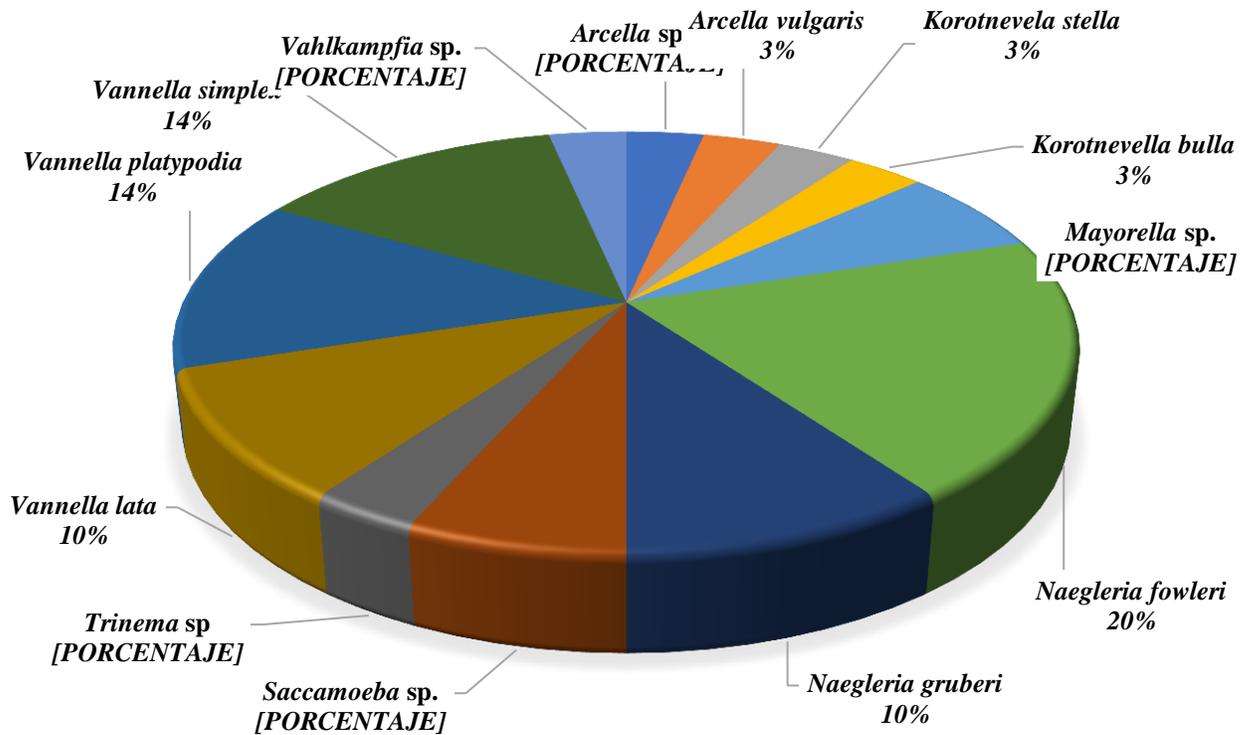


Figura 16. Frecuencia de aislados amibianos durante la temporada de sequía en el balneario Laguna Larga, Los Azufres, Michoacán.



## 2. Posición taxonómica de las especies de AVLPP registradas

De las especies de AVLPP aisladas e identificadas se incluye la ubicación taxonómica, la cual, es presentada siguiendo la clasificación propuesta por Adl y cols. en el 2018. Además de una descripción breve basada en características morfológicas de los quistes y trofozoítos, se incluyeron también las medidas de cada especie registrada.

Supergrupo: Amebozoa Lühe 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

- Tubulinea Smirnov *et al.*, 2005
  - Euamoebida Lepsi, 1960, emend. Smirnov *et al.*, 2011
    - Saccamoeba*
  - Arcellinida Kent, 1880 [Testacealobosia De Saedeleer, 1934]
    - Arcellina Haeckel, 1894
      - Arcella*
    - Echinamoebida
      - Vermamoeba*
- Discosea Cavalier-Smith *et al.*, 2004
  - Flabellinia Smirnov *et al.*, 2005
    - Dactylopodida Smirnov *et al.*, 2005
      - Korotnevella*
    - Vannellida Smirnov *et al.*, 2005
      - Vannella*
  - Longamoebia Cavalier-Smith & Smirnov in Smirnov *et al.*, 2011
    - Dermamoebida Cavalier-Smith, 2004
      - Mayorella*
- Thecamoebida Schaeffer, 1926
  - Thecamoeba*
  - Sappinia*
- Centramoebida Rogerson y Patterson 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004



*Acanthamoeba*

Supergrupo: SAR Bigelowiella natans Moestrup y Sengco, 2001 (Rhizaria), Nanney y McCoy, 1976 (Alveolata) y Cleve, 1873 (Stramenopiles).

- Rhizaria Cavalier-Smith, 2002
  - Cercozoa Cavalier-Smith 1998, emend. Adl *et al.*, 2005
    - Imbricatea Cavalier-Smith, 2011 [Cavalier-Smith, 2003]
      - Silicofilosea Adl *et al.*, 2005, emend. Adl *et al.*, 2012
        - Euglyphida Copeland 1956, emend. Cavalier-Smith, 1997
          - Trinematidae Hoogenraad y De Groot, 1940, emend Adl *et al.*, 2012

*Trienema*

Supergrupo: Excavata Cavalier-Smith, 2002, emend. Simpson, 2003

- Discoba Simpson in Hampl *et al.*, 2009
  - Discicristata Cavalier-Smith, 1998
    - Heterolobosea Page y Blanton, 1985
      - Tetramitia Cavalier-Smith 1993, emend. Cavalier-Smith en Cavalier-Smith y Nikolaev, 2008 [Vahlkampfiidae Jollos, 1917]

*Naegleria*

*Tetramitus*

*Vahlkampfia*



### 3. Descripción y registro fotográfico de las especies de AVLPP

#### *Acanthamoeba polyphaga* (Puschkarew, 1913)

El endoquiste es irregular y prácticamente nunca estelar, posee 4-6 brazos con los que se une al exoquiste. Puede ser de forma esférica y en ocasiones ovoide, llega a medir 14  $\mu\text{m}$  (Fig. 17).

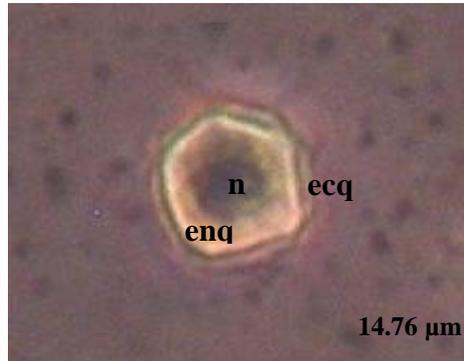


Figura 17. Fotografía del quiste de *Acanthamoeba polyphaga*, en microscopio invertido en contraste de fases, 400X. Núcleo (n), endoquiste (enq), ectoquiste (ecq).

#### *Acanthamoeba culbertsoni* (Singh y Das, 1970)

La pared del exoquiste es muy delgada, ondulada y rugosa, cercana al endoquiste. El endoquiste usualmente es redondo y ocasionalmente de forma poligonal. Mide aproximadamente entre 15 y 18  $\mu\text{m}$  (Fig. 18).

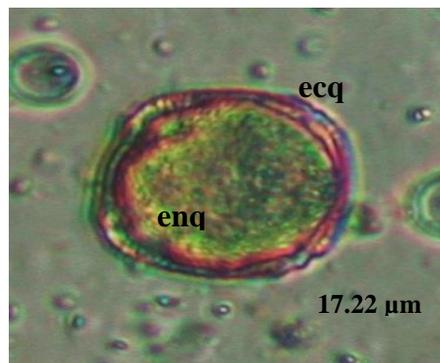


Figura 18. Fotografía del quiste de *Acanthamoeba culbertsoni*, en microscopio invertido en contraste de fases, 400X. Núcleo (n), endoquiste (enq), ectoquiste (ecq).



*Acanthamoeba triangularis* (Pussard y Pons, 1977)

El ectoquiste esférico u ovoide, endoquiste generalmente triangular, a veces cuadrado, mide aproximadamente 13  $\mu\text{m}$  (Fig. 19).

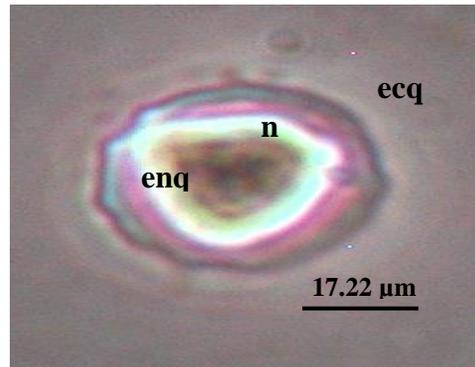


Figura 19. Fotografía del quiste de *Acanthamoeba triangularis*, en microscopio en contraste de fases, 400X. Núcleo (n), endoquiste (enq), ectoquiste (ecq).



*Naegleria fowleri* (Carter, 1970)

El trofozoíto es altamente activo y variable en forma y tamaño, se caracteriza por la presencia de lobopodios romos. El citoplasma es ligeramente granular y contiene un núcleo conspicuo con nucléolo central. Se observan vacuolas alimenticias y contráctiles. El quiste es redondo y contiene un sólo núcleo con un nucléolo central, mide entre 7 y 14  $\mu\text{m}$  (Figura 20 A-B).

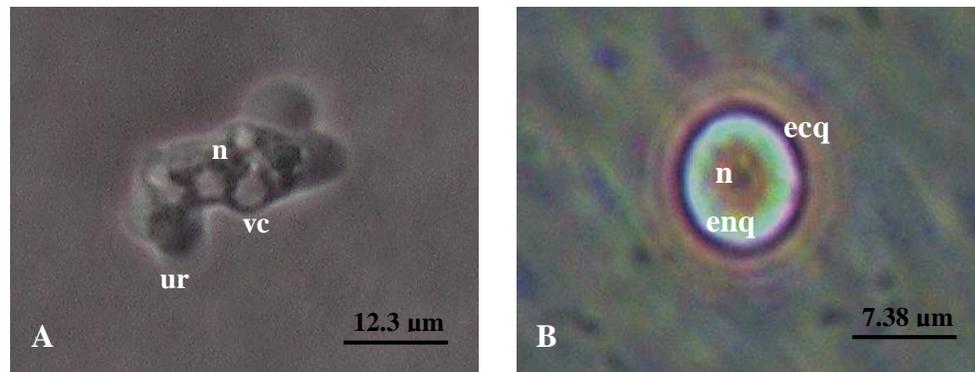


Figura 20. Fotografía del trofozoíto (A) y quiste (B) de *Naegleria fowleri* en microscopio invertido en contraste de fases, 400X. núcleo (n), vacuola contráctil (vc), uroide (ur), endoquiste (enq), ectoquiste (ecq).



### *Naegleria gruberi*

La pared del quiste puede ser lisa, rugosa o angular, también poseen poros, los cuales poseen un borde engrosado, puede medir entre 9 y 23  $\mu\text{m}$  (Fig.21 A-B).

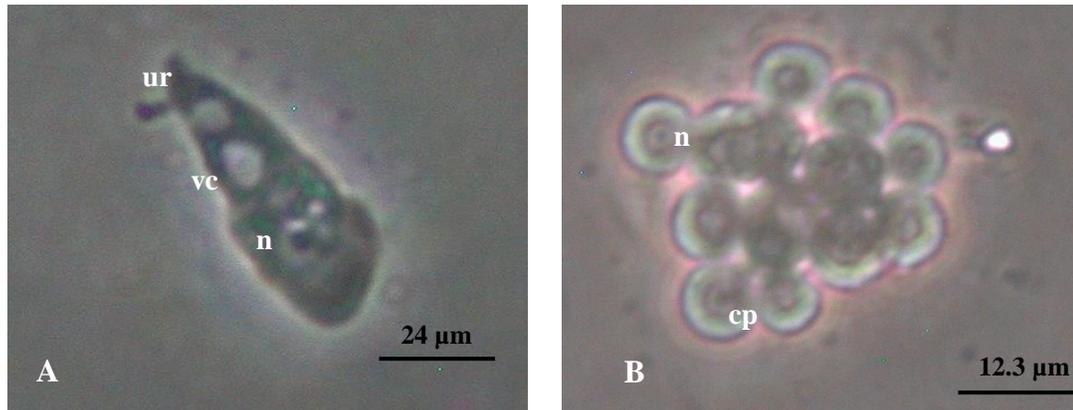


Figura 21. Fotografía del trofozoíto (A) y quiste (B) de *Naegleria gruberi* en microscopio invertido en contraste de fases, 400X núcleo (n), vacuola contráctil (vc), uroide (ur), cromatina periférica (cp).

### *Naegleria jadini* (Willaert y Le Ray, 1973)

La pared del quiste es lisa, los bordes de los poros no están engrosados (Fig. 22)

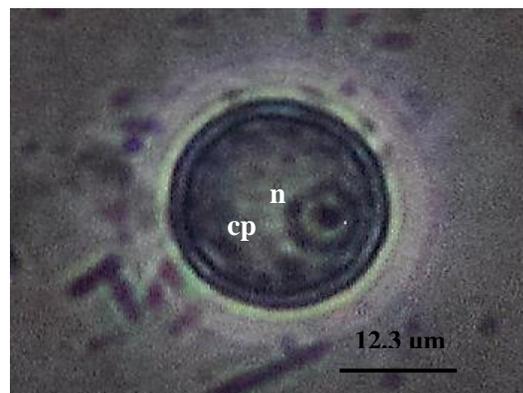


Figura 22. Fotografía de quiste de *Naegleria jadini* en microscopio invertido en contraste de fases, 400X. núcleo (n), cromatina periférica (cp).



*Sappinia pedata* Alexeiff, (1912 ex Hartmann y Nägler, 1908).

Quiste liso, presenta de dos a tres núcleos generalmente, mide aproximadamente 15- 30  $\mu\text{m}$  (Fig. 23)

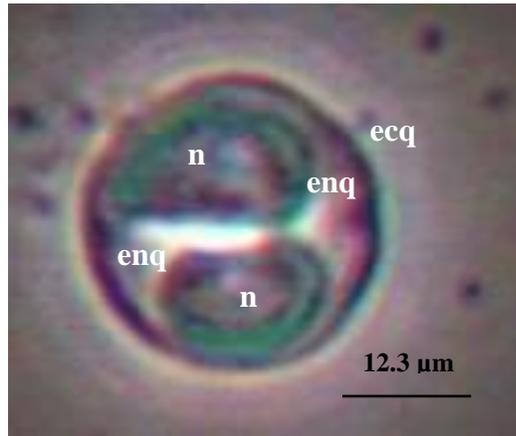


Figura 23. Fotografía de quiste de *Sappinia pedata* en microscopio invertido en contraste de fases, 400 X. Núcleo (n), endoquiste (enq), ectoquiste (ecq)



#### 4. Parámetros fisicoquímicos del agua

Los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* son resistentes a un amplio intervalo de valores de temperatura, pH, oxígeno disuelto, conductividad, entre otros, ambos géneros dentro de su ciclo de vida comparten la fase quística, la cual les confiere a las amibas una resistencia única que hace posible su sobrevivencia en ambientes con condiciones desfavorables (Schuster, 2004; Oddó, 2006; Thomas, 2010). Cabe mencionar que la temperatura ha sido el factor que más se ha citado como determinante en las variaciones de las densidades de las poblaciones de las amibas de vida libre (Dive, 1982; Kyle, 1986).

Durante la temporada de lluvias la temperatura del agua osciló entre los 26 y 40 °C, dicho periodo comprenden los meses de mayo o septiembre. La temperatura promedio durante esta temporada fue de 32 °C, siendo el mes de mayo cuando se registraron los valores más altos de temperatura (Anexo 3. Cuadro10). De la misma forma, el cuerpo de agua en el que se registró una mayor temperatura durante la temporada de lluvia fue en el nacimiento de agua termal (Fig. 24).

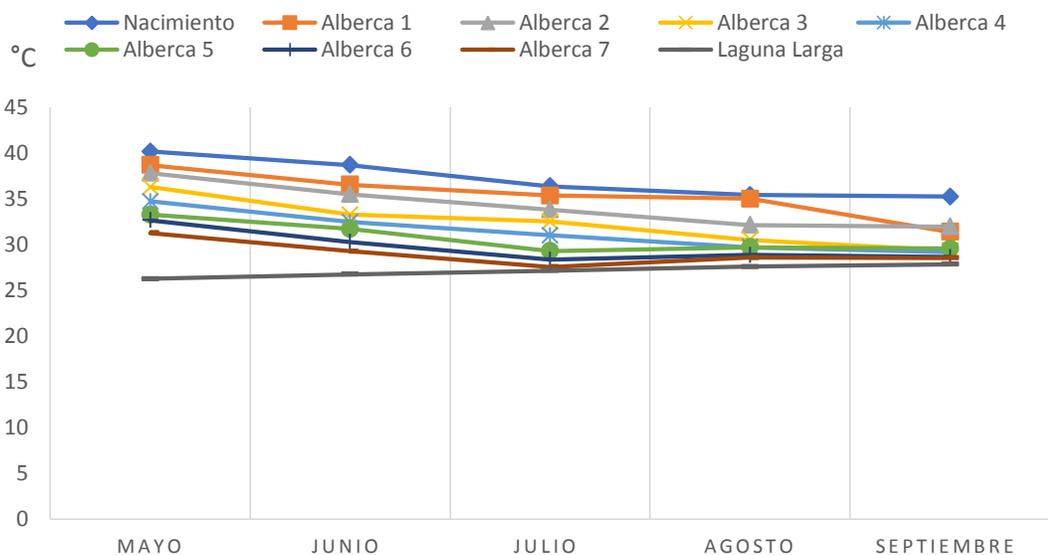


Figura 24. Temperatura del agua en el balneario Laguna Larga, Los Azufres durante la temporada de lluvia.



En contraste durante la temporada de sequía, la temperatura varió entre los 26 y 36 °C con una temperatura promedio de 31 °C. El mes en el cual se registró la temperatura más elevada fue en octubre (Ver Anexo 3. Cuadro 11). Coincidiendo con la temporada de lluvias, el nacimiento de agua termal fue el cuerpo de agua más cálido de la temporada. La temperatura promedio anual para el balneario Laguna Larga, Los Azufres fue de 31 °C (Fig. 25)

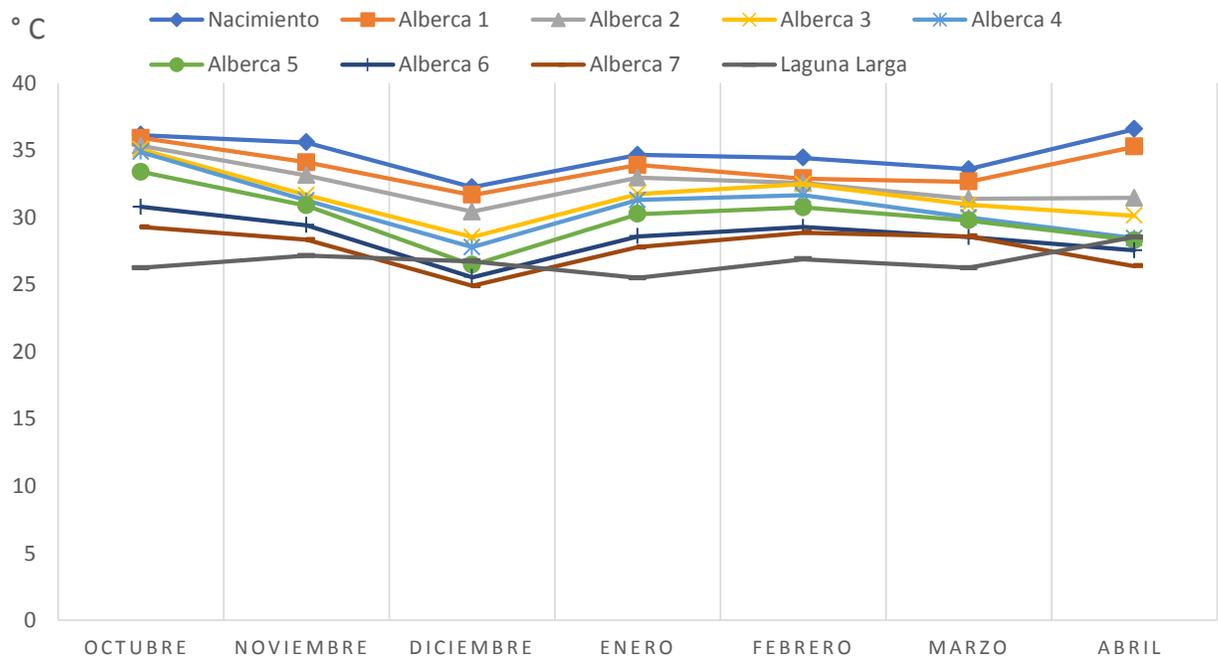


Figura 25. Temperatura del agua en el balneario Laguna Larga, Los Azufres durante la temporada de sequía.

La conductividad fue constante a lo largo de todo el año, oscilando entre los 3.47 y 3.65  $\mu\text{S}/\text{cm}$  en casi todos los cuerpos de agua, exceptuando Laguna Larga, donde los valores oscilaron entre 4.2 4.4  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Anexo 3. Cuadros 12 y 13) (Fig. 26 y 27).



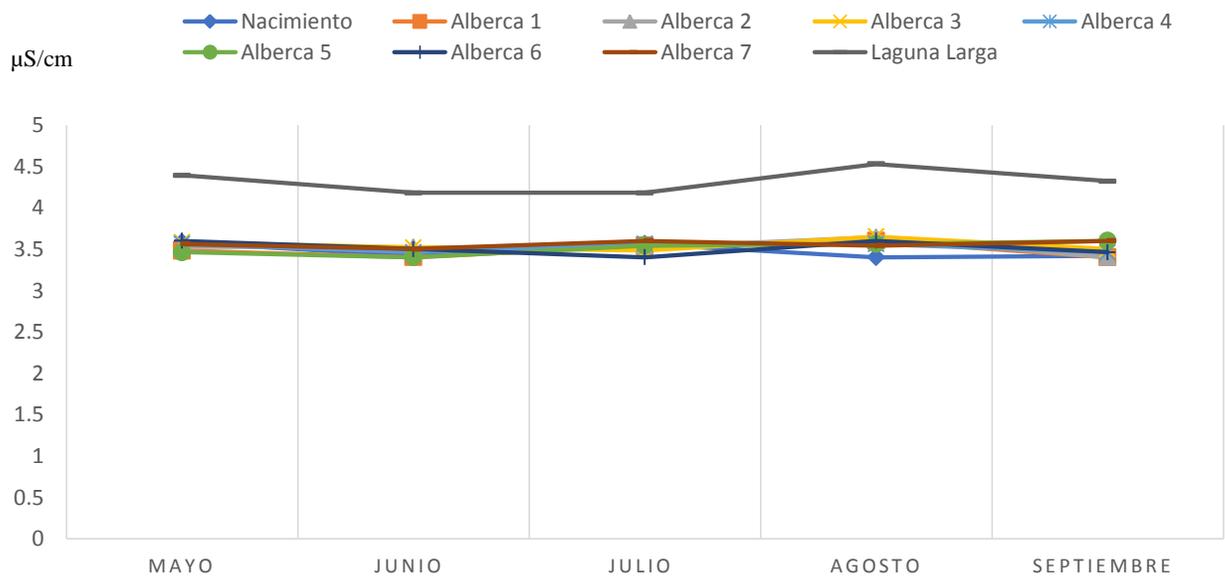


Figura 26. Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) del agua en el balneario Laguna Larga, Los Azufres durante la temporada de lluvia.

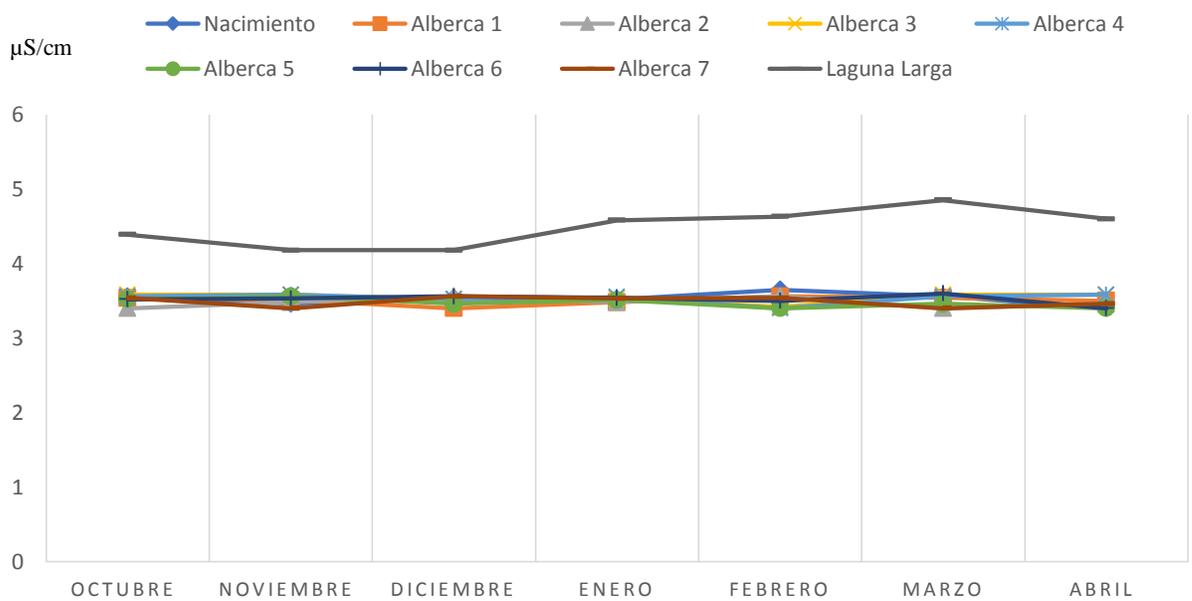


Figura 27. Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) del agua en el balneario Laguna Larga, Los Azufres durante la temporada de sequía.



El pH en todos los cuerpos de agua muestreados indica una elevada acidez, siendo el valor mínimo de 3.34 y 4.75 como máximo durante la temporada de lluvia (Fig. 28) Al igual que en los valores de la temperatura, mayo fue el mes en el cual se registraron los valores más altos de acidez, promediando 4.47 (Anexo 3. Cuadro 14).

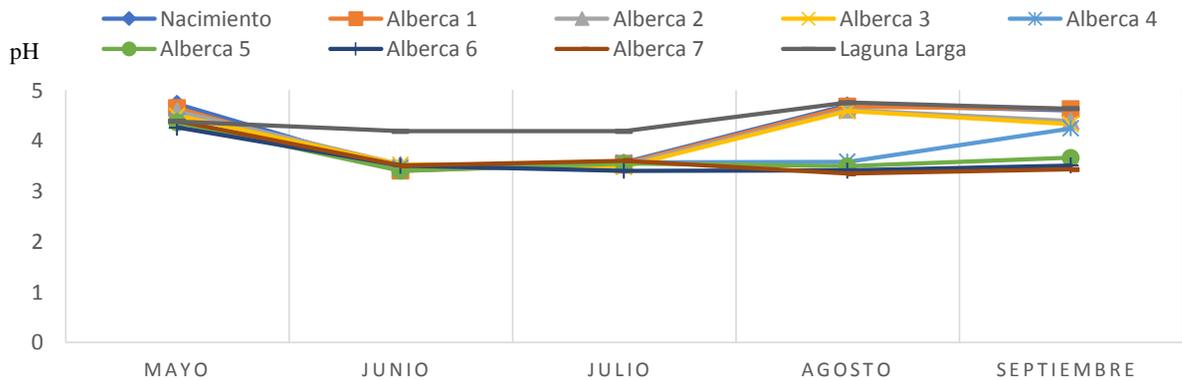


Figura 28. pH del agua en el balneario Laguna Larga, Los Azufres durante la temporada de lluvia.

Durante la temporada de sequía, los valores registrados oscilaron entre 3.3 y 4.7. La media anual registrada fue de 4.3. Siendo la temporada de lluvia en la que se registró una mayor acidez en los cuerpos de agua (Anexo 3. Cuadro 15) (Fig.29).

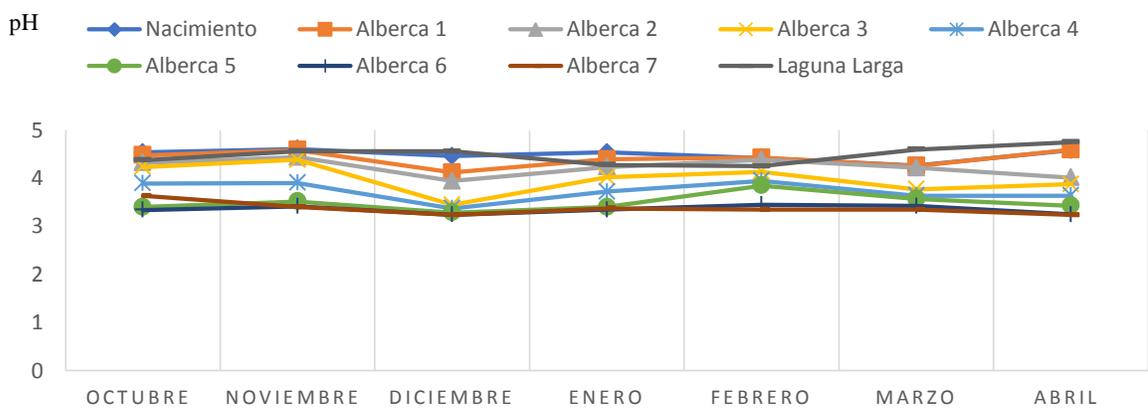


Figura 29. pH del agua en el balneario Laguna Larga, Los Azufres durante la temporada de sequía.



A excepción de la conductividad, los parámetros fisicoquímicos del agua registrados mostraron una tendencia a decrecer en función de la elevación a la que se encontraba el cuerpo de agua. Es decir, los cuerpos de agua ubicados a una mayor elevación registraron valores más elevados en temperatura y pH (menos en Laguna Larga). Esto pudiera ser explicado por la corriente generada por el gradiente de elevación anteriormente mencionado y al arrastre de materia orgánica que esto conlleva.

Los valores de pH registrados en los cuerpos de agua en el balneario Laguna Larga, Los Azufres indican una elevada acidez que no han sido documentados en otros estudios amebológicos de cuerpos de agua termales. Sin embargo, Carter en 1960 reporta que el pH tolerado por las amibas de vida libre potencialmente patógenas oscila entre 4.6 y 9.5 en cultivos *in vitro* y Kyle en 1985 reporta que las comunidades de amibas de vida libre pueden tolerar variaciones amplias en los parámetros fisicoquímicos, incluyendo el pH, por lo que dicho factor, tampoco es determinante para la presencia de las amibas de vida libre.

Se han realizado numerosos estudios enfocados a aislar amibas de vida libre con potencial patógeno de diferentes cuerpos de agua (Ávila, *et al.*, 2007; Guzmán-Fierros, *et al.* 2008; Lares-Jiménez, 2009; Bonilla-Lemus *et al.*, 2010), los resultados de la gran mayoría coinciden en que las densidades en las poblaciones de las amibas de vida libre son mayores a medida que se registran temperaturas más elevadas en los cuerpos de agua. Sin embargo, Kyle en 1985 y 1986 concluyó que los parámetros fisicoquímicos no son los principales factores que inciden en la abundancia de las poblaciones de las amibas, en su lugar, señala a eventos ambientales tales como lluvias, tormentas, corrientes de viento, etc. como determinantes para el desarrollo de dichas poblaciones en sistemas acuáticos.



## 5. Análisis estadísticos

### 5.1 Análisis de varianza multifactorial

Se realizó un análisis de varianza mediante la prueba de Tukey con ayuda del programa Sigma Plot® para comprobar si existían diferencias significativas entre los parámetros fisicoquímicos del agua para cada cuerpo de agua y entre la temporada de lluvias y sequías. La prueba indicó que existen diferencias significativas entre los factores fisicoquímicos de cada cuerpo de agua muestreado. Lo mismo sucede al comparar dichos factores entre temporadas (Cuadros 5, 6 y 7).

Cuadro 5. Análisis de varianza de la temperatura del agua. Las diferencias en los valores de los grupos de tratamiento son mayores a los esperados por probabilidad, por lo que estadísticamente existe una diferencia significativa entre dichos valores (DF) diferencia de cuadrados, (SS) suma de cuadrados (MS) cuadrados medios. ( $P = <0.001$ ).

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Grupos	17	758.372	44.610	1831.767	<0.001
Residual	72	1.753	0.0244		
Total	89	760.125			

Cuadro 6. Análisis de varianza de la conductividad del agua. Las diferencias en los valores de los grupos de tratamiento son mayores a los esperados por probabilidad, por lo que estadísticamente existe una diferencia significativa entre dichos valores (DF) diferencia de cuadrados, (SS) suma de cuadrados (MS) cuadrados medios ( $P = <0.001$ )

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Grupos	17	0.0125	0.000738	112.916	<0.001
Residual	72	0.000470	0.00000653		
Total	89	0.0130			



Cuadro 7. Análisis de varianza del pH del agua. Las diferencias en los valores de los grupos de tratamiento son mayores a los esperados por probabilidad, por lo que estadísticamente existe una diferencia significativa entre dichos valores (DF) diferencia de cuadrados, (SS) suma de cuadrados (MS) cuadrados medios (P = <0.001).

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	17	13.773	0.810	2752.865	<0.001
Residual	72	0.0212	0.000294		
Total	89	13.795			

## 5.2 Índice de Jaccard

Se compararon las poblaciones amibianas de acuerdo con la estacionalidad mediante el índice de Jaccard. Al analizar la similitud de dichas poblaciones, únicamente se encontró que las alberca1 y 6 eran similares en un 70 % aproximadamente. En la figura 30 se puede observar el grado de similitud de todos los cuerpos de agua muestreados en época de lluvias y sequía. Se construyó un dendograma con el programa Primer 6®, el cual indica que la mayoría de las albercas tienen una similitud menor al 40 %. Este bajo porcentaje podría ser explicado a que existen diferencias significativas en los factores fisicoquímicos de cada cuerpo de agua haciendo que cada unidad del balneario posea características diferentes, las cuales pueden influir en los requerimientos para el desarrollo de distintas especies de AVL.



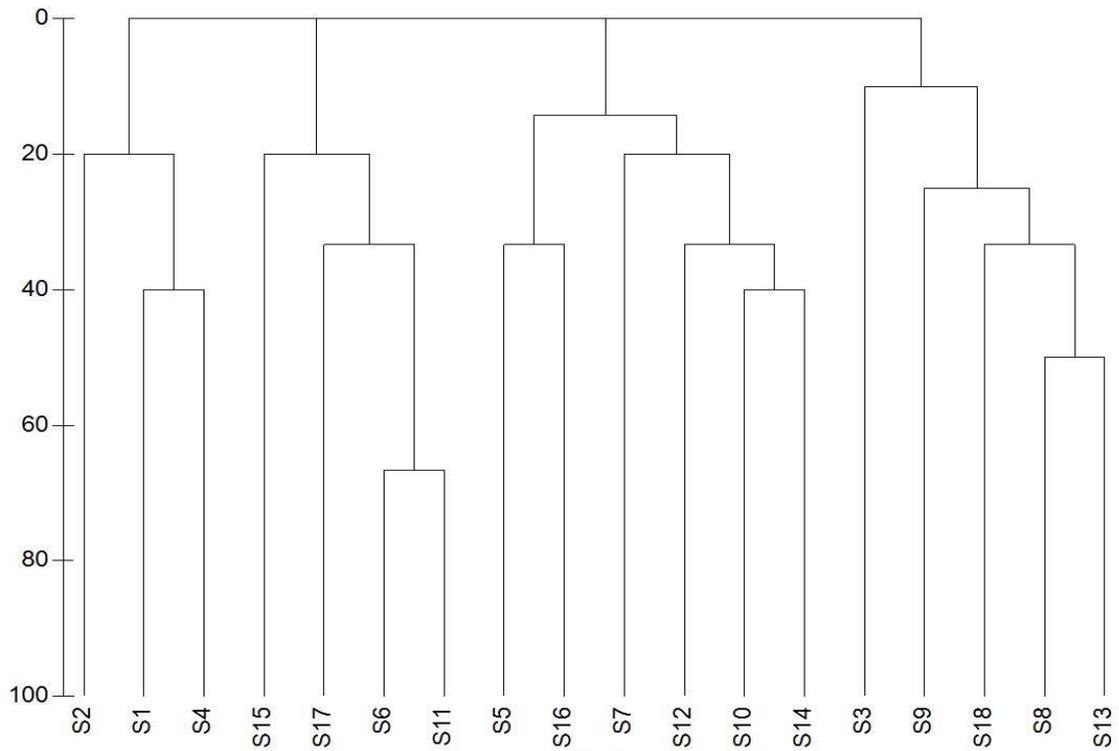


Figura 30. Dendrograma de similitud entre las poblaciones amibianas en relación con la estacionalidad



## VIII. CONCLUSIONES.

1. Se aislaron siete especies de amibas potencialmente patógenas basándose en características morfológicas: *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba triangularis*, *Naegleria fowleri*, y *Sappinia pedata*.
2. Las especies *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *A. triangularis*, *N. fowleri* y *S. pedata* aisladas en el presente estudio se han reportado como patógenas para el ser humano.
3. *Naegleria fowleri* fue la amiba aislada con mayor frecuencia de los cuerpos de agua que fueron muestreados.
4. Los biotopos de los cuales se logró aislar el mayor número de especies provinieron de las muestras mixtas, ya que la presencia de los demás biotopos no fue muy frecuente, debido en gran parte al mantenimiento y limpieza efectuados en las albercas del balneario.
5. Durante la época de lluvias se encontró una mayor riqueza específica de amibas de vida libre potencialmente patógenas.
6. Al registrar varias especies de amibas de vida libre en cuerpos de agua con temperaturas elevados y niveles de pH tan bajos confirman que estos protozoos son organismos euróicos y resistentes a ambientes extremos.
7. Los cuerpos de agua que forman el balneario Laguna Larga, Los Azufres poseen características fisicoquímicas estadísticamente diferentes haciendo que cada cuerpo de agua ofrezca condiciones de desarrollo distintas para las amibas de vida libre.



8. La similitud entre las poblaciones amebianas durante la época de lluvias y sequía fue del 40%
9. La presencia de amebas de vida libre potencialmente patógenas representa un posible foco de infección para los turistas del balneario, lo cual, remarca la importancia de hacer cumplir la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010 en la cual se estipula que *Naegleria fowleri* y el género *Acanthamoeba* deben estar ausentes en aguas de tipo recreativo y de contacto directo.
10. Se debe de notificar a los turistas de la zona de los posibles riesgos para la salud que implican realizar actividades acuáticas en el balneario, así como promover acciones de prevención como el uso de goggles, narigueras y evitar nadar si se tienen heridas o alguna condición de inmunoincompetencia.



## IX. LITERATURA CITADA.

- Adl, S., Bass, D., Lane, C., Lukes, J., Schoch, C., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M., Burki, F., Cárdenas, P., Cepicka, I., Chistyakova, L., del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Himpl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., James, T., Karnkowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavstev, A., Lahr, D., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D., Mann, D., Massana, R., Mitchell, E., Morrow, C., Soo Park, J., Pawlowski, J., Powell, M., Richter, D., Reuckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky y V., Zhang, Q. 2018. Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*, **64**, 4-119
- Arévalo-Pacheco, G. y García-Rojas, H. 2004. Turismo de salud por medio del aprovechamiento de aguas termales. *Caso de la Ruta de la Salud Michoacán. Economía y Sociedad*. **38** (31):121-143
- Ávila, I., Rodríguez, M., Infante, D., Llovera, V., Álvarez, D. y Briceño, M. 2007. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque “Las Cacuizas”, Maracay, Venezuela. *Rev. Cubana Med. Trop.* **58** (1):19-24
- Baig, A. y Khan, N. 2015. A proposed cascade of vascular events leading to granulomatous amoebic encephalitis. *Microbiol. Path.* **88**, 48-51
- Baig, A. 2016. Primary amoebic meningoencephalitis preventive nose plugs: Prophylaxis against *Naegleria fowleri*. *J. Med. Dev.* **10**, 1-3
- Baird, R., Eaton, A., Rice, E. 1999. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association. American Water Works Association, Water Environment Association. 733 p



- Bonilla-Lemus, P., Ramírez-Bautista, G., Zamora-Muñoz, M., Ibarra-Montes, M., Ramírez-Flores, E. y Hernández-Martínez, M. 2010. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Exp. Parasitol.* **126**, 54-58
- Bonilla-Lemus, P., Caballero-Villegas, A., Carmona-Jiménez, J., Lugo-Vázquez, A. 2014. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Exp Parasitol.* **145**, 28-33
- Bravo, F., G., Álvarez, P. y Gotuzzo, E. 2011. *Balamuthia mandrillaris* infection to the skin and central nervous system: an emerging disease of concern to many specialties in medicine. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **24**, 112-117
- Cabello-Vílchez, A., Rodríguez-Zaragoza, S., Piñero, J., Valladares, B. y Lorenzo-Morales, J. 2014. *Balamuthia mandrillaris* in South America: An emerging potential hidden pathogen in Peru. *Exp. Parasitol.* **145**, 107-119
- Cabello-Vílchez, A. 2016. *Balamuthia mandrillaris* in Perú, lesiones cutáneas, meningoencefalitis y métodos de cultivo. *Infect.* **20** (2):107-119
- Carlesso, A., Braga, A., Lazzari, G. y Brittes, M. 2007. Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **40**, 316-320
- Carter, F. 1960. Description of *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningoencephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *The Journal of pathology.* **32** (1): 99-105



- Centeno, M., Rivera, F., Cerva, L., Tsutsumi, M., Gallegos, E., Calderón, A., Ortíz, R., Bonilla, P., Ramírez, E. y Sánchez, G. 1996. *Hartmannella vermiformis* isolated from the cerebrospinal fluid of a young male patient with meningoencephalitis and bronchopneumonia. *Arch. Med. Res.* **27**, 579-586
- Cervantes-Sandoval, I., Serrano-Luna, J., Tapia-Malagón, J., Pacheco-Yépez, J., Silva-Olivares, A., Galindo-Gómez, S., Tsutsumi, V. y Shibayama, M., Characterization of *Naegleria fowleri* strains isolated from human cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexico. *Rev. Inv. Clin.* **59** (5):342-347
- Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. 2015. *Manual Operativo. Vigilancia de Agua de Contacto Primario en Playas y Cuerpos de Agua Dulce.* Secretaría de Salud, México, D.F. 1-30 pp
- Chalmers, R. 2014. *Naegleria*. En: Percival, S., Williams. D., Gray, N., Yates, M. y Chalmers, R (eds). *Microbiology of Waterborne Diseases*. Ed. Academic Press. 2a ed. 407-416
- Chao, A., Chazdon, R., Colwell, R. y Shen, T. 2004. Un nuevo método estadístico para la evaluación de la similitud en la composición de especies con datos de incidencia y abundancia. *Ecol. Letters.* **8**, 148-159
- Chertorivski-Woldenberg, S., Kuri-Morales, P., Fajardo-Dolci, G., Rosette-Valencia y González-Roldán, J. 2012. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Meningoencefalitis Amebiana Primaria (Amibas de Vida Libre).* Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. México, Distrito Federal. 1-49



- Cope, J. y Ali, I. 2016. Primary amebic meningoencephalitis: What have we learned in the last 5 years? *Curr. Infect. Dis. Rep.* **18** (10): 31
- CONABIO. Los Azufres, Michoacán. 2017. [En línea] Disponible en: [http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp\\_063.html](http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/regionalizacion/doctos/rhp_063.html). Consultado en agosto del 2018
- De Jonckheere, J. 1984. *Posgraduate Course on Biochemical Techniques for the Diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis*. UNAM, México. 70 p
- De Jonckheere, J. 1987. Taxonomy. En: Rondanelli, E. (eds). *Amphizoic amoebic human pathology*. Padua, Italy: Piccin Nuova Libreria. 25-48
- De Jonckheere, J. 2002. A Century of Research of the Ameboflagellate Genus *Naegleria*. *Acta Protozool.* **41**, 309-342
- De Jonckheere, J. 2011. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic ameboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infect. Gen. Evol.* **11**, 1520-1528
- De Jonckheere, J. 2014. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Exp. Parasitol.* **145**, S2-S9
- Dive, D., Delattre, J y Leclerc, H. 1982. Occurrence of thermotolerant amoebae in an electric power plant cooling pond. *J Therm Biol.* **7**, 11-14
- Ecke, D., Sampath, R., Willet, P., Sampath, R. y Budowle, B. 2005. The Microbial Rosetta Stone database: a common structure for microbial biosecurity threat agents. *BMC Microbiol.* **50** (6): 1380-1385



- Fowler, C. y Carter, R. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Br. Med. J.* **2**, 740-743
- Gallegos-Neyra, E., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M. y Nayén-Estrada, R. 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Rev. Mex. Biodiv. Supl* **85**, 510-525
- Gelman, B., Rauf, S., Nader, R., Popov, V., Borkowsky, J., Chaljub, G., Nauta, H. y Visvesvara, G. 2001. Amebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA.* **285** (19): 2450-2451
- González-Robles, A., Lares-Villa, F., Lares-Jiménez, L., Omaña-Molina, M., Salazar-Villatoro, L. y Martínez-Palomo, A. 2015. *Balamuthia mandrillaris*: Further morfological observations of trophozoites by light, scanning and transmission electron microscopy. *Exp. Parasitol.* **29** (10):483-488
- Griffin, J. 1983. The pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*: environmental isolations, competitors, ecologic interactions and the flagellate-empty habitat hypothesis. *J Protozool.* **30** (2): 403-409
- Gutiérrez, A. y Aumento, F. 1982. The Los Azufres, Michoacan, Mexico, geothermal field. *J. Hydrol.* **56**, 137-162
- Guzmán-Fierros, E., De Jonckheere, J. y Lares-Villa, F. 2008. Identificación de especies de *Naegleria* en sitios recreativos en Hornos, Sonora. *Rev. Mex. Biodiv.* **79**, 1-5.
- Hall, W. 2012. Free-Living Amoebas: Is it safe to go in the water? *World Neurosurgery* **78** (6): 610-611



- Jain, R., Prabhakar, S., Modi, M., Bathia, R. y Sehgal, R. *Naegleria meningitis*: A rare survival. *Neurol. India*. **50**, 470-472
- Jeong, H., Lee, S., Kim, J., Xuan, Y., Lee, K., Park, S., Choi, S., Chung, D., Kong, H., Ock, M. y Yu, H. 2007. *Acanthamoeba*: kerathopathogenicity isolates from domestic tap water in Korea. *Exp. Parasitol.* **117**, 357-367
- Khan, N., Jarroll, E., Paget, T. 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Curr. Microbiol.* **43**, 204-208
- Khan, N. 2008. *Acanthamoeba* and the blood-brain barrier: the breakthrough. *J. Med. Microbiol.* **57**, 1051-1057
- Kyle, D., Noblet, G. 1985. Vertical Distribution of Potentially Pathogenic Free-living Amoebae in Freshwater Lakes 1. *The Journal of Protozoology.* **32** (1): 99-105
- Kyle, D., Noblet, G. 1986. Vertical Distribution of Potentially Pathogenic Free-living Amoebae. I Willard's Pond. *The Journal of Protozoology.* **33** (3): 99-105
- Lares-Jiménez, F., Lares-Villa, F. 1991. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle de Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales.* **5** (2): 161-167
- Lares-Jiménez, L.F y Lares-Villa, F. 2009. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle de Mayo, Sonora. *Rev. Latin. Rec. Nat.* **5** (2): 161-1677



- Lares-Jiménez, L.F., Borquéz-Román, M., Lares-García, C., Otero-Ruíz, A., González-Galaviz, J., Ibarra-Gómez, J., Lares-Villa, F. 2018. Potentially pathogenic genera of free-living amoebae coexisting in a thermal spring. *Exp Parasitol.* **195**, 54-48
- Lares-Villa, F., De Jonckheere, J., De Moura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernández-Quintanilla, G., Ruíz-Matus, C. y Visvesvara, G. 1993. Five Cases of Primary Amoebic Meningoencephalitis in Mexicali: Study of the Isolates. *J. Clin. Microbiol.* **31** (3):685-688
- Lares-Villa, F. 2001. Free living amoebic infections in Mexico. In proceeding IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae. Paris, France. John Libbey Eurotext.
- Lares-Villa, F. y Ayala-Montenegro, I., Verdugo, 2001. Amibas de vida libre aisladas de jacuzzis y piscinas de uso recreativo en Hermosillo, Sonora. Publicación del Instituto Tecnológico de Sonora y Dirección de Investigación y Estudios de Posgrado. **3**, 39-47
- Lares-Villa, F. 2010. Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). *Exp Parasitol.* **126**, 33-36
- López-Corella, E., De León, B. y De Jonckheere, J. 1989. Meningoencefalitis amibiana primaria por *Naegleria fowleri* en un adolescente de Huetamo, Michoacán. *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* **48** (9):619-622
- Lorenzo-Morales, J., Marciano-Cabral, F., Lindo, J., Visvesvara, G. y Maciver, S. 2010. Pathogenicity of amoebae. *Exp. Parasitol.* **126**, 2-3



- Lorenzo-Morales, J., Cabello-Vílchez, A., Martín-Navarro, C., Martínez-Carretero, E., Piñero, J. y Valladares, B. 2013. Is *Balamuthia mandrillaris* a public health concern worldwide? *Trends. Parasitol.* **29** (10):483-488
- Lorenzo-Morales, J., Khan, N. y Walochnik, J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis pathogenesis and treatment. *Parasite.* **22**, 1-10
- Marciano-Cabral, F., Mc Lean, R., Menzah, A. y Le Pat, Polasko. 2003. Identification of *Naegleria fowleri* in domestic water sources by nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60** (10):5864-5869
- Martínez, A. y Visvesvara, G. 1997. Free living amphizoic and opportunistic amebas. *Brain. Pathol.* **7**, 583-598.
- Martínez, J. 1985. *Free-living amoebas: natural history, prevention, diagnosis, pathology, and treatment of disease*. CRC Press. Boca Raton, Florida. 156 p
- Martínez-Castillo, M., Cárdenas-Zúñiga, R., Coronado-Velázquez, D., Debnath, A., Serrano-Luna, J. y Shibayama, M. 2016. *Naegleria fowleri* after 50 years: is it a neglected pathogen? *J Med Microbiol* **65**, 885-896
- Niyyati, M., Naghanhi, A., Behniafar, H., Lasjerdi, Z. 2018. Occurrence of Free-Living Amoebae in Nasal Swabs of Patients of Intensive Care Unit (ICU) and Critical Care Unit (CCU) and Their Surrounding Environments. *Iran J Public Health.* **46** (6): 908-913
- Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas. Diario Oficial de la Nación [Disponible en línea]:



www.salud.gob.mx/cdi/nom/compi/NOM-245-SSA1-2012\_250612.pdf. Consultado en: agosto del 2018

- Oddó, D. 2006. Infecciones por amibas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. *Rev. Chil. Infect.* **23** (3): 200-214.
- Ortíz-Ortega, R., Vílchez-Flores, A., Rodríguez-Monroy, A. y Bonilla-Lemus, P. 2014. Pathogenic free-living amoebae of the genera *Acanthamoeba* in recreational water in the Huasteca Potosina, Mexico. *BIOCYT.* **7** (25): 474-481
- Page, F.C. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae with instructions for culture. Culture Collection of Algae and Protozoa. Fresh Water Biological Association Scientific Publication. Londres. 122
- Primer (versión 6) [software]. (2011) Primer-e empowering research, Obtenido de: <http://www.primer-e-com/download/>
- Pussard, M., Pons, R. 1997. Morphologie de la paroi Kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida) *Protistologica.* XIII. **4**, 557-598
- Qvanstrom, Y., da Silva, A., Schuster, F., Gelman, B. y Visvesvara, G. 2009. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as causative agent of amoebic encephalitis. *J. Infect. Dis.* **199**, 139-142
- Rivera. F., Medina. F., Ramírez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G., Robles, E. 1984. Pathogenic and Free-Living Protozoa Cultured from the Nasopharyngeal and Oral Regions of Dental Patients. *Environmental Research.* **33**, 428-440



- Rivera, F., Rosas, I., Castillo, M., Chávez, M., Gómez, R., Chío, R., Islas, J. 1986. Pathogenic and Free-Living Protozoa Cultured from the Nasopharyngeal and Oral Regions of Dental Patients II. *Environmental Research*. **39** (2): 364-371
- Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramírez, E., Bonilla, P. y Lares, F. 1987. Amoeba isolated from the atmosphere of Mexico City and Environs. *Environ. R.* **42**, 149-154
- Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla P., Calderón, A., Martínez, J., Rodríguez, S. y Alcocer, J. 1988. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environ. R.* **50**, 289-295
- Rivera, F., Lares, F., Morayta, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Xóchichua, L., Calderón, A. 1989. Contaminación del líquido cefalorraquídeo de un infante con síndrome de Arnold-Chiari tipo II, hidrocefalia y mielomeningocele, por *Naegleria lovaniensis*. *Revista de enfermedades infecciosas en Pediatría*. **9**, 91-94
- Rivera, F., Centeno, M., Gallegos, E., Visvesvara, G., Calderón, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R. y Rodríguez, S. 1992. *Case of amoebic meningoencephalitis caused by a strain of Hartmannella vermiformis*. Abstract of The International Conference on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae, August. Richmond, Va.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez-Zaragoza, S., Ortiz, R., Zaldívar, B., Ramírez, P., Durán, A. 1993. Pathogenic and Free-Living Amoebae Isolated from Swimming Pools and Physiotherapy Tubs in Mexico. *Environmental Research*. **62**, 43-52



- Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R. y Hernández, D. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollution*. **74**, 65-87
- Rodríguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critical Reviews in Microbiology* **20** (3): 225-241
- Romero-Cabello, R. 2007. Sarcodinos de vida libre como patógenos del hombre. En: Romero-Cabello (eds). *Microbiología y parasitología humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. Ed. Médico Panamericana. 3ª ed. México, D.F 763-769 pp
- Samples, J., Binder, P., Lubel, F., Foint, M., Visvesvara, G. y Peter, C. 1984. *Acanthamoeba* keratitis possibly acquired from a hot tub. *Arch. Ophthalmol.* **102**, 707-710
- Schneid, P. 2018. Free-Living Amoeba and Their Multiple Impacts on Environmental Health. En: Elias, S (eds). *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*. 2<sup>nd</sup> ed. 1-14
- Schuster, F.L y Visvesvara, G. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *Int. J. Parasitol.* **34**, 1001-1027.
- Siddiqui, R., Khan, N. 2008. *Balamuthia* amebic encephalitis: An emerging disease with fatal consequences. *Micro. Pathol.* **44**, 435-438
- Siddiqui, R., Khan, N. 2015. *Balamuthia mandrillaris*: morphology, biology and virulence. *Trop. Parasitol.* **5**, 15-22



- Siddiqui, R., Ibne, K., Cope, J. y Khan, N. 2016. Biology and pathogenesis of *Naegleria fowleri*. *Acta Tropica*. 1-61
- Sigma Plot® (versión 13) [software]. (2016). Obtenido de: <https://systasoftware.com/downloads/#sp>
- Stanford-Camargo, S., Ibarra-González, M., Medina-Ortíz, G., Corona-Buendía, H., Cruz-Miranda, S. y Padilla-Ramírez, J. Insectos acuáticos de Los Azufres y Enandio, Michoacán, México. *Entomol. Mex.* **2**, 132-138
- Statford, M. y Griffith, A. 1978. Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* **108**, 33-73
- Tapia, J. 2012. Amibas de vida libre. **En:** Tay, J (eds). *Microbiología y Parasitología Médicas*. 4ª ed. Editorial Médico Panamericana. México, D.F. Cap. 86. 749-761 pp.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, H., Sellami, A., Cheikhrouhou, F., Neji, s., Makni, F. y Ayadi, A. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinicla review. *Pathol. Biol.* **60**, 399-405
- Thomas, V., McDonell, G., Denyer, S. y Maillard, J. 2010. Free-living amoebae and their intracelular pathogenic microorganism: risk for the wáter quality. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 231-259
- Valenzuela, G., López-Corella, E. y De Jonckheere, J. 1984. Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from north western Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **78**, 558-559



- Visvesvara, G. y Sther-Green, J. 1990. Epidemiology of free-living ameba infections. *J. Protozool.* **37**(4): 25s-33s
- Visvesvara, G. 1991. Classification of *Acanthamoeba*. *Rev. Infect. Dis.* **13** (5): S369-S372
- Visvesvara, G. 2006. Pathogenic and Opportunistic Free-Living amoebae. **En:** Aminoff, M., Boller, F. y Swaab, D. (eds). *Handbook of Clinical Neuroparasitology and Tropical Neurology* Ed. Elsevier. Vol. 114. (3rd. Series). 153-168
- Visvesvara, G., Moura, H., Schuster, F. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* **50**, 1-26 pp.
- Visvesvara, G., Schuster, F. 2008. Opportunistic Free-living Ameba, Part I *Clin. Microbiol. Newsletter* **30**(20): 151-158
- Visvesvara, G. 2010. Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment. *Curr. Dis.* **23**, 590-594
- Visvesvara, G. 2013. Infections with free-living amebae. **En:** Aminoff, M., Boller, F. y Swaab, D. (eds). *Handbook of Clinical Neurology. Neuroparasitology and Tropical Neurology*. Vol. 114. (3rd. Series). 153-168 pp
- Walochnick, J., Wylezych, C. y Michel, R. 2010. The genus *Sappinia*: Hystory, phylogeny and medical relevance. *Exp. Parasitol.* **126**, 4-13



- Wingender, J., Flemming, H. 2011. Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. **214**
- World Health Organization. 2001. *Sustainable Development and Healthy Environments. Bathing Water Quality and Human Health. Protection of the Human Environment Water. Sanitation and Health*. United Kingdom. 1-57 p
- Yamanouchi, K., Arima, H., Sakamoto, Y., Kanto, K., Kasai, K., Ito, K. Inaba, T. 2018. First report of the isolation of *Balamuthia mandrillaris* in the northern region of Japan. *Parasitol Res*. 2895-2890
- Yolder, J., Straif-Bourgeois, S., Roy, S., Moore, T., Visvesvara, G., Ratard, R., Hill, V., Wilson, J., Linscott, A., Crger, R., Kozak, N., Sriram, R., Narayanan, J., Mull, B., Kahler, A., Schneeberger, C., da Silva, A., Poudel, M., Baumgarten, K., Xiaoi, L. y Beach, M. 2012. Primary amebic meningoencephalitis deaths associated with sinus irrigation using contaminated tap water. *Clin. Infect Dis*. 1-7



## X. ANEXOS

### Anexo 1. Casos de infecciones por amibas de vida libre en el país

Cuadro 8. Casos de MEAP en la República de Mexicana (Lares-Villa, 2001; Tapia, 2012).

Caso	Fecha	Edad	Sexo	Días de infección	Método de diagnóstico	Estado de residencia
1	Agosto, 1978	16	M	4	Necropsia	Baja California
2	1983	2	F	-	Amiba en líquido Cefalorraquídeo	Nuevo León
3	Abril, 1986	13	M	3	Necropsia	Michoacán
4	Julio, 1989	15	M	7	Epidemiológico	Baja California
5	Agosto, 1989	15	M	7	Epidemiológico	Baja California
6	Agosto, 1989	15	M	2	Epidemiológico	Baja California
7	Agosto, 1989	12	M	4	Epidemiológico	Baja California
8	Agosto, 1989	5	M	6	Epidemiológico	Baja California
9	Agosto, 1989	12	M	5	Epidemiológico	Baja California
10	Agosto, 1989	14	M	4	Epidemiológico	Baja California



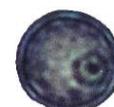
Cuadro 8. Casos de MEAP en la República de Mexicana (Lares-Villa, 2001; Tapia, 2012).

Caso	Fecha	Edad	Sexo	Días de infección	Método de diagnóstico	Estado de residencia
11	Septiembre, 1989	17	M	2	Epidemiológico	Baja California
12	Septiembre, 1989	9	M	8	Epidemiológico	Baja California
13	Julio, 1990	18	M	7	Cultivo	Baja California
14	Agosto, 1990	10	M	4	Amiba en líquido Cefalorraquídeo	Baja California
15	Agosto, 1990	18	M	3	Cultivo	Baja California
16	Agosto, 1990	12	M	5	Cultivo	Sonora
17	Agosto, 1990	10	M	5	Cultivo	Baja California
18	Agosto, 1990	2	M	5	Amiba en líquido Cefalorraquídeo	Baja California
19	Agosto, 1990	1	M	2	Cultivo	Baja California
20	Junio, 1991	30	M	9	Amiba en líquido Cefalorraquídeo	Baja California



Cuadro 8. Casos de MEAP en la República de Mexicana (Lares-Villa, 2001; Tapia, 2012).

<b>Caso</b>	<b>Fecha</b>	<b>Edad</b>	<b>Sexo</b>	<b>Días de infección</b>	<b>Método de diagnóstico</b>	<b>Estado de residencia</b>
21	Septiembre, 1991	2	F	6	Cultivo	Baja California
22	Agosto, 1992	8	M	3	Cultivo	Baja California
23	Agosto, 1992	13	M	16	Amiba en líquido Cefalorraquídeo	Baja California
24	Septiembre 1992	9	M	-	Amiba en líquido Cefalorraquídeo	Baja California
25	Julio 1994	13	M	10	Amiba en líquido Cefalorraquídeo	Tamaulipas
26	Julio 1998	11	F	-	Amiba en líquido Cefalorraquídeo	Baja California
27	Agosto 1998	17	M	3	Cultivo	Sonora
28	Agosto 1999	6	M	-	Cultivo	Baja California
29	Agosto 1999	30	F	10	Cultivo	Sonora
30	Junio 2001	10	M	4	Cultivo	Chihuahua



Cuadro 8. Casos de MEAP en la República de Mexicana (Lares-Villa, 2001; Tapia, 2012).

Caso	Fecha	Edad	Sexo	Días de infección	Método de diagnóstico	Estado de residencia
31	2003	9	M	-	Cultivo	Baja California
32	2005	20	M	-	Cultivo	Baja California
33	Julio 2006	8	M	-	Cultivo	Sonora
34	Mayo 2008	12	M	-	Cultivo	Hidalgo

Cuadro 9. Casos de EAG por *Balamuthia mandrillaris* en la República de Mexicana (Lares-Villa, 2001).

Caso	Fecha	Edad	Sexo	Estado de residencia
1	1988	39	M	Ciudad de México
2	1989	33	M	Jalisco
3	1991	9	M	Jalisco
4	1991	14	M	Jalisco
5	1992	3	M	Jalisco
6	1995	4 meses	M	Ciudad de México
7	-	39	M	Ciudad de México
8	1992	25	M	Estado de México
9	1994	42	F	Ciudad de México
10	1995	32	F	Guanajuato



Cuadro 9. Casos de EAG por *Balamuthia mandrillaris* en la República de Mexicana (Lares-Villa, 2001).

Caso	Fecha	Edad	Sexo	Estado de residencia
11	-	7	M	Guanajuato
12	1998	10	M	Puebla



## Anexo 2. Descripción taxonómica de AVL del balneario Laguna Larga, Los Azufres

### *Vermamoeba vermiformis*

Los trofozoítos miden 23  $\mu\text{m}$ , usualmente poseen cristales bipiramidales embebidos en su citoplasma. Forma flotante con pseudópodos romos. El quiste es liso, esférico u ovoide con una pared delgada (Fig. 31 A-B).

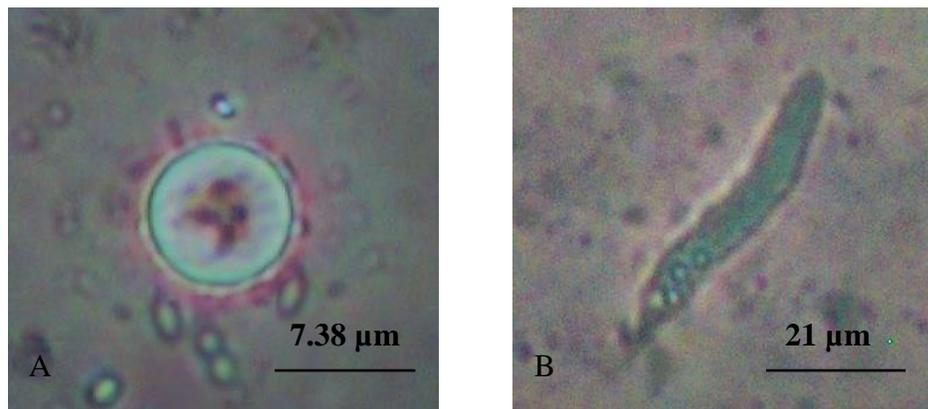


Figura 31. Quiste (A) y trofozoíto (B) de *Vermamoeba vermiformis* en microscopio invertido por contraste de fases, a 400X



***Korotnevella bulla* (Shaeffer, 1926)**

La forma locomotora es altamente variable, en ocasiones puede tomar la apariencia de un triángulo irregular, la amiba forma varios dactilopodios, no se diferencia uroide, su longitud puede variar entre las 51 y 174  $\mu\text{m}$  (Fig. 32).

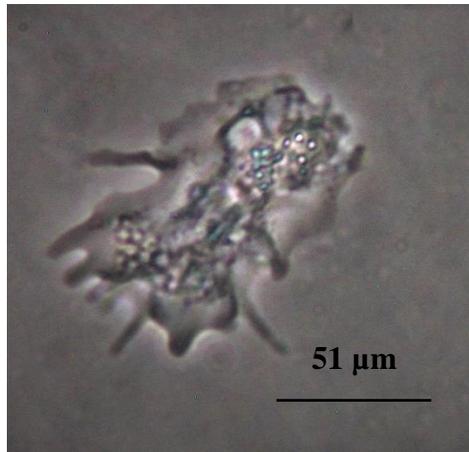


Figura 32. Trofozoíto de *Korotnevella bulla* en microscopio invertido por contraste de fases, a 400X



***Korotnevella stella* (Shaeffer, 1926)**

La forma locomotora es altamente variable, en ocasiones puede tomar la apariencia de un triángulo irregular, la amiba forma varios dactilopodios, no se diferencia uroide, su longitud puede variar entre 31 y 60  $\mu\text{m}$  (Fig. 33).

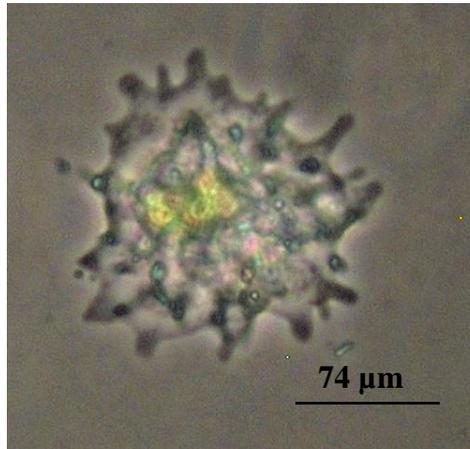


Figura 33. Trofozoíto de *Korotnevella stella* en microscopio invertido por contraste de fases, 400X



***Paratetramitus jugosus* (Page, 1967)**

El trofozoíto mide entre 13 y 18  $\mu\text{m}$  de longitud. El quiste tiene una pared conformada por dos capas una ligeramente separada de la otra, la exterior generalmente se pliega de manera ondular. El diámetro del quiste va de 7.5 a 11.8  $\mu\text{m}$ , posee una pared externa ligeramente separada de la interna, dicha pared es ondulada, no tiene ostiolo ni opérculo. El diámetro del quiste puede variar entre 5-16  $\mu\text{m}$  (Fig. 34).



Figura 34. Trofozoíto de *Paratetramitus jugosus* en microscopio invertido por contraste de fases, a 400X



*Thecamoeba striata* (Carter, 1856)

Generalmente aplanada, oblonga, elíptica u ovoide, usualmente la superficie posee pliegues que se prolongan anterior y longitudinalmente. Posee una vacuola contráctil evidente y altamente deformable. No se conocen quistes. Posee un núcleo con un nucléolo central, tiene una longitud que puede ir desde 35 a 78  $\mu\text{m}$  (Fig. 35).

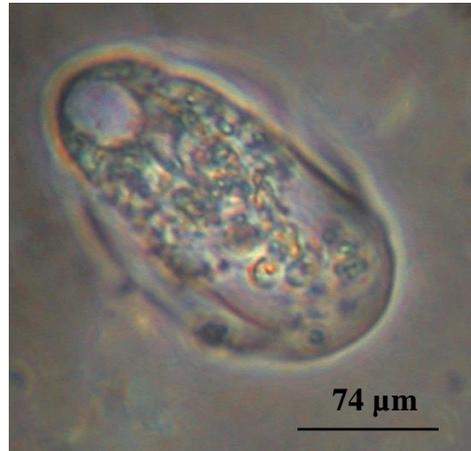


Figura 35. Trofozoíto de *Thecamoeba striata* en microscopio invertido por contraste de fases, a 400X



*Vannella platypodia* (Glaeser, 1912) Page, 1976

Posee una forma de abanico o semicircular a menudo con un uroide prolongado. El hialoplasma frontal abarca más de la mitad del cuerpo. Mide de 10 a 30  $\mu\text{m}$  de radio. Forma flotante radial con 2 a 8 pseudópodos radiales, los cuales pueden ser curvos cuando la forma flotante aún no está totalmente formada. Posee un solo núcleo vesicular con un nucléolo central homogéneo (Fig. 36 A-B).

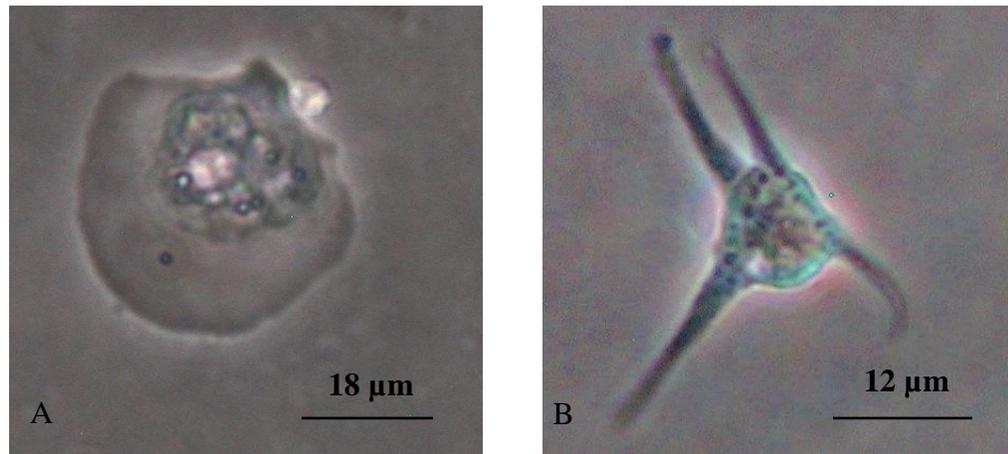


Figura 36. Trofozoíto (A) y forma flotante (B) de *Vannella platypodia* en microscopio invertido por contraste de fases, a 400X



***Vannella simplex*** (Wohlfarth-Bottermann, 1960)

Forma locomotora altamente variable. Casi siempre adopta una forma parecida a la de un abanico. Posee un uroide largo que hace característica a la especie. La forma locomotora puede alcanzar una dimensión máxima de 60  $\mu\text{m}$ . Usualmente las medidas son de 42 a 50  $\mu\text{m}$ . Forma flotante tiene forma radial con uno a nueve pseudópodos hialinos. Tanto la forma flotante como locomotora poseen un núcleo vesicular de 6 a 11  $\mu\text{m}$  de radio con un nucléolo central o excéntrico (Fig. 37).

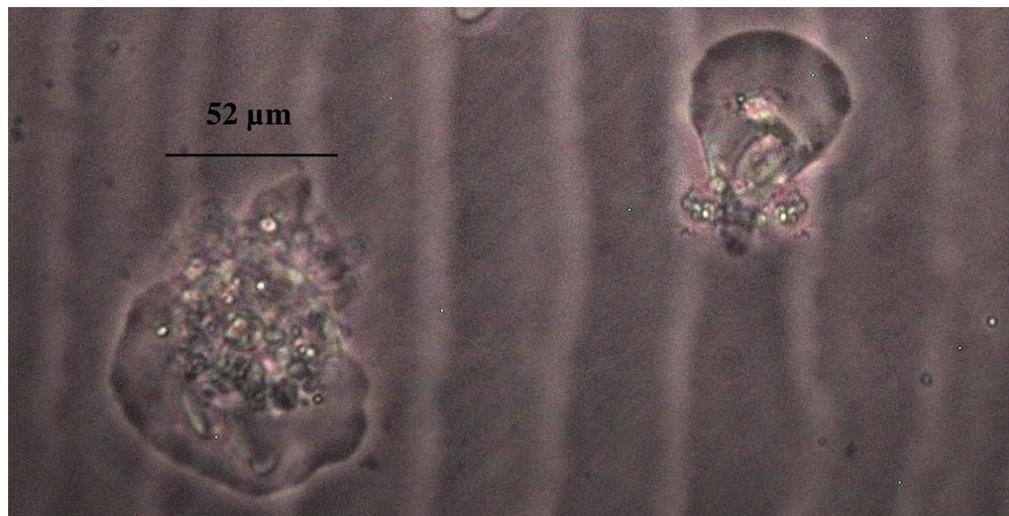


Figura 37. Trofozoíto de *Vannella simplex* en microscopio invertido por contraste de fases, a 400X



*Vannella lata* (Page, 1988)

El ancho es mayor a la longitud. Mide entre 24 y 46  $\mu\text{m}$ ., el hialoplasma generalmente se extiende hacia los extremos. Forma flotante entre 3 y 14 pseudópodos distribuidos más o menos de manera regular, cuya longitud puede exceder hasta tres veces la masa central de la amiba, posee un núcleo que mide entre 3.7 y 6.5  $\mu\text{m}$  (Fig. 38).

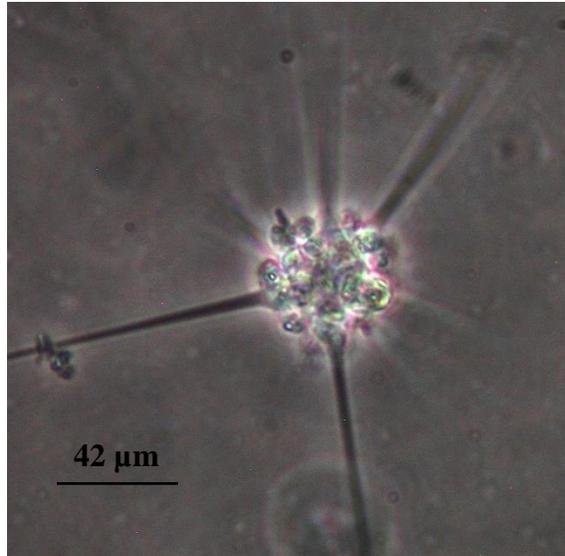


Figura 38. Trofozoíto de *Vannella lata* en microscopio invertido por contraste de fases, a 400X



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

No se describe fase de flagelado en su ciclo de vida. Los quistes pueden o no tener una cubierta gelatinosa. Solo se han reportado poros de exquistamiento en una especie (Fig. 39)

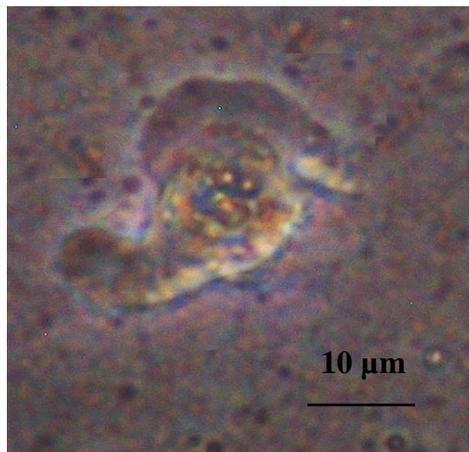


Figura 39. Trofozoíto de *Vannella lata* en microscopio invertido por contraste de fases, a 400X



### Anexo 3. Parámetros fisicoquímicos del balneario Laguna Larga

Cuadro 10. Temperatura del agua (°C) registrada en el balneario Laguna Larga durante la temporada de lluvia

	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre
Nacimiento de agua termal	40.15	38.687	36.376	35.4	35.22
Alberca 1	38.674	36.524	35.363	35	31.37
Alberca 2	37.826	35.489	33.799	32.12	31.96
Alberca 3	36.291	33.249	32.513	30.52	29.34
Alberca 4	34.724	32.439	31.016	29.7	29.18
Alberca 5	33.258	31.693	29.283	29.7	29.54
Alberca 6	32.654	30.285	28.327	28.86	28.63
Alberca 7	31.25	29.276	27.564	28.579	28.534
Laguna Larga	26.246	26.74	27.152	27.576	27.85

Cuadro 11. Temperatura del agua (°C) registrada en el balneario Laguna Larga durante la temporada de sequía

	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Nacimiento de agua termal	36.126	35.58	32.24	34.65	34.43	33.578	36.562
Alberca 1	35.912	34.09	31.67	33.89	32.89	32.659	35.264
Alberca 2	35.328	33.13	30.42	32.96	32.56	31.372	31.458
Alberca 3	35.07	31.64	28.53	31.745	32.47	30.934	30.128
Alberca 4	34.876	31.25	27.78	31.302	31.654	29.987	28.458
Alberca 5	33.394	30.87	26.45	30.238	30.743	29.765	28.295
Alberca 6	30.776	29.42	25.54	28.579	29.276	28.534	27.548
Alberca 7	29.2831	28.327	24.89	27.78	28.86	28.579	26.365
Laguna Larga	26.246	27.152	26.74	25.48	26.89	26.23	28.534



Cuadro 12. Conductividad del agua ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) registrada en el balneario Laguna Larga durante la temporada de lluvia

	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre
Nacimiento de agua termal	3.58	3.42	3.56	3.4	3.42
Alberca 1	3.48	3.4	3.54	3.6	3.4
Alberca 2	3.53	3.52	3.52	3.64	3.4
Alberca 3	3.58	3.52	3.48	3.65	3.5
Alberca 4	3.56	3.46	3.56	3.56	3.46
Alberca 5	3.46	3.4	3.54	3.56	3.6
Alberca 6	3.6	3.5	3.4	3.6	3.46
Alberca 7	3.56	3.5	3.6	3.54	3.6
Laguna Larga	4.39	4.18	4.18	4.53	4.32

Cuadro 13. Conductividad del agua ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) registrada en el balneario Laguna Larga durante la temporada de sequía

	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Nacimiento de agua termal	3.56	3.46	3.54	3.52	3.65	3.56	3.4
Alberca 1	3.54	3.51	3.4	3.48	3.56	3.54	3.5
Alberca 2	3.4	3.48	3.56	3.48	3.56	3.4	3.46
Alberca 3	3.58	3.58	3.52	3.53	3.42	3.58	3.58
Alberca 4	3.56	3.58	3.52	3.55	3.4	3.56	3.58
Alberca 5	3.52	3.56	3.46	3.51	3.4	3.46	3.4
Alberca 6	3.52	3.53	3.56	3.54	3.5	3.6	3.4
Alberca 7	3.54	3.4	3.56	3.53	3.54	3.4	3.46
Laguna Larga	4.39	4.18	4.18	4.58	4.63	4.85	3.6



Cuadro 14. pH registrado en el balneario Laguna Larga durante la temporada de lluvia

	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre
Nacimiento de agua termal	4.723	3.42	3.56	4.698	4.594
Alberca 1	4.638	3.4	3.54	4.67	4.622
Alberca 2	4.575	3.52	3.52	4.61	4.384
Alberca 3	4.489	3.52	3.48	4.584	4.324
Alberca 4	4.389	3.46	3.56	3.58	4.242
Alberca 5	4.356	3.4	3.54	3.488	3.656
Alberca 6	4.254	3.5	3.4	3.404	3.504
Alberca 7	4.38	3.5	3.6	3.343	3.423
Laguna Larga	4.379	4.18	4.18	4.753	4.63

Cuadro 15. pH registrado en el balneario Laguna Larga durante la temporada de sequía

	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril
Nacimiento de agua termal	4.536	4.609	4.458	4.534	4.421	4.26	4.579
Alberca 1	4.476	4.589	4.115	4.393	4.424	4.258	4.594
Alberca 2	4.32	4.438	3.941	4.233	4.384	4.217	4.015
Alberca 3	4.232	4.38	3.442	4.018	4.134	3.771	3.877
Alberca 4	3.89	3.904	3.375	3.723	3.947	3.638	3.636
Alberca 5	3.402	3.515	3.287	3.401	3.846	3.574	3.429
Alberca 6	3.342	3.417	3.241	3.343	3.452	3.423	3.248
Alberca 7	3.6309	3.399	3.237	3.375	3.343	3.343	3.237
Laguna Larga	4.379	4.563	4.56	4.28	4.25	4.6	4.753



**Anexo 4. Riqueza específica de amibas de vida libre del balneario Laguna Larga, Los Azufres**

Cuadro 16. Riqueza específica de AVL durante la temporada de lluvias en el balneario “Laguna Larga”

Especie	Nacimiento de agua termal	Alberca 1	Alberca 2	Alberca 3	Alberca 4	Alberca 5	Alberca 6	Alberca 7	Laguna Larga
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Acanthamoeba triangularis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Arcella</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>Arcella vulgaris</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	1
<i>Hartmannella vermiformis</i>	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Korotnevela stella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Korotnevela bulla</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Mayorella sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Naegleria fowleri</i>	1	0	0	1	0	1	1	1	1
<i>Naegleria gruberi</i>	1	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>Naegleria jadini</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Paratetramitus jugosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Saccamoeba sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Sappinia pedata</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>Thecamoeba quadrilineata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Trinema sp</i>	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>Vannella mira</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Vannella lata</i>	1	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Vannella platypodia</i>	1	1	0	0	1	0	1	0	0
<i>Vannella simplex</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Vannella sp</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Vhalkampfia</i>	0	1	0	1	0	0	0	0	0



Cuadro 17. Riqueza específica de AVL durante la temporada de sequía en el balneario “Laguna Larga”

Géneros y especies	Nacimiento de agua termal	Alberca 1	Alberca 2	Alberca 3	Alberca 4	Alberca 5	Alberca 6	Alberca 7	Laguna Larga
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acanthamoeba triangularis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Arcella</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Arcella vulgaris</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Hartmannella vermiformis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Korotnevela stella</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0
<i>Korotnevela bulla</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Mayorella sp</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Naegleria fowleri</i>	1	1	0	1	0	1	0	1	1
<i>Naegleria gruberi</i>	0	0	0	1	0	0	1	0	1
<i>Naegleria jadini</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Paratetramitus jugosus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saccamoeba sp</i>	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Sappinia pedata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thecamoeba quadrilineata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Trinema sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>Vannella mira</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vannella lata</i>	1	1	0	1	0	0	0	0	0
<i>Vannella platypodia</i>	1	0	1	0	1	0	1	0	0
<i>Vannella simplex</i>	1	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>Vannella sp</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vhalkampfia</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0



## Anexo 5. Soluciones e infusiones para medios de cultivo semisólido y líquido

### Medio NNE (agar no Nutritivo)

#### Reactivos

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

#### Procedimiento

- Mezclar en seco todos los componentes, ar primero 500 mL y agitar hasta homogeneizar la solución, posteriormente aforar a 1 L.
- Calentar hasta ebullición hasta disolver el agar.
- Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos.
- Verter en caja Petri (15 mL aproximadamente).
- Al solidificar el agar, se colocan cuatro gotas de un cultivo de *Enterobacter aerogenes* inactivado por calor, se distribuye homogéneamente con un asa de vidrio estéril.
- Dejar reposar 1 hora aproximadamente.
- Guardar en el refrigerador de manera invertida.

### Solución Prescott-James para (*Amoeba proteus*)

Realiza tres soluciones stock, cada una con 100 mL de agua destilada

**Solución stock A** CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 0.433 g.

KCl 0.162 g

**Solución stock B** K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.512 g.

**Solución stock C** MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.280 g.



### Procedimiento

1. Combinar 1 mL de cada solución stock y aforar a 1 litro con agua destilada para obtener la solución final.
2. Esterilizar en autoclave a 15 psi, 121 °C durante 15 minutos.

### Medio líquido con solución Prescott-James

#### Reactivos

- Solución Prescott-James (estéril).
- Extracto de suelo con sales (estéril).
- Infusión de granos (trigo, maíz, arroz)
- Infusión de planta (Cerophyl 0.15%) (estéril)
- Tubo de concentrado de *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor.
- Concentrado de muestra centrifugada.
- Arena de mar (estéril) (usar para cultivo de amibas tecadas).

#### Material

- Placa de seis pozos para cultivo celular.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Mecheros.
- Pipeta de 1 ml estéril
- Pinzas.

### Procedimiento

1. Agregar 1 mL de solución Prescott-James en cada pozo de la placa de cultivo celular a utilizar.
2. Posteriormente agregar la cantidad de las soluciones en la siguiente proporción:
  - Extracto de suelo con sales (cuatro gotas)
  - Infusión de granos (tres gotas por cada infusión de trigo, maíz y arroz)
  - Infusión de planta (tres gotas)



- Tubo de concentrado de *Enterobacter aerogenes* (una gota)
  - Concentrado de la muestra centrifugada (seis gotas)
  - Arena de mar estéril: Agregar una placa de granos de arena
3. Dejar a temperatura ambiente o colocar en incubadora según sea el objetivo de estudio

### **Medio semisólido con medio NNE y solución Prescott-James**

#### **Reactivos**

- Cajas Petri.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Mecheros.
- Pinzas

#### **Procedimiento**

1. Vaciar medio NNE en cajas Petri aproximadamente con 5 mm de grosor.
2. Posteriormente agregar la cantidad de las soluciones en la siguiente proporción:
  - Solución Prescott-James (seis gotas).
  - Extracto de suelo con sales (cuatro gotas).
  - Infusión de granos (tres gotas por cada infusión de trigo, maíz y arroz).
  - Infusión de planta (tres gotas).
  - Tubo de concentrado de *Enterobacter aerogenes* (una gota).
  - Concentrado de la muestra centrifugada (seis gotas).
  - Arena de mar estéril: Agregar una pizca de granos de arena
3. Dejar reposar a temperatura ambiente o colocar en incubadora según sea el objetivo de estudio.



### Extracto líquido de suelo

Puntos que considerar antes de preparar el extracto de suelo:

1. Suelo de jardín, evite usar suelo de bosque o un tipo de suelo que tenga exceso de materia orgánica, arena o arcilla.
2. Deje secar el suelo al sol aproximadamente tres días antes de usarlo, el tiempo dependerá de la cantidad de humedad que contenga el mismo.
3. Cuando el suelo esté completamente seco, se pasará a través de diferentes tamices, esto con la intención de dejar el suelo lo más fino posible.

### Procedimiento

1. Mezclar el suelo con el agua siguiendo estas proporciones:

	Botella (500 mL)	Botella (250 mL)	Tubo
Suelo de jardín	52 g	35 g	2 g
Agua destilada	330 mL	220 mL	15 mL

2. Mezclar la cantidad de suelo con el volumen de agua destilada de acuerdo con las proporciones señaladas.
3. Filtrar la mezcla con un filtro para café.
4. Esterilizar en autoclave a 15 psi, 121 °C durante 15 minutos.

### Extracto de suelos con sales.

#### Materiales

- Extracto líquido de suelo.....10 mL
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% p/v.....2 mL
- MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O, 0.1% p/v.....2 mL
- KNO<sub>3</sub> 1% p/v.....2 mL
- Agua destilada.....84 mL



### **Procedimiento**

1. Mezclar los volúmenes de cada solución y esterilizar en autoclave a 15 psi, 121 °C durante 15 minutos.

### **Infusión de granos**

Use granos de los cuales no hayan sido tratados con fungicidas o insecticidas.

1. Pasar ligeramente los granos por la flama del mechero.
2. Colocar el agua destilada en un vaso de precipitado o matraz.
3. Colocar los granos
4. Calentar hasta punto de ebullición y deje calentando hasta alcanzar el tiempo recomendado para cada grano.

### **Tiempo de cocción por cada grano:**

- Cebada, avena y arroz integral: dos o tres granos por cada 25 a 30 mL de agua. Hervir por 5 minutos.
- Alpeste: 10 a 12 granos por cada 25 a 30 mL de agua. Hervir por 5 minutos.
- Maíz: Use granos de maíz secos, uno por cada 25 a 30 mL de agua. Hierva por 10 minutos, luego haga un hoyo a lado de cada grano de maíz.
- Mijo: alrededor de 5 granos por cada 25 a 30 mL de agua. Hierva por un minuto.
- Arroz integral: 2 a 3 granos por cada 25 a 30 mL de agua. Hervir solamente el agua por cinco minutos, dejar enfriar y agregar los granos de arroz.

### **Infusión de planta (Cerophyl 0.15%)**

#### **Material**

- Cerophyl.....0.15 g
- Agua destilada.....100 mL
- Filtro de café
- Parrilla eléctrica
- Potenciómetro



### **Procedimiento**

1. Disolver 0.15 g de cerophyl en 100 L de agua destilada, llevar a ebullición y después hervir a fuego lento por 10 minutos.
2. Clarificar la infusión pasándola a través de un filtro para café, posteriormente el pH del filtrado será ajustado a 7 usando 0.1 M de NaOH.
3. Esterilizar en la autoclave a 15 psi, 121°C durante 15 minutos.

