



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA

**“Detección de amibas de vida libre  
en aguas de piscina”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGA**

PRESENTA:

**PAULINA YARET HERNÁNDEZ GÓMEZ**

DIRECTORA DE TESIS

**M. en C. Ramírez Flores Elizabeth**

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2019





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



"Nothing shocks me. I'm a scientist"

## DEDICATORIA

*A Dios por darme la vida, por siempre estar conmigo a cada paso que doy, cuidándome y dándome fortaleza para continuar con uno más de mis logros, que no solo son míos, también son de mis padres.*

*A mis amados padres Elisa y Honorio, por siempre estar conmigo y brindarme todo lo que estuvo dentro de sus posibilidades, que, aunque ustedes digan que fue poco para mí lo fue “todo”.*

*A mi mamá por estar dispuesta a acompañarme cada larga y agotadora noche a lo largo de mi carrera, poniéndome atención cuando le contaba lo que me pasaba con mis compañeros y en mis prácticas de campo, a mis términos científicos que, aunque no entendías la mayoría de las cosas que yo te platicaba nunca mostraste indiferencia. Gracias por tus regaños y consejos que me diste y seguirás dando, todos y cada uno de ellos han valido la pena escucharlos.*

*A mi papá por brindarme el apoyo cuando fracasé y me dejaste intentarlo de nuevo, en ese momento, aunque no lo dijeras sabías que iba a lograrlo. Créeme que, aunque no lo diga seguido eres mi ejemplo a seguir porque para mí eres mi Kakaroto.*

*A mi hermanita “Yojan”, por estar siempre conmigo y escuchar cada uno de mis problemas, locuras y aventuras. Por alentarme a hacer las cosas que me gustan y nunca dejar de creer en mí, espero poder ser un ejemplo para ti y el día de mañana llegues a ser mucho mejor que yo.*

*A mi Huguíto por el gran apoyo que me brindaste dentro y fuera de mi educación universitaria, te estaré eternamente agradecida “cosa”. Tus valiosos consejos siempre fueron de mucha ayuda y motivación para mí, eres uno de los principales pilares en mi vida y así como yo sé que siempre estarás para mí, yo lo estaré para ti.*

*A mi abuelito que siempre estuvo al pendiente de mí desde pequeña, enseñándome y ayudándome en mis estudios, aunque ya no está conmigo él siempre estuvo orgulloso y creyó en mí hasta su último aliento.*



ENDURE AND SURVIVE

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer principalmente a la Maestra Elizabeth que fue la única persona que sin titubear aceptó que yo trabajara con ella en mi proyecto de LICyT. Infinitas gracias por el apoyo que me brindó cuando comencé mis últimos semestres de la carrera, cuando abandoné por un largo tiempo mi tesis y en la culminación de esta.*

*A LA Mtra. Esperanza Robles Valderrama, Dr. Víctor Rivera Aguilar, Mtra. María Dolores Hernández Martínez y Lic. María de Guadalupe Sáinz Morales por sus comentarios y observaciones a este trabajo de tesis.*

*A todas aquellas personas que de forma directa o indirectamente hicieron posible la realización y culminación de esta tesis, ¡muchas gracias!, sin su apoyo, observaciones, consejos y su sabiduría este trabajo no hubiera sido realizado.*

*Gracias a la máxima casa de estudios, la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme abierto las puertas desde que fui aceptada en el CCH Naucalpan y poco tiempo después en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Sin duda ha sido de las mejores etapas de mi vida y con muchísimo gusto sin pensarlo dos veces las volvería a vivir.*

**¡MÉXICO, PUMAS, UNIVERSIDAD!**

**¡GOYA! ¡GOYA!**

**¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!**

**¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!**

**¡GOYA!**

**¡¡UNIVERSIDAD!!**

# CONTENIDO

<b>I. RESUMEN</b> .....	5
<b>II. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
1.- Amibas de Vida Libre.....	6
2.- Morfología de las amibas de vida libre.....	7
3.- <i>Naegleria fowleri</i> .....	7
4.- <i>Acanthamoeba</i> spp.....	9
5.- <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	11
6.- <i>Sappinia pedata</i> .....	13
7.- Enfermedades.....	15
7.1.- Meningoencefalitis Amibiana Primaria.....	15
7.2.- Encefalitis Ambiana Granulomatosa.....	16
7.3.- Queratitis Amibiana.....	16
8.- Epidemiología de las amibas de vida libre a nivel mundial.....	17
9.- Epidemiología de las amibas de vida libre en México.....	18
<b>III. MARCO DE REFERENCIA</b> .....	21
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>V. OBJETIVOS</b> .....	26
1.- General.....	26
2.- Particulares.....	26
<b>VI. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
1.- Áreas de estudio.....	27
2.- Muestreo.....	28
3.- Laboratorio.....	28
3.1.- Aislamiento de las amibas.....	28



3.2.- Identificación de las amibas.....	29
3.3.- Cultivos Axénicos.....	29
3.4.- Prueba de patogenicidad.....	30
<b>VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
1.- Presencia y ausencia de amibas de vida libre.....	33
2.- Riqueza específica.....	33
3.- Prueba de patogenicidad.....	35
4.- Análisis fisicoquímicos.....	36
<b>VIII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>IX. LITERATURA CITADA.....</b>	<b>40</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>45</b>

## CONTENIDO DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i> .....	8
Figura 2. Etapas del ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i> .....	9
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	10
Figura 4. Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	11
Figura 5. Quiste de <i>Acanthamoeba</i> spp.....	11
Figura 6. Etapas del Ciclo de vida de <i>Balamuthia</i> <i>Mandrillaris</i> .....	12
Figura 7. Ciclo de <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	13
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Sappinia pedata</i> .....	14
Figura 9. Forma del quiste y trofozoíto de <i>Sappinia pedata</i> .....	15
Cuadro 1. Casos humanos de Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP) en los Estados Unidos Mexicanos (1978-2008).....	18
Cuadro 2. Casos de humanos de Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP) en los Estados Unidos Mexicanos (2009-2014).....	20
Cuadro 3. Localización de las piscinas muestreadas.....	27
Figura 10. Filtración de las muestras de agua de piscina por la técnica de Filtro de Membrana.....	28
Figura 11. Placas del medio NNE con la membrana.....	29
Figura 12. Prueba de patogenicidad en ratones.....	30
Figura 13. Inoculación de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> en los ratones por vía intranasal.....	31

Figura 14. Placas de agar con los órganos de los ratones sacrificados.....	32
Cuadro 4. Presencia de las amibas de vida libre en las piscinas.....	33
Cuadro 5. Riqueza específica de las AVL aisladas de las piscinas.....	34
Cuadro 6. Patogenicidad de las cepas de <i>Acanthamoeba polyphaga</i> .....	35
Cuadro 7. Parámetros fisicoquímicos de las piscinas del Área Metropolitana.....	36

## I. RESUMEN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos eucariontes que presentan al menos dos estadios de desarrollo: el trofozoíto, una forma vegetativa de alimentación y el quiste, una forma inactiva e resistencia; algunos géneros tienen un estado adicional como flagelado. Algunas especies de amibas viven como organismos de vida libre en el ambiente, pero ocasionalmente pueden llegar a los animales o al hombre, en los cuales actúan como parásitos oportunistas, por lo que son llamadas anfizóicas. Existen cuatro géneros de AVL asociados a enfermedades en humanos que afectan el sistema nervioso central, *Naegleria* causando Meningoencefalitis Amibiana Primaria, *Balamuthia* y *Sappinia*, causan Encefalitis Amibiana Granulomatosa y *Acanthamoeba* ocasiona Queratitis Amibiana. La mayoría de los casos reportados por AVL han tenido en común haber nadado en pozas, reservorio de agua templada y piscinas. En México son pocos los estudios realizados sobre AVL en agua de piscina por lo que este trabajo tuvo como objetivo detectar la presencia de amibas de vida libre patógenas en agua de piscinas. Se muestrearon cinco piscinas en dos etapas diferentes. Se aislaron cinco especies amibianas pertenecientes a los géneros: *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vanella* y *Vexillifera*. La piscina SM fue en donde se aislaron tres especies y en la piscina VD se aisló solamente una especie. La especie *Acanthamoeba polyphaga* se aisló en ambas piscinas, pero solamente la cepa aislada de VD fue invasiva. En cuanto a los parámetros fisicoquímicos se encontró que a pH bajos y concentraciones de cloro libre residual altas, no se encontraron amibas. En algunas piscinas los valores de estos parámetros variaron drásticamente de una etapa a otra, lo que señala irregularidades en el mantenimiento de las piscinas, incumpliendo los requisitos sanitarios y de calidad de agua señalados en la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010.

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos eucariontes, unicelulares generalmente incoloros. Estos organismos presentan diferentes formas: alargadas, reniformes, periformes, estrelladas entre otras más (Sigala, 2008), son organismos cosmopolitas, ya que se encuentran en ambientes húmedos como el suelo y el agua; también se pueden encontrar en el aire, vehículo que emplean como medio de dispersión (Peralta, 2009).

El tamaño de las amibas varía en gran medida, pero su naturaleza unicelular limita la talla que llegan a alcanzar. La mayoría de las especies en su fase trófica tiene tamaños en el intervalo de 6 a 30  $\mu\text{m}$  y en su fase quística de 6 a 20  $\mu\text{m}$ , aproximadamente. Sin embargo, existen excepciones que pueden llegar a medir hasta cerca de 1 mm de longitud e incluso ser visibles a simple vista. Se ha observado algunas variaciones en la talla de una misma especie entre aquellas amibas que se encuentran en un cultivo por algún tiempo con respecto a las que se encuentran en el hábitat natural, lo que se atribuye a que la presencia de alimento y ciertas condiciones ambientales, favorecen un aumento en la talla (Page, 1988)

Son capaces de sobrevivir a temperaturas extremas desde - 4°C hasta más de 45°C (Ávila *et al.*, 2006). Sin embargo, las especies con potencial patógeno tienen cierta tendencia hacia cuerpos de agua con temperaturas elevadas (>35°C) ya que tienen la característica de ser organismos termotolerantes, por lo que se encuentran comúnmente en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales (Kyle, 1986).

Algunas especies de amibas viven como organismos de vida libre en el ambiente, pero ocasionalmente pueden llegar a los animales o al hombre, en los cuales actúan como parásitos oportunistas, por lo que son llamadas anfizóicas (gr. *amphi*, que significa de ambos lados). (Gallegos-Neyra, 1997). Estas amibas tienen varias características en común: no están bien adaptadas al parasitismo, pues terminan con la vida del hospedero que invaden, son organismos oportunistas capaces de producir infecciones en el sistema nervioso central y órganos como pulmón, piel, ojos y oídos. A pesar de la característica de ubicuos no se conoce un hospedero ó vector para su transmisión y dispersión y no se transmiten de humano a humano (Seas y Bravo, 2006).

Se les considera uno de los principales grupos de depredadores microbianos, debido a que presentan una fuerte selectividad de presas, siendo depredadores de bacterias, hongos, algas y otros protozoarios. De ahí su importancia en los ecosistemas acuáticos ya que desempeñan un papel muy importante en el mantenimiento en el flujo de energía y reciclado de los nutrientes del suelo (Rodríguez *et al.*, 2004; Rodríguez *et al.*, 2005).

A mediados del siglo XX se descubrió que podían invadir a seres humanos y a ciertos animales, causándoles la muerte o daño cerebral irreversible (Peralta, 2009). Existen cuatro géneros de amibas de vida libre asociadas a enfermedades en humanos que afectan el sistema nervioso central (SNC): *Balamuthia*, *Sappinia*, *Acanthamoeba* y *Naegleria*: *Naegleria* causando Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MEAP), los otros géneros causan Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) y *Acanthamoeba* que puede ocasionar Queratitis Amibiana (QA) (Bonilla y Ramírez, 2014; Visvesvara, 2014).

## **2. Morfología de amibas de vida libre**

Las amibas de vida libre tienen al menos dos estadios de desarrollo: el trofozoíto, una forma vegetativa de alimentación y el quiste, una forma inactiva. Las amibas de *Naegleria* tienen un estado adicional como flagelado. (Aqeel *et al.*, 2014).

El trofozoíto, se alimenta de bacterias mediante fagocitosis y se multiplica por fisión binaria. Los quistes generalmente cuentan con dos capas. El ectoquiste y el endoquiste: una tercera capa, el mesoquiste, (está presente en algunas especies como *Balamuthia mandrillaris*) (Aqeel *et al.*, 2014).

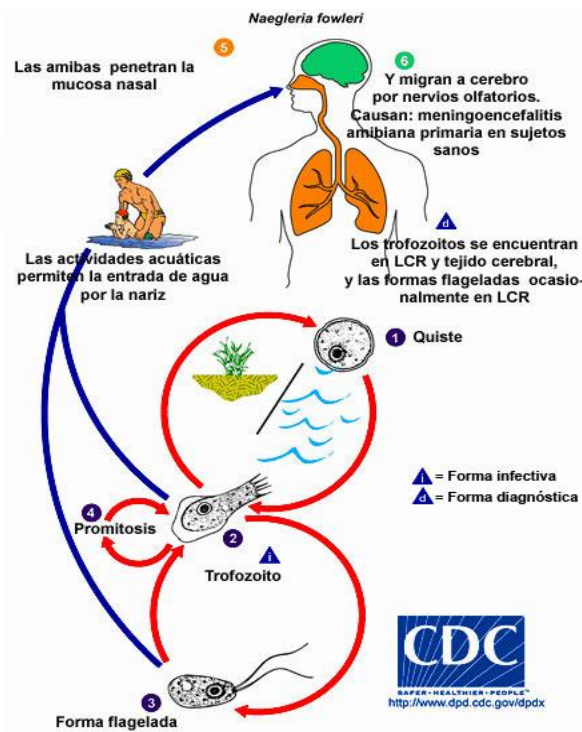
Los niveles de pH adverso, la presión osmótica y las condiciones de temperatura causan el enquistamiento en las amibas, y este proceso también ocurre cuando los requerimientos alimentarios no son los adecuados. El estado de quiste es reversible cuando las condiciones ambientales se vuelven favorables (Greub y Raoult, 2004)

## **3. *Naegleria fowleri***

*Naegleria fowleri* pertenece a la familia Vahlkampfiidae, en la clase Heterolobosea. Actualmente se reconocen 8 tipos de *N. fowleri*, que se distinguen mediante pruebas de secuenciación de ADN (De Jonckheere, 2011).

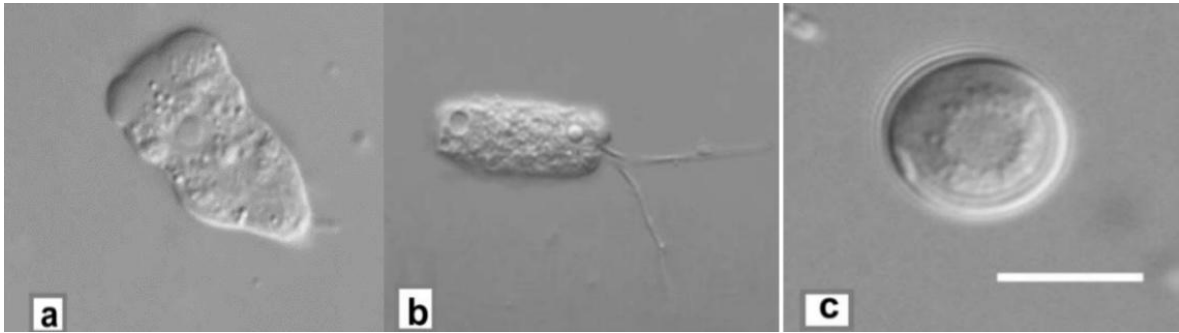
Es la amiba que posee la mayor virulencia y letalidad a corto plazo de todas las AVL que infectan al hombre, causando Meningoencefalitis Amibiana Primaria (Tapia, 2012).

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



**Figura 1. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri***

Los trofozoítos son alargados, con un uroide (Figura 2a) en un extremo, ectoplasma claro y endoplasma en el que se aprecian vacuolas digestivas, contráctil, mitocondrias pleomórficas, gránulos, un núcleo con halo claro y un nucléolo grande y central. Miden 15 - 25  $\mu\text{m}$  y emiten pseudópodos anteriores de movimiento rápido de extremo romo (lobópodos). Su reproducción es por promitosis (membrana celular intacta). Los trofozoítos flagelados (Figura 2b) son una forma transicional, ante cambios ambientales, el quiste (Figura 2c), forma que adopta *Naegleria* para sobrevivir en condiciones adversas, tiene pared lisa, operculada (poros con tapones mucosos), es esférico, con granulaciones escasas, núcleo y mide 8 - 12  $\mu\text{m}$  (Uribarren, 2014).



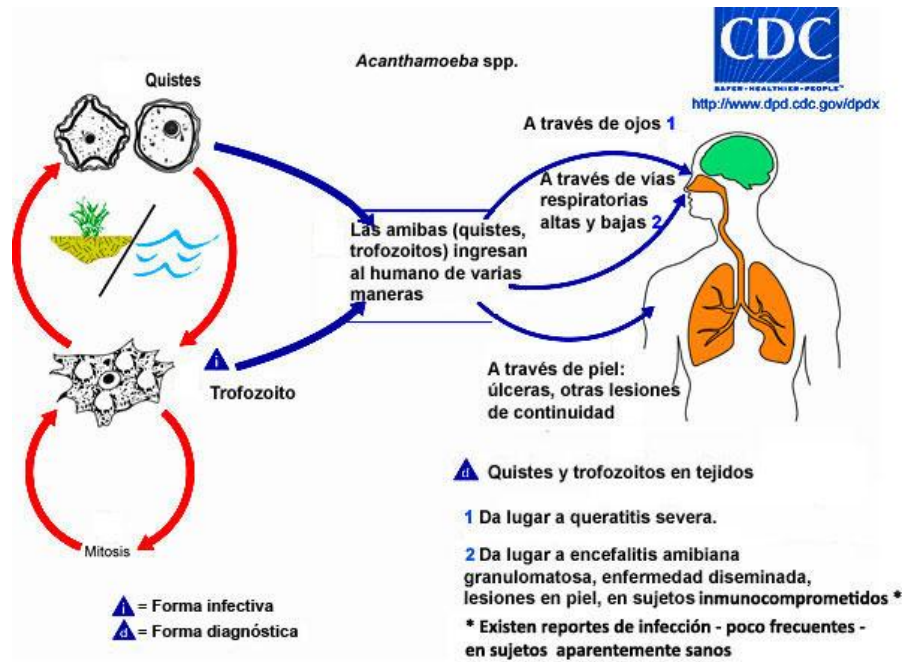
**Figura 2. Etapas del ciclo de vida de *Naegleria fowleri*: a) trofozoíto, b) ameboflagelado y c) quiste.**

#### **4. *Acanthamoeba* spp**

*Acanthamoeba* spp. pueden ocasionar: Queratitis Amibiana una infección crónica de la córnea con compromiso serio de la visión, principalmente en usuarios de lentes de contacto; Encefalitis Amibiana Granulomatosa que afecta el sistema nervioso central y desencadena la muerte del paciente entre 7 y 120 días después del inicio de los síntomas; Acantamoebosis Cutánea (AC) caracterizada por lesiones ulcerosas supurativas en la piel y sinusitis. Las tres últimas patologías sólo se presentan en individuos inmunocomprometidos (Gertiser *et al.*, 2010).

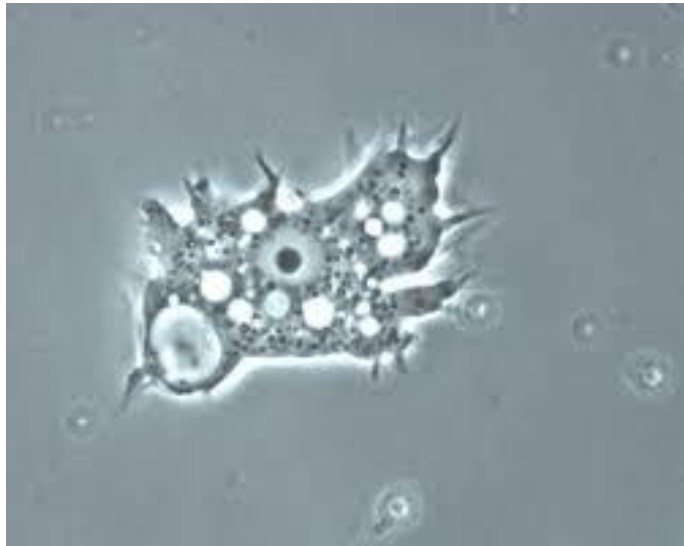
En su ciclo de vida (Figura 3) *Acanthamoeba* alterna entre los estadios de trofozoíto y quiste, dependiendo de las condiciones de crecimiento. Los trofozoítos son la forma infecciosa, con capacidad replicativa e invasiva. Los quistes representan el elemento de resistencia y diseminación, pudiendo permanecer viables por más de 20 años (Gertiser *et al.*, 2010).



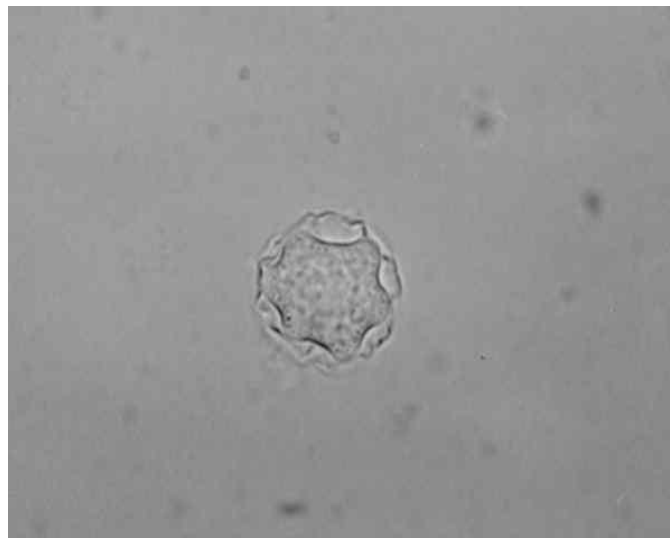


**Figura 3. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.**

*Acanthamoeba* posee características morfológicas propias. En los trofozoítos se destacan proyecciones citoplasmáticas espinosas sobre su superficie, denominadas acantópodos, que le dan nombre al género, núcleo único con nucléolo central esféricas y refringentes, y vacuolas de exclusión de agua. (Figura 4) Los quistes se caracterizan por presentar una doble pared, endo y exoquiste, rodeando a una estructura estrellada o poliédrica (Figura 5). (Gertiser *et al.*, 2010).



**Figura 4. Trofozoito de *Acanthamoeba* spp**



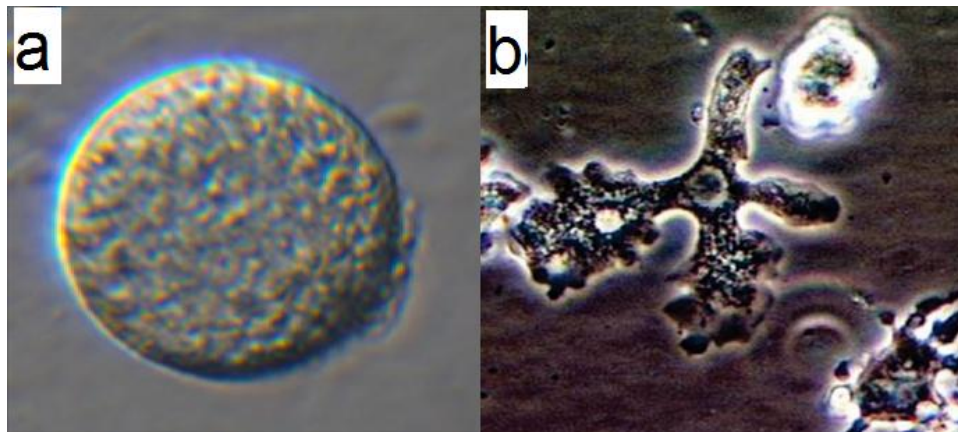
**Figura 5. Quiste de *Acanthamoeba* spp**

### **5. *Balamuthia* *madrillaris***

En el caso de *Balamuthia* al igual que *Acanthamoeba* spp. son organismos oportunistas capaces de producir Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG). Se presenta en individuos inmunosuprimidos o inmunodeficientes, como alcohólicos crónicos, VIH positivos, enfermos con SIDA, con lupus eritematoso sistemático o cáncer. La puerta de entrada al torrente sanguíneo puede ser a través de los pulmones, vía neuroepitelio olfativo y lesiones de la piel (Bonilla *et al.*, 2004).

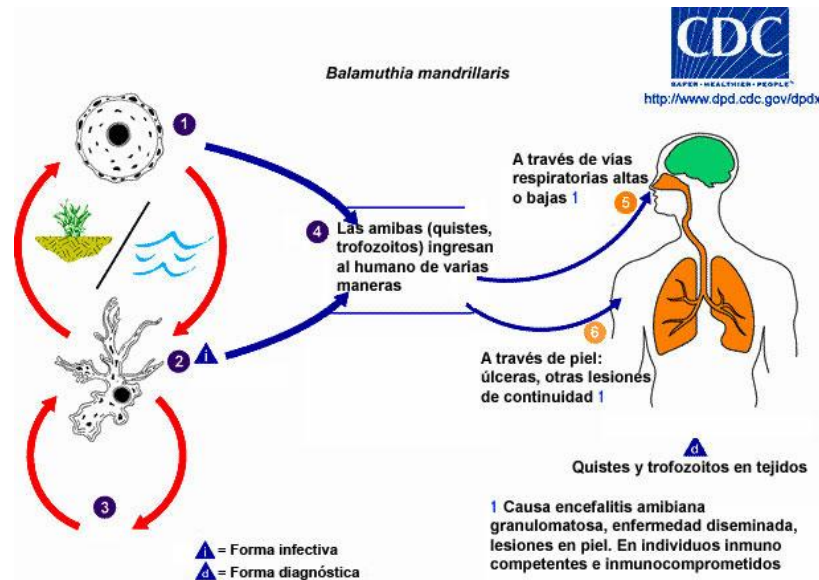
El ciclo de vida (Figura 7) comprende una fase de trofozoíto y una de quiste. El trofozoíto (Figura 6b) de *B. mandrillaris* mide entre 12 y 60  $\mu\text{m}$ , pero pueden alcanzar hasta 60 y 120  $\mu\text{m}$  de largo. Tiene forma irregular, algunas veces presenta la forma limax y en otras adopta un aspecto de araña con numerosos pseudópodos, sin ramificaciones. El microorganismo es uninucleado con un núcleo vesicular; a menudo puede tener más de un nucléolo. En cultivo celular también se han observado trofozoítos multinucleados. Otros organelos presentes son la mitocondria y el retículo endoplasmático, que contiene ribosomas. El trofozoíto se reproduce asexualmente por fisión binaria y la división del núcleo se realiza por mitosis (Bonilla y Ramírez, 2014).

El quiste (Figura 6a) mide entre 13 y 30  $\mu\text{m}$  y carece de poros; en el plano ultraestructural se reconoce una triple constitución, es decir, una fina capa externa irregular o ectoquiste, una capa interna densa y gruesa o endoquiste y una capa fibrilar amorfa media llamada mesoquiste. Durante la mitosis, el nucléolo y la membrana nuclear permanecen intactos al principio, pero desaparece a medida que la mitosis continúa (Bonilla y Ramírez, 2014).



**Figura 6.- Etapas del ciclo de vida de *B. mandrillaris* a) quiste b) trofozoíto.**

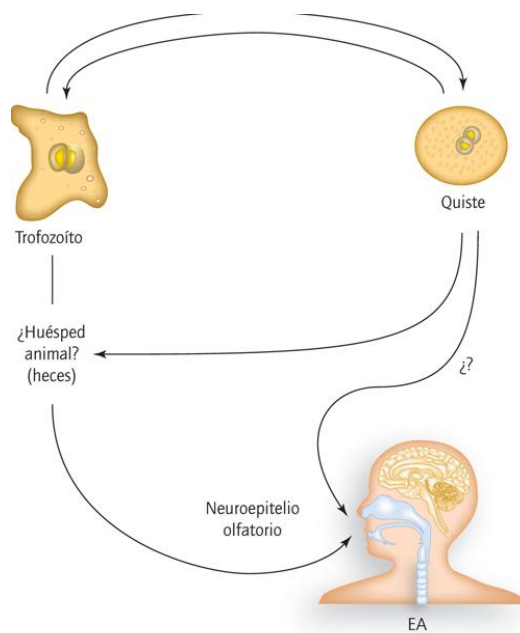
Se conoce muy poco acerca de la distribución de *B. mandrillaris* en la naturaleza; tal vez son menos abundantes en el ambiente que otras AVL, lo que dificulta su aislamiento, además de que son organismos de lento crecimiento y difícil cultivo, que requieren medios de cultivo muy complejos o cultivos de tejido. Hasta el momento existen sólo dos reportes de su aislamiento en el suelo (Bonilla y Ramírez, 2014).



**Figura 7-. Ciclo de vida de *Balamuthia mandrillaris*.**

## 6. *Sappinia pedata*

La amiba originalmente clasificada como *Sappinia diploidea*, en 2009 fue reclasificada como *Sappinia pedata*. En el único caso de infección cerebral por *S. pedata*, se observó que el manejo de ganado fue un factor importante en la transmisión de la amiba; por lo que el ciclo de vida del parásito tal vez implique un huésped animal intermediario, a diferencia de las otras amibas de vida libre patógenas que no dependen de un huésped para la transmisión y distribución de la enfermedad (Bonilla y Ramírez, 2014).



**Figura 8.- Ciclo de vida de *Sappinia pedata***

Su ciclo de vida (Figura 8) comprende dos estadios (Figura 9): el trofozoíto mide entre 40 y 60  $\mu\text{m}$ , sus seudópodos son indistintos y presenta una película que se ondula cuando la amiba se mueve. Una característica indistinta del microorganismo es la presencia de dos núcleos colocados muy juntos uno respecto del otro. En el citoplasma se observa una gran vacuola citoplasmática, mitocondrias con característicos patrones tubulares y una red parecida al aparato de Golgi. Los trofozoítos se dividen por fisión binaria y la división del núcleo se realiza por mitosis. Los quistes miden de 13 a 37  $\mu\text{m}$  y se observan dos núcleos; pueden sobrevivir a los jugos gástricos durante su paso por el estómago, así como las emulsificantes propiedades de la bilis del hígado; por la razón, su presencia en las heces no es indicativa de infección. Una vez en las heces que tiene abundancia de bacterias las amibas pueden exquisitar. Debido a su constante presencia en las heces se le ha caracterizado como coprozoica (Bonilla y Ramírez, 2014).



**Figura 9.- Izquierda: Forma de quiste de *Sappinia*. Derecha: Trofozoíto de *Sappinia***

En el caso de *S. pedata* se desconoce su distribución en el ambiente, se ha aislado de suelo contaminado con heces de bovino, de otros animales y de humanos, y corteza de árbol (Bonilla y Ramírez, 2014).

## **7. Enfermedades**

### **7.1 Meningoencefalítis Amibiana Primaria (MAP)**

La Meningoencefalitis Amibiana Primaria es producida por *N. fowleri* y corresponde a un cuadro agudo y fulminante que afecta a personas que tuvieron antecedentes de haber realizado actividades acuáticas de tres a siete días antes de presentarse el cuadro. Los protozoos penetran a través del neuroepitelio olfatorio originando una meningoencefalitis necrosante y purulenta con compromiso predominante de la base del cerebro, tronco cerebral y la base del cerebelo; en los cortes histológicos se encuentran solo trofozoítos, especialmente perivasculares; en el ser humano no se han observado quistes en los tejidos. La MAP ocurre principalmente en individuos sanos, el periodo de incubación dura de tres a siete días, aunque en algunos casos es mayor a dos semanas. Los síntomas comienzan abruptamente con fiebre leve y malestar general, algunas veces acompañados con rinitis y odigofania; estos progresan rápidamente, con acentuada cefalea y fiebre, seguida por vómito, rigidez de nuca y signos de irritación meníngea, algunos síntomas leves de compromiso respiratorio superior pueden estar presentes. Varias especies de *Naegleria* han sido aisladas de las vías nasales y del tracto respiratorio superior de los individuos sanos; algunos de estos aislados han sido identificados solamente como *Naegleria* sp ó *Naegleria gruberi* (Oddó, 2006).

## 7.2 Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG)

Varias especies del género *Acanthamoeba*, *B. mandrillaris* y *Sappinia*, causan el cuadro denominado encefalitis amibiana granulomatosa (EAG); ésta afecta, naturalmente, a pacientes debilitados, desnutridos, diversos tipos de inmunocomprometidos, incluidos pacientes con SIDA, y niños pequeños; aunque el antecedente de inmunocompromiso es relevante en las infecciones por *Acanthamoeba* sp, no así en los casos producidos por *B. mandrillaris*. La enfermedad corresponde a una encefalitis necrosante y hemorrágica aguda, subaguda ó crónica, multifocal con angeitis necrótica, algunas células macrófagicas y células gigantes multinucleadas, con presencia de trofozoitos y quistes parasitarios característicos. A pesar del nombre de encefalitis granulomatosa, el componente granulomatoso suele ser irrelevante o estar ausente; se cree que la puerta de entrada es el tracto respiratorio o la piel, desde donde y siguiendo la vía hematógica, o una progresión local siguiendo vías nerviosas, las amibas llegan al SNC. Sólo dos casos de encefalitis atribuidos al género *Vahlkampfia* han sido diagnosticados en base a su apariencia morfológica en los tejidos; muy pocos casos han sido imputados genuinamente a especies del género *Hartmanella*; y un caso ha sido atribuido a *S. diploidea*. Los síntomas más comunes son anormalidades del estado mental, letargo, cefalea, hemiparesias y meningismo. La fiebre está presente en cerca de la mitad de los casos y, en un menor grado, náuseas, vómitos, anorexia, ataxia, y afasia. El curso de la enfermedad es subagudo o crónico, de siete a 120 días. Algunos pacientes tienen, simultáneamente, lesiones cutáneas ulceradas (Oddó, 2006).

## 7.3 Queratitis amibiana (QA)

La queratitis amibiana es la manifestación clínica más habitual de la infección por el género *Acanthamoeba*. Se caracteriza por ser dolorosa e invalidante. La infección progresa originando una ulceración de la córnea y puede dar como resultado ceguera en casos muy graves (Pérez-Irezábal et al., 2005).

Es una enfermedad difícil de diagnosticar y tratar, ya que las manifestaciones clínicas se confunden a menudo con la queratitis herpética o fúngica, lo que provoca que el diagnóstico correcto y el comienzo del tratamiento se retrasen semanas o meses. El cuadro clínico varía según el momento de la primera consulta. Al principio, las amibas se encuentran en el epitelio corneal, pero si la enfermedad progresa ocurre la invasión del estroma. En sus inicios, se caracteriza por limbitis, queratopatía punteada, infiltrados epiteliales, subepiteliales o perineurales (queratoneuritis radial). En



este momento el paciente sufre enrojecimiento, lagrimeo, fotofobia y dolor de diversa intensidad, pero desproporcionado respecto a los signos oculares, así como visión borrosa. Si la enfermedad progresa, puede observarse ulceración, infiltrado anular, placas endoteliales y uveítis anterior, con o sin hipopión (presencia de pus en la cámara anterior del ojo), y más infrecuentemente, edema corneal. Si el proceso se agrava, se pueden producir abscesos, escleritis, glaucoma, catarata e infección microbiana secundaria. Lo más característico es la presencia de un infiltrado anular compuesto por células inflamatorias (neutrófilos). Los pacientes que sufren esta infección son generalmente inmunocompetentes; no obstante, no desarrollan inmunidad protectora apreciable, por lo que es posible la reinfección (Pérez-Irezábal *et al.*, 2005).

La enfermedad se ha asociado en el 80% de los casos al uso de lentes de contacto (limpieza y/o almacenamiento inadecuados) por sujetos sanos e inmunocomprometidos, a su empleo durante deportes acuáticos y a traumatismos corneales (Uribarren, 2014).

## **8. Epidemiología de las amibas de vida libre a nivel mundial**

La MAP por *N. fowleri* tiene una distribución mundial, con más de 300 casos reportados a nivel internacional, sobre todo en los Estados Unidos, Australia y Europa (Gupta *et al.*, 2009).

Los casos registrados de esta infección han ido en aumento. En Latinoamérica han sido reportados casos en Venezuela, México y Perú considerándose estas dos últimas naciones como áreas endémicas (Rodríguez *et al.*, 1998).

Los datos epidemiológicos no dejan muy claro si la infección es debido a el ambientales únicamente o existe un componente genético, pero es curioso el dato de que un porcentaje muy elevado de pacientes en EEUU, corresponden a individuos hispanos. Se han descrito casos de encefalitis granulomatosa amibiana por *B. mandrillaris*, tanto en pacientes inmunocomprometidos, como en inmunocompetentes y aunque se ha aislado en animales como perros, ovejas, caballos, pero sobretodo en monos, no existe evidencia de que los animales sean reservorios de infecciones para humanos (Schuster y Visvesvara, 2004).

El número cada vez mayor de casos de QA se ha observado en estudios recientes en todo el mundo, con una incidencia entre 17 y 70 casos de QA por millón en usuarios de lentes de contacto (Ku *et al.*,



2009). El aumento significativo de QA en EEUU llevó al CDC, a realizar un estudio sobre esta enfermedad (Bryant *et al.*, 2007).

### 9. Epidemiología de las amibas de vida libre en México

Hasta diciembre del año 2008, habían sido diagnosticados 34 casos de MAP (Cuadro 1) en los años siguientes según la Dirección General de Epidemiología en los Estados Unidos Mexicanos la tendencia durante los años 2008 a 2014 ha presentado variaciones (Cuadro 2), con respecto a la EAG diez casos: Riestra y colaboradores (1987) efectuaron el diagnóstico de cuatro casos *postmortem* causados por *B. mandrillaris* en Guadalajara, Jalisco. Posteriormente, Uribe (2001) reportó seis casos más, dos del Distrito Federal, uno del Estado de México, dos de Guanajuato y uno de Puebla (Álvarez, 2016).

**Cuadro 1. Casos humanos de Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MAP) en la República Mexicana de 1978 a 2008 (Tapia, 2012).**

CASO	FECHA	EDAD	SEXO	DÍAS DE INFECCIÓN	Dx	ENTIDAD FEDERATIVA
1	Ago-78	16	M	4	Autopsia	BC.
2	1983	2	F	?	LCR	N.León
3	Abr-86	13	M	3	Autopsia	Mich.
4	Jul-89	15	M	7	Epidemiol.	BC.
5	Ago-89	15	M	7	Epidemiol.	BC.
6	Ago-89	15	M	2	Epidemiol.	BC.
7	Ago-89	12	M	4	Epidemiol.	BC.
8	Ago-89	5	M	6	Epidemiol.	BC.
9	Ago-89	12	M	5	Epidemiol.	BC.
10	Ago-89	14	M	4	Epidemiol.	BC.
11	Sep-89	17	M	2	Epidemiol.	BC.
12	Sep-89	9	M	8	Epidemiol.	BC.

13	Jul-90	18	M	7	Cultivo	BC.
14	Ago-90	10	M	4	LCR	BC.
15	Ago-90	12	M	3	Cultivo	BC.
16	Ago-90	18	M	5	Cultivo	Sonora
17	Ago-90	10	M	5	Cultivo	BC.
18	Ago-90	2	M	5	LCR	BC.
19	Ago-90	1	M	2	Cultivo	BC.
20	Jun-91	30	M	9	LCR	BC.
21	Sep-91	12	M	6	Cultivo	BC.
22	Ago-92	8	M	3	Cultivo	BC.
23	Ago-92	13	M	16	LCR	BC.
24	Sep-92	9	M	?	LCR	BC.
25	Jul-94	13	M	10	LCR	Tamps.
26	Jul-98	11	M	?	Cultivo	BC.
27	Ago-98	17	M	3	Cultivo	Sonora
28	Ago-98	6	M	?	Cultivo	BC.
29	Oct-99	30	M	10	Cultivo	Sonora
30	Jun-01	10	M	4	Cultivo	Chih.
31	2003	9	M	?	Cultivo	BC. (Mexicali)
32	2005	20	M	?	Cultivo	Sonora
33	Jul-06	8	M	?	Cultivo	BC. (Tijuana)
34	May-08	12	M	?	Cultivo	Hidalgo

**Cuadro 2. Casos de humanos de Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MAP) en República Mexicana de 2009 a 2014.**

**Tomado de: SINAVE/DGE/Salud/Sistemas Especiales de Vigilancia Epidemiológica.**

<b>FECHA</b>	<b>EDAD</b>	<b>SEXO</b>	<b>ENTIDAD FEDERATIVA</b>
<b>Agosto -2009</b>	20-24	M	BC
<b>Marzo – 2012</b>	50-59	F	Edo. Méx:
<b>Septiembre – 2013</b>	60-64	F	Hidalgo
<b>Mayo – 2014</b>	5-9	M	DF
<b>Junio – 2014</b>	15-19	M	BC
<b>Julio – 2014</b>	15-19	M	BC
<b>Julio – 2014</b>	45-49	M	Edo. Méx.

### III. MARCO DE REFERENCIA

- ✚ Rivera *et al.*, en 1989 analizaron siete muestras de agua de tres balnearios de aguas termales de Tecozautla, Hidalgo, aislando 33 cepas de amibas de vida libre pertenecientes a los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba*, y *Willaertia*. Veinte de estas cepas pertenecían al género *Naegleria*, 16 de ellas se clasificaron como *Naegleria* spp., y dos se clasificaron como *Naegleria lovaniensis*. Cabe destacar el hallazgo de dos cepas patógenas de la especie *Naegleria australiensis*. *N. australiensis*; *N. lovaniensis* puede considerarse buenos organismos indicadores, ya que viven en las mismas condiciones ambientales que *N. fowleri*, el agente de la MEAP. También se identificaron dos cepas de *Acanthamoeba castellanii* y una de *Acanthamoeba lugdunensis*, que resultó ser patógena cuando se probó en ratones, nueve cepas patógenas del género *Acanthamoeba* spp. se aislaron junto con una cepa de *Willaertia magna*, una amiba no patógena termófila.
- ✚ Rivera *et al.*, en 1993 realizaron un estudio en tinas de hidroterapia y piscinas del Área Metropolitana de la Ciudad de México, encontrando 29 cepas de 8 géneros. Los más frecuentes fueron *Acanthamoeba* (con cuatro cepas patógenas), *Vahlkampfia*, *Hartmanella* y *Naegleria*. Las amibas se aislaron con mayor frecuencia en primavera y verano, y no se pudieron recuperar de los grupos con niveles de cloruro de 5,31 mg / ml o más, demostrando que las concentraciones de cloruro que se usan comúnmente en piscinas recreativas y bañeras de terapia no son suficientes para eliminar los quistes viables de la mayoría de las amibas de vida libre.
- ✚ Bonilla *et al.*, en 2000 muestrearon diferentes cuerpos de agua como cascadas, lagunas y piscinas usados para la natación en la región de la Huasteca potosina en el estado de San Luis Potosí, identificando 120 AVL que representan 18 géneros. Los géneros más frecuentes fueron *Vannella*, *Rosculus* y *Acanthamoeba*. La frecuencia de AVL potencialmente patógena fue baja y solo tres aislamientos de *Acanthamoeba* fueron invasivos en ratones. La presencia de *Acanthamoeba* y *Naegleria* fue baja; sin embargo, incluyen especies potencialmente patógenas que pueden actuar como vectores y reservorios de patógenos microbianos y pueden producir infecciones humanas.

- ✚ Muñoz *et al.*, en el 2003 estudiaron la presencia de amibas de vida libre en muestras de agua obtenidas de ocho piscinas públicas, recolectadas de la superficie, el fondo, los canales y el filtro. Se tomaron 8 muestras de cada piscina, teniendo un total de 64 muestras. Las amibas fueron encontradas en cinco piscinas (62%). En 22 de las muestras (34.5%) se identificaron AVL; de estas *Hartmannella vermiformes* (*Vermamoeba*) constituyó el 12.5%, *Vannella* el 9.4%; *Naegleria* el 7.8% y *Acanthamoeba* el 4.7%. Teniendo en cuenta la capacidad patógena para el hombre, el 36.4% de las cepas aisladas pertenecen a aquellas que han demostrado ser peligrosas (*Naegleria* y *Acanthamoeba*).
  
- ✚ Lares-Jiménez y Lares-Villa en el 2009 identificaron morfológica y fisiológicamente once géneros de AVL en aguas superficiales de la región del Valle del Mayo, Sonora. Aislaron 91 cepas, 14 resultaron ser positivas a la prueba de flagelación. De estas, cinco crecieron a 45°C y nueve crecieron en un rango de temperatura entre 20°C y 37°C. A cinco cepas sospechosas se les extrajo el ADN y se trataron con la técnica de PCR para compararlas con cepas de *Naegleria fowleri* y examinar su semejanza. El resultado reveló que los aislamientos correspondieron a otras especies de *Naegleria* termófilas.
  
- ✚ Castillo *et al.*, en 2010 examinaron 60 muestras de agua provenientes de 30 sitios del Salvador, donde encontraron AVL en dos muestras de agua tomadas del fondo de piscinas con agua clorada y en una muestra tomada del fondo de otra piscina de agua no clorada.
  
- ✚ Castro en el 2012 realizó cuatro muestreos en el balneario “El Geiser” ubicado en el municipio de Tecozautla, Hidalgo, obteniendo 53 muestras de las cuales se aislaron e identificaron 167 organismos amibianos. Entre los aislados destaca el género *Acanthamoeba* que fue el más frecuente aislado (72%), de este género se determinaron siete especies, las que se aislaron con mayor frecuencia fueron *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*, encontrándose (*Acanthamoeba*) presente en todas las albercas de este balneario.

- ✚ Morales en el 2012 determinó la presencia de AVL en seis pozos de agua potable del municipio de Tizayuca, Hidalgo, en donde se encontraron 13 especies pertenecientes a nueve géneros: *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Platyamoeba*, *Rosculus*, *Thecamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vanella* y *Vexilifera*, siendo *Hartmannella vermiformis* la que se presentó con mayor frecuencia (44%). De las amibas encontradas en los pozos solamente se ha reportado como patógena *A. polyphaga*.
  
- ✚ López en el 2014 realizó dos muestreos en el parque Ecoalberto Ixmiquilpan, Hidalgo, México, uno en el mes de febrero (temporada de secas) y otro en agosto (temporada de lluvias) de manantiales de aguas termales y una alberca alimentada con agua termal de manantial. Obteniendo 56 muestras de AVL. Las especies que se aislaron con mayor frecuencia fueron: *Naegleria sp.* (15), *Rosculus ithacus* (11) y *Guttulinopsis vulgaris* (8) y con menor frecuencia *Vanella lata*, *Vahlkampfia aberdonica*, *V. ustiana*, *Platyamoeba placida*, *P. stenopodia*, *Acanthamoeba polyphaga*, *A. astronyxis* y *Mayorella cultura* con un solo aislamiento. En la prueba de patogenicidad se probaron dos aislados del género de *Naegleria* y cuatro de *Acanthamoeba*. *Naegleria* no fue patógena, pero un aislado identificado como *A. astronyxis* resultó invasiva en ratón.
  
- ✚ Álvarez en el 2016 realizó un estudio en el balneario natural “Hierve el agua” ubicado en el municipio de San Lorenzo Albarradas, Oaxaca, el cual comprendió dos muestreos. El primer muestreo se realizó en el mes de Septiembre de 2012 (época de lluvias) en donde se obtuvieron un 90% (18 muestras) de aislados positivos para AVL, identificándose 13 especies pertenecientes a cinco géneros (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Thecamoeba*, *Vanella*, *Vahlkamphia*). El segundo muestreo se realizó en el mes de abril del 2013 (época seca) donde se obtuvo un 65% (13 muestras) de aislados positivos, identificándose un total de 18 especies pertenecientes a 9 géneros (*Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Rosculus*, *Saccamoeba*, *Thecamoeba*, *Vanella*, *Vahlkamphia*).
  
- ✚ Taméz en el 2018 aisló e identificó AVL 23 especies de amibas en cuerpos de agua de uso recreativo del balneario Laguna Larga, Los Azufres, Michoacán en las épocas de lluvias y

secas. Durante el mes de agosto (temporada de lluvias) se identificaron un total de 21 especies, siendo *N. fowleri* la más frecuente ya que se logró aislar en el 66% de los cuerpos de agua muestreados, mientras a finales de octubre (temporada de sequías) se aislaron 13 especies, siendo de nueva cuenta *N. fowleri* la amiba con mayor frecuencia en los cuerpos de agua muestreados.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

La principal fuente de transmisión de organismos patógenos para el hombre es el agua, elemento imprescindible para todos los organismos vivos. Los seres humanos necesitamos el agua para realizar varias funciones vitales, como uso público, doméstico, agrícola, ganadero, industrial, centrales de energía y uso recreativos. La calidad del agua destinada a las actividades antes mencionadas está regulada con el fin de prevenir brotes infecciosos que pueden estar causados por virus, bacterias y protozoos.

La mayoría de los casos reportados por amibas de vida libre han tenido en común haber nadado en pozas, reservorio de agua templada y piscinas.

En México son pocos y de hace algunos años los estudios realizados sobre las amibas de vida libre en agua de piscina por lo que es importante realizar estudios actuales sobre los protozoos mencionados anteriormente. Debido a la falta de conocimiento entre los médicos y los laboratorios clínicos, un número de casos de infecciones debidas a las AVL podrían estar diagnosticadas de forma incorrecta pudiendo pasar desapercibidas y reportando a los pacientes como enfermos debido a otros agentes patógenos como bacterias, virus, hongos y cisticercos, aún cuando el diagnostico clínico pueda indicar la ausencia de estos microorganismos.



## V. OBJETIVOS

### 1. OBJETIVO GENERAL

- ✚ Detectar la presencia de amibas de vida libre patógenas en agua de piscinas de municipios del Estado de México.

### 2. OBJETIVOS PARTICULARES

- ✚ Aislar las Amibas de Vida Libre a diferentes temperaturas de incubación.
- ✚ Identificar morfológicamente las Amibas de Vida Libre aisladas.
- ✚ Determinar las siguientes características fisicoquímicas del agua de las piscinas: pH, temperatura, oxígeno disuelto y cloro libre residual.

## VI. MATERIALES Y METODOS

### 1. Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en cinco piscinas del Estado de México localizadas en los municipios de Tlalnepantla, Naucalpan de Juárez y Atizapán de Zaragoza. Las piscinas que se muestrearon en dos tiempos diferentes, la Etapa 1 fue de Octubre a Noviembre del 2015. La Etapa 2 fue de Marzo a Mayo del 2016 (Cuadro 3). La piscina UC no se pudo muestrear en la segunda etapa por dificultad en el acceso.

**Cuadro 3. Localización de las piscinas muestreadas.**

ALBERCA	CLAVE	LOCALIDAD	CARACTERÍSTICA
1	AT 19/10/2015 6/04/2016	Tlalnepantla	Cerrada
2	ATI 3/11/2015 27/04/2016	Tlalnepantla	Cerrada
3	UC* 23/10/2015	Naucalpan	Abierta
4	SM 9/11/2015 27/04/2016	Atizapán de Zaragoza	Abierta
5	VD 9/11/2015 11/05/2016	Tlalnepantla	Semi-abierta

\*Por dificultad en el acceso esta piscina solo se muestreo en la primera etapa

## 2. Muestreo

Las muestras se tomaron en la superficie del agua, preferente en las esquinas de las piscinas en envases estériles de 1000 ml. Las muestras se transportaron al laboratorio a temperatura ambiente y se procesaron en un lapso de tiempo no mayor a 24 hrs.

Los parámetros fisicoquímicos: temperatura y pH (este fue medido con un Conductronic pH10) se tomaron en el sitio; el oxígeno disuelto (OD) y cloro libre residual fueron determinados en el laboratorio de Calidad del Agua del Grupo de Investigación en Conservación y Mejoramiento del Ambiente (GICyMA) de la FES Iztacala.

## 3. Laboratorio

### 3.1 Aislamiento de las amibas.

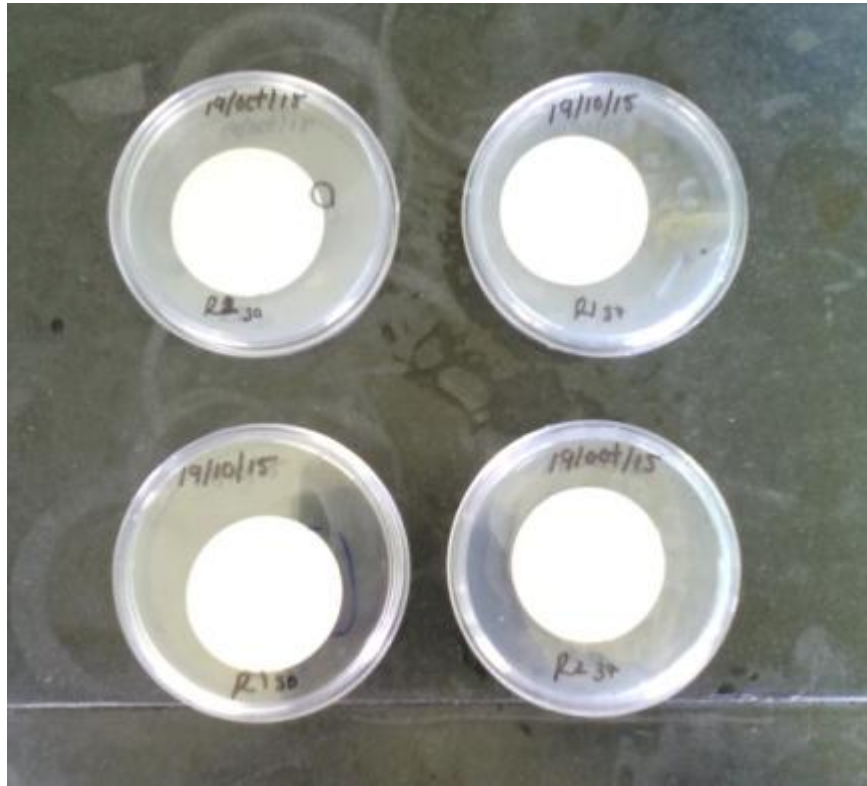
Las muestras de agua se filtraron a través de una membrana d 1.2  $\mu\text{m}$  con la ayuda de vacío en condiciones estériles (Figura 10).



**Figura 10. Filtración de las muestras de agua de piscina por la técnica de Filtro de Membrana.**

La membrana se colocó boca abajo en una placa con medio Agar no Nutritivo (NNE) (ANEXO) con la bacteria *Enterobacter aerogenes* (Figura 11). Esto se realizó por duplicado para incubar a 2 temperaturas, 30 °C y 37 °C o 25 °C y 30 °C, dependiendo de la temperatura del agua de la piscina.

Los cultivos se examinaron diariamente hasta por 15 días usando un microscopio invertido para detectar el crecimiento amibiano.



**Figura 11. Placas del medio NNE con la membrana.**

### **3.2 Identificación de las amibas aisladas.**

La identificación de las AVL se realizó observando preparaciones en fresco al microscopio óptico de contraste de fases a 40x y 100x. Se tomaron en cuenta los caracteres morfológicos tanto de la fase vegetativa o trofozoíto como del quiste, siguiendo las claves de Page 1988.

### **3.3 Cultivos axénicos**

Cuando se detectó que las amibas aisladas pertenecían al género *Acanthamoeba*, se marcó un cuadro de crecimiento y se resembró en medio NNE fresco para obtener un buen crecimiento de la amiba.

Para realizar el cultivo de la amiba en medio axénico, se revisaron las placas de agar con las amibas aisladas, se marcaron las zonas con mejor crecimiento de trofozoítos y un cuadro se transfirió a

tubos de ensayo con medio Chang y Bactocasitona con suero fetal o con suero de ternera con antibiótico para eliminar la bacteria proveniente del medio monoaxénico (Anexo). Los tubos se incubaron a la temperatura de aislamiento de la amiba (25,30 o 37 °C) manteniéndolos inclinados y sin movimiento.

### 3.4 Prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se realizó en cinco ratones machos de tres semanas de edad, a los cuales se les inoculó cultivos axénicos de las amibas pertenecientes al género *Acanthamoeba*. Los trofozoítos se concentraron a 3000 rpm durante 10 min. y se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  trofozoitos para SM y  $7 \times 10^5$  trofozoitos para VD. De este concentrado se tomó un volumen de 20  $\mu\text{L}$  y se aplicó a través de los orificios nasales del ratón (Figura 13). Los animales se observaron un periodo de 21 días.



**Figura 12. Prueba de patogenicidad en ratones.**



**Figura 13. Inoculación de *Acanthamoeba polyphaga* en los ratones por vía intranasal.**

Los ratones se sacrificaron al término del período de observación, se extrajo el cerebro, hígado, pulmón y riñón, que se colocaron en placas con medio NNE y se incubaron a la temperatura de aislamiento de la amiba (Figura 14). Los cultivos se observaron al microscopio invertido diariamente por una semana y media para detectar desarrollo amibiano.



**Figura 14. Placas de agar con los órganos de los ratones sacrificados.**



## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Presencia y ausencia de AVL

De las cinco piscinas muestreadas, solamente en dos se aislaron amibas. La piscina SM fue la única que tuvo presencia de amibas en las dos etapas y la VD solo en la segunda, la piscina SM estaba al aire libre y la VD estaba semi-abierta (solo tenía techo).

**Cuadro 4. Presencia de las AVL en las piscinas.**

PISCINA	ETAPA 1		ETAPA 2	
	30°C	37°C	30°C	37°C
ATI	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
UC	Negativa	Negativa	No se muestreo	
AT	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
	25°C	30°C	25°C	30°C
VD*	Negativa	Negativa	Positiva	Positiva
SM	Positiva	Positiva	Positiva	Positiva

\*En la Etapa 2 se obtuvo más volumen de muestra de la piscina, por lo que se incubo a 37°C, siendo positivo el cultivo.

### 2. Riqueza específica

Se aislaron e identificaron cinco especies amibianas, pertenecientes a 4 géneros: *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vanella* y *Vexillifera*, presentándose en ambas etapas en la piscina SM y en la etapa 2 en la VD (Cuadro 5), siendo *Acanthamoeba* el género que se encontró con más frecuencia; esto coincide con los resultados obtenidos por Castro en el 2012 donde observó que el género más aislado en piscinas termales en Tecozautla, Estado de Hidalgo fue *Acanthamoeba* con un 72%. Esto



es importante porque las especies del género *Acanthamoeba* se han reportado como agente causal de la Encefalitis Amebiana Granulomatosa y de Queratitis Amebiana en humanos (Gertiser, 2010; Bonilla y Ramírez, 2014).

En la piscina SM en la etapa 1 se presentaron amibas que pertenecieron a los géneros *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* y *Vannella*, en la Etapa 2 se aislaron amibas de *Acanthamoeba* y *Vexillifera*. Hay que mencionar que a diferencia de las otras piscinas, en esta fue donde se detectaron las menores concentraciones de cloro, 0.2 y 0.4 mg/L (Cuadro 7).

En la piscina VD en la Etapa 1 no se presentaron amibas, solamente en la Etapa 2, las amibas pertenecieron al género *Acanthamoeba*. Entre las 2 etapas hubo una diferencia notable en la concentración de cloro, en la primera fue de 9 mg /L, mientras que en la segunda fue de 3.3 mg/L, que aunque en si no es una concentración baja, si fue a comparación de lo detectado en la Etapa 1(Cuadro 7).

**Cuadro 5. Riqueza específica de las AVL aisladas de las piscinas.**

PISCINA	1° ETAPA	2° ETAPA
SM (chapoteadero)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acanthamoeba polyphaga</i></li> <li>• <i>Vahlkampfia aberdonica</i></li> <li>• <i>Vahlkampfia enterica</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acanthamoeba polyphaga</i></li> <li>• <i>Vexillifera bacillipedes</i></li> <li>• <i>Vannella platypodia</i></li> </ul>
VD (chapoteadero)	Negativa	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Acanthamoeba polyphaga</i></li> </ul>

Las especies encontradas en los sitios en cada etapa se aislaron a dos temperaturas de incubación.

### 3. Prueba de patogenicidad

La prueba se realizó en las dos cepas aisladas pertenecientes a la especie *Acanthamoeba polyphaga*. La cepa de *A. polyphaga* aislada de la piscina SM no mató a los ratones; mientras que la cepa de *A. polyphaga* aislada de la piscina VD tampoco mató a los ratones, pero al sacrificar a los ratones después del período de la prueba y sembrar los cuatro órganos (cerebro, pulmón, hígado y riñón) en cajas con medio NNE, se presentaron amibas en el cerebro y pulmón de uno de los ratones sacrificados. Esto puede ser de importancia, ya que hay que mencionar que *Acanthamoeba* es una amiba oportunista que puede causar enfermedad en pacientes inmunocomprometidos o inmunodeficientes (Gertiser, 2010; Bonilla y Ramírez, 2014).

**Cuadro 6. Patogenicidad de las cepas de *Acanthamoeba polyphaga*.**

PISCINA	ESPECIE	PATOGENICIDAD
SM	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Negativa
VD	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>	Invasiva*

En el caso de **SM** la cepa que creció a 30°C y en el caso de **VD** la que creció a 37°C, fueron las que se usaron para realizar la prueba de patogenicidad.

**\*Invasiva:** No mató a los ratones durante el período de la prueba, pero al sembrar los órganos de los ratones sacrificados la amiba se aisló del cerebro y pulmón de un ratón.

#### 4. Análisis fisicoquímicos

Los valores de los parámetros fisicoquímicos medidos en las piscinas se presentan en el Cuadro 7.

**Cuadro 7. Parámetros fisicoquímicos de las piscinas del Área Metropolitana.**

PISCINA	pH	Temperatura (°C)	Cloro (mg/L)	OD (mg/L)
<b>ETAPA 1</b>				
AT	7.2	30	8.2	6.7
UC	3.6	27	1.3	5.6
ATI	8.3	30	2.7	6.2
VD	6.6	25	9	7.4
SM	6.8	20.5	0.4	7.6
<b>ETAPA 2</b>				
AT	6.8	31	0.3	5.5
ATI	8.1	29	4	6.7
VD	6.2	33	3.3	5.9
SM	8.5	18	0.2	7.6

La mayoría de las piscinas presentaron valores de pH que estuvieron alrededor de la neutralidad, en un intervalo de 6.22 a 7.27, dos piscinas (ATI y SM) presentaron pH básico, aunque en el caso de SM el pH básico solo lo presento en la segunda etapa, lo que señala irregularidades en su mantenimiento.

UC tuvo un pH muy bajo de 3.6, esta pudo haber sido la razón por lo que no se asilaron AVL, a pesar de ser una piscina abierta expuesta al viento. A este respecto se ha reportado que un pH alrededor de la neutralidad es adecuado para la presencia de estos organismos en el agua (Bonilla *et al.*, 2004). Además, esta fue la única piscina que estuvo fuera de la NOM-245-SSA1-2010 para agua de alberca, que señala que el pH debe de ser estar entre 6.5 a 8.5.

La temperatura de las piscinas estuvo en un intervalo de 25 a 33 °C, a excepción de la SM, que estuvo por debajo de esos valores (18 y 20.5 °C) lo que es entendible porque es una piscina totalmente abierta. Este parámetro no está contemplado en la norma, pero es común que las piscinas cerradas, tengan una temperatura alrededor de 30 °C y se ha reportado que una temperatura por arriba de 30°C favorece la presencia de amibas patógenas (Bonilla *et al.*, 2004). Esta pudo haber sido la razón de que en la piscina VD, en donde se registró la temperatura más alta (33°C), fue donde se aisló la cepa de *A. polyphaga* que fue invasiva cuando se realizó la prueba de patogenicidad, a pesar de que el cloro fue de 3.3 mg/L. En cambio, la cepa de *A. polyphaga* que se aisló de SM no fue patógena ni invasiva, a pesar de ser de la misma especie, pero la temperatura del agua fue la más baja (18 y 20.5 °C).

El cloro libre residual estuvo en un intervalo muy variable, desde 0.3 a 9.0 mg/L, estando en algunas ocasiones por debajo o por arriba de lo que señala la NOM-245-SSA1-2010 de 1.0 a 5.0 mg/L. Destacan las piscinas AT y VD porque en la primera etapa tuvieron una concentración de cloro muy alta de 8.2 y 9.0 mg/L respectivamente y no se presentaron amibas, pero en la segunda etapa bajaron a 0.3 y 3.3 mg/L respectivamente; en el caso de VD la concentración de cloro de 3.3 mg/L estuvo dentro de la norma, sin embargo se aislaron amibas del género *Acanthamoeba*.

Las amibas que más se aislaron en las piscinas pertenecieron al género *Acanthamoeba*. Se ha reportado que estas amibas pueden resistir una concentración de cloro alta, debido a que su quiste tiene celulosa y esto las hace muy resistentes a las condiciones ambientales (Bonilla *et al.*, 2004). A este respecto hay un dato interesante en la literatura que señala que una concentración inicial de cloro puede destruir los quistes de amibas, pero no el cloro residual (De Fonckherere, 1979).

La piscina SM fue la que tuvo el cloro libre residual más bajo en ambas etapas (0.4 y 0.2 mg/L) y fue en la que se aislaron amibas de tres géneros diferentes, incluyendo *Acanthamoeba*. Esto se pudo deber a que esta piscina era totalmente abierta y estaba expuesta al aire libre con aporte de material vegetal, diversas investigaciones señalan que quistes de AVL pueden llegar a los cuerpos de agua por el aire (Bonilla *et al.*, 2004). La distribución de AVL en un lugar depende de la cantidad y la calidad de alimento, la presencia de depredadores o competidores y de las condiciones ambientales (Rodríguez, 1994). Se encontraron amibas de los géneros *Vanella*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*, las primeras no son consideradas patógenas, pero comparten con la mayoría de las AVL la habilidad de ser hospedera de simbioses que son patógenos del ser humano (Michel *et al.*, 2000),

EL oxígeno disuelto no tuvo tanta variación entre las piscinas, estuvo en un intervalo de 5.6 a 7.6 mg/L. Estas concentraciones son adecuadas para la presencia de las amibas de vida libre, ya que son organismos aerobios (Bonilla *et al.*, 2004).

## VIII. CONCLUSIONES

- Las especies de amibas de vida libre que se detectaron en las piscinas muestreadas en ambas etapas fueron: *Acanthamoeba polyphaga*, *Vahlkampfia aberdonica*, *Vahlkampfia enterica*, *Vexillifera bacillipedes* y *Vannella platypodia*.
- *A. polyphaga* es considerada patógena para el ser humano debido a que infectan el sistema nervioso central causando Queratitis Amibiana, Encefalítis Amibiana Granulomatosa y Acanthamoebiosis cutánea.
- Las amibas aisladas se incubaron a tres temperaturas, 25 °C, 30 °C y 37 °C observando que las especies pudieron desarrollarse mejor a 30 °C y 37 °C.
- Se observó que en las piscinas con concentración de cloro libre residual altas o con pH bajos o altos, no se presentaron AVL debido a que no se encontraron dentro de los valores reportados como adecuados para la presencia de estas amibas.
- Las concentraciones de cloro libre residual altas que se encontraron en algunas de las piscinas, puede producir irritación de la nariz, la garganta y los ojos, tos y alteraciones en la frecuencia respiratoria y daño a los pulmones
- De acuerdo con la NOM-245-SSA1-2010 es importante seguir con los monitoreos de todas las piscinas muestreadas, y así brindar un servicio seguro a los usuarios.
- Se recomienda que las personas que acudan a las piscinas tomen medidas al momento de practicar la natación, como el uso de goggles, no introducirse al agua con lentes de contacto, usar pinzas nasales y evitar la entrada brusca del agua por la nariz.

## LITERATURA CITADA

- Álvarez, B. J. L. 2016. Detección de amibas patógenas de vida libre en el balneario natural “Hierve el agua” en el municipio de San Lorenzo Albarradas, Estado de Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. Pág. 31-33.
- Aqeel, Y., Siddiqui, R., Ateeq, M., Raza Shah, M., Kulsoom, H., Khan, N. A. 2014. Atomic force microscopic imaging of *Acanthamoeba castellanii* and *Balamuthia mandrillaris* trophozoites and cysts. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 62 (1): 85-94.
- Ávila, I., Rodríguez, M., Infante. D., Llovera, V., Álvarez, O., Briceño, M. 2006. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas de piscinas del parque “Las Cocuizas”, Maracay Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 58 (1): 19-24.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderón, A., Gallegos, E., Hernández, D. 2000. Occurrence of Pathogenic and Free-living Amoebae in Aquatic Systems of the Huasteca Potosina, Mexico. In: Munawar M, Lawrence SG, Munawar IF, Malley DF, eds. *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*. Leiden: Backhuys Publishers. 37-44.
- Bonilla, P., Ramírez E., Ortíz R., Eslava C. 2004. La ecología de las amibas de vida libre en ambientes acuáticos. En: *Microbiología Ambiental* (I. Rosas, A. Cravioto, E. Ezcurra, Eds.). SEMARNAT, INE, PUMA-UNAM, Ciudad de México. Pp. 67-81.
- Bonilla, P., Ramírez E. 2014. Amibas de vida libre patógenas y oportunistas. En: *Parasitología Médica*. M.A. Becerril. 4° Edición. McGraw-Hill Interamericana. México. Pp. 37-50.
- Bryant, K. 2007. *Acanthamoeba* keratitis multiple states. *MMWR, Morbidity and Mortality Weekly Report*. 56 (21): 532-534.
- Castillo, M. E., Santos, H. R., Torres, C.M., Portillo, J.A., Rosales, Q. R. 2010. Amibas de vida libre en pozas, piscinas y lagos de El Salvador. *Revista Crea Ciencia*. 7 (11): 6-8.
- Castro, M. A. 2012. Aislamiento e identificación en amebas patógenas del género *Acanthamoeba* en piscinas termales en Tecozautla, Estado de Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. Pág. 24.
- De Fonckherere, J., De Voorde, H. 1979. Differences in destruction of cysts of pathogenic and non pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Applied and Environmental Microbiology*. 31 (2): 294-297.
- De Jonckheere, J. F. 2011. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection Genetics and Evolution*. 11 (7): 1520-1528.

- Gallegos-Neyra, E. M. 1997. Amebas de vida libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí. Tesis Doctoral en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México. 130 Pp.
- Gertiser, M. L., Visciarelli, E., Basabe, N., Pérez, M. J. Costamagna, S. R. 2010. *Acanthamoeba* spp. en piscinas cubiertas de la Ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. ABCL. 44 (4): 697-703.
- Greub, G., Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. Clinical Microbiology Reviews. 17 (2): 33-413.
- Gupta, N., Bhaskar, H., Duggal, S., Ghalaut, P. S., Kundra, S., Arora, D. R. 2009. Primary amoebic meningoencephalitis: first reported case from Rohtak, North India. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 13 (3): 236-237.
- Kyle, D., Noblet, G. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoeba. I. Willard's Pond. Journal Protozoology. 33 (3): 422-434.
- Ku, J. Y. Chan, F. M., Beckingsale, P. 2009. *Acanthamoeba* keratitis cluster: an increase in *Acanthamoeba* keratitis in Australia. Journal of Clinical and Experimental Ophthalmology. 37 (2): 181-190.
- Lares-Jiménez, L. F., Lares-Villa, F. 2009. Aislamiento de Amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. 5 (2): 161-166.
- López, C. B. M. 2014. Amibas de vida libre en manantiales de aguas termales del parque Ecoalberto, Ixmiquilpan, Hidalgo, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. Pp. 14-17.
- Michel, R., Schmid, E. N., Böker, T., Hager, D. G., Müller, K. D. Hoffmann, R., Seitz, H. M. 2000. *Vanella* sp. Harboring Microsporidia-like organisms isolated from the contact lens and inflamed eye of a female keratitis patient. Parasitology Research. 86 (6): 514-20.
- Morales, P. G. L. 2012. Detección de Amibas de Vida Libre en pozos de agua potable del Municipio de Tizayuca, Hidalgo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México. Pp. 16-26.
- Muñoz, V., Reyes, H., Toche, P., Cárcamo, C., Gottlieb, B. 2003. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. Parasitología Latinoamericana. 58 (39): 106-109.



- Oddó, B. D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatomoclínicos. *Revista Chilena de Infectología*. 23 (3): 200-214.
- Page, F. C. 1988. A new key to freshwater and soil *Gymnamoeba*. England: Freshwater Biological Association Scientific Press. 24-120 Pp.
- Peralta, M. L., Ayala, J. J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Salud Uninorte*. 25 (2): 280-283.
- Pérez-Irezábal, J., Martínez, I., Isasa, P., Barrón, J. 2006. Queratitis por *Acanthamoeba*. Programa de control externo de calidad SEIMC. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 3 (1): 46-52.
- Riestra, J., Riestra, R., Gonzáles, A., Moreno, P., Martínez, J., Visvesvara, G., Careaga, F., Oropeza de Alba, J., Cornejo, S. 1997. Granulomatous amebic encephalitis due to *Balamuthia mandrillaris* (leptomyxiidae): report of four cases from México. *American Journal and Tropical Medicine and Hygiene*. 56 (6): 603-607.
- Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Martínez, J.J., Rodríguez, S., Alcocer, J. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico. *Environmental Research*. 50 (2): 289-295.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Zaldivar, B., Ramírez P. 1993. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming-pools and physiotherapy tubs in México. *Environmental Research*. 62 (1): 43-52.
- Rodríguez, S. 1994. Ecology of free-living amoeba. *Critical Reviews in Microbiology*. 20 (3): 225-241.
- Rodríguez, R., Méndez, O., Molina, O., Luzardo, G., Martínez, A. J., Visvesvara, G. S., Cardozo, J. 1998. Central nervous system infection by free-living amebas: report of 3 Venezuelan cases. *Revista Neurología*. 26 (154): 1005-8.
- Rodríguez, S., Dorantes, I., Velasco, J., Ferrer, R. 2004 Impacto de la fumigación con de metilo en tipos morfológicos de amibas desnudas de un suelo agrícola. *Terra Latinoamericana*. 22 (2): 197-205.
- Rodríguez, S., Gaviria, L., Rivera, V. 2005. Species richness of free-living Amoebae in the rhizosphere of *Neobuxbaumia tetetzo* and *Prosopis laevigata* in the drylands of Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 2 (1): 54-64.

- Seas, C., Bravo, F. 2006. Encefalitis amibiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad fatal reconocida cada vez más frecuentemente en América Latina. *Revista Chilena de Infectología*, 23 (3): 197-199.
- Schuster, F. L., Visvesvara, G. S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal Parasitology*. 3 (9): 1001-1027.
- Sigala, R.I. 2008. Registro Protozoológico en Cinco Biotopos de los Riscos Querétaro, México. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencia, UNAM. México.
- Smirnov, A., Thar, R. 2003. Spatial distribution of Gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) in Brackish-Water sediments at the scale of centimeters and millimeters. *Protist*. 154 (3): 359-369.
- Taméz, H. L. R. 2018. Riqueza específica de amibas de vida libre potencialmente patógenas de Laguna Larga, Michoacán. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. México.
- Tapia, J. 2012. Amibas de vida libre. En: Tay J. Editorial Microbiología y Parasitología Médica. México, Distrito Federal. Cuarta Edición Cap. 83. 749-760 Pp.
- Trabelsi, H., Denadana, F., Sallami, A., Sallami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*. 60 (6): 399-405.
- Uribarren, B. T. 2014. *Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia*. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. México.
- Uribe, O., Becerra, M., Alvarado, I., Méndez, P., Ontiveros, P., Sánchez, S., Chávez, L., Ceballos, J., Martínez, J., Visvesvara, G., Olvera-Rabiela, J., 2001. Granulomatous amebic encephalitis by *Balamuthia mandrillari*. *Patología Revista Latinoamericana*. 39 (3): 141-148
- Visvesvara, G.S. 2014. Pathogenic and Opportunistic Free-living Amoebae: Agents of Human and Animal Disease. In: Farrar J, White NJ, Hotez PJ, Junghans T, Lallod, Kang G, eds. *Manson's Tropical Infectious Diseases*. 23th Ed. China: Elsevier Saunders. 683-691 Pp.

## ANEXO

### MEDIO DE AGAR NO NUTRITIVO (NNE) CON *Enterobacter aerogenes*

Composición del medio:

NaC_____	0.12 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O_____	0.004 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O_____	0.004 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> _____	0.142 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> _____	0.136 g
Agar bacteriológico_____	15.0 g
Agua destilada_____	1000 ml

#### **Bacteria *Enterobacter aerogenes***

1. Poner 0.5 ml de la suspensión de bacteria inactivada\*
2. Esparcir la suspensión bacteriana en la superficie del agar con una "L" de varilla de vidrio (flamear con alcohol la "L" en cada ocasión).
3. Dejar que se seque el exceso de líquido.
4. Guardar en refrigeración.

\*La inactivación de la bacteria se realiza a 68°C en baño de agua por una hora.

## MEDIOS AXÉNICOS

### MEDIO DE BACTOCASITONA

Composición del medio:

Bactocasitona\_\_\_\_\_ 20 g

Agua destilada\_\_\_\_\_ 1000 ml

### MEDIO CHANG (MODIFICADO)

Composición del medio:

Peptona Biotriptasa\_\_\_\_\_ 16.6 g

Dextrosa\_\_\_\_\_ 2.7 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\_\_\_\_\_ 1.5 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\_\_\_\_\_ 0.9 g

Agua destilada\_\_\_\_\_ 1000 ml