



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Presencia de *Naegleria* y *Acanthamoeba* en  
el canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARÍA DEL CARMEN ACUÑA QUEZADA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2023



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.



*A mis padres*

# Agradecimientos

A decorative illustration of a branch with several small, five-petaled flowers and leaves, positioned above the end of the title.

*A Dios por concederme fortaleza para estudiar la vida.*

*A mis padres Adela y José Luis por su esfuerzo y amor.*

*A mis queridos hermanos y sobrinos por su cariño.*

*A mi mejor amigo Cris porque con él todo es esperanzador.*

*A Vicky, Emma y Marianita por su entrañable amistad.*

*A la Dra. Pati y a Daniela por sus valiosos aportes y apoyo.*

*A mi comité tutorial por su atención y contribuciones.*

## Índice general

<b>Índice general</b>	<b>1</b>
<b>Índice de figuras</b>	<b>2</b>
<b>Índice de tablas</b>	<b>3</b>
<b>Lista de abreviaturas y parámetros fisicoquímicos</b>	<b>4</b>
<b>Resumen</b>	<b>5</b>
<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>1 Introducción</b>	<b>7</b>
1.1. Amibas de vida libre . . . . .	7
1.2. Aspectos ecológicos y médicos . . . . .	7
1.3. Estado actual de <i>Naegleria</i> y <i>Acanthamoeba</i> en Mexicali, B. C. . . . .	10
<b>2 Antecedentes</b>	<b>11</b>
<b>3 Justificación</b>	<b>14</b>
<b>4 Objetivos</b>	<b>15</b>
4.1. Objetivo general . . . . .	15
4.1.1. Objetivos particulares . . . . .	15
<b>5 Área de estudio</b>	<b>16</b>
<b>6 Materiales y métodos</b>	<b>17</b>
6.1. Trabajo de Campo . . . . .	17
6.1.1. Muestreo y registro de parámetros fisicoquímicos . . . . .	17
6.2. Procesamiento de muestras en el laboratorio . . . . .	18
6.2.1. Concentración de las muestras de agua . . . . .	18
6.2.2. Cultivo monoxénico . . . . .	18
6.2.3. Cultivo axénico . . . . .	18
6.2.4. Identificación por morfología . . . . .	18

<b>7 Resultados y discusión</b>	<b>19</b>
7.1. Aislamiento de amibas de vida libre . . . . .	19
7.2. Identificación de amibas de vida libre . . . . .	21
7.3. Parámetros fisicoquímicos del agua . . . . .	27
7.3.1. Temperatura . . . . .	27
7.3.2. pH . . . . .	30
7.3.3. Oxígeno disuelto . . . . .	31
7.3.4. Conductividad . . . . .	32
7.3.5. Sólidos disueltos totales . . . . .	34
7.4. Presencia de amibas en el canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C.	35
<b>8 Conclusiones</b>	<b>38</b>
<b>9 Literatura citada</b>	<b>39</b>
<b>Anexo</b>	<b>49</b>
<b>Glosario</b>	<b>51</b>

### Índice de figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i> y <i>Acanthamoeba</i> spp. . . . .	9
Figura 2. Ubicación del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C.	16
Figura 3. Canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C. . . . .	17
Figura 4. Micrografías de quistes (Q) y trofozoítos (T) de las cepas de <i>Naegleria</i> y <i>Acanthamoeba</i> aisladas del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B.C.	23

## Índice de tablas

Tabla 1. Temperatura de aislamiento de <i>Acanthamoeba</i> y <i>Naegleria</i> . . . . .	19
Tabla 2. Valores morfométricos promedio de las amibas aisladas . . . . .	22
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos del agua del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B.C. . . . .	27
Tabla 4. Agar no nutritivo con <i>Enterobacter aerogenes</i> (NNE) . . . . .	49
Tabla 5. Medio Bactocasitona . . . . .	50
Tabla 6. Medio Chang . . . . .	50



## Lista de abreviaturas y parámetros fisicoquímicos

AVL	Amibas de vida libre
B.C.	Baja California
EAG	Encefalitis amibiana granulomatosa
FLA	Free-living amoebae
GICyMA	Grupo de Investigación de Conservación y Mejoramiento del Ambiente
LCR	Líquido cefalorraquídeo
MEAP	Meningoencefalitis amibiana primaria
N	North (Norte)
NNA	Non-nutrient agar medium with <i>Enterobacter aerogenes</i>
NNE	Medio agar no nutritivo con <i>Enterobacter aerogenes</i>
PBSGM	Medio Chang modificado
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Q	Quiste
QA	Queratitis amibiana
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	Sistema nervioso central
T	Trofozoíto
W	West (Oeste)
T	Temperatura
pH	Potencial de hidrógeno
OD	Oxígeno disuelto
SDT	Sólidos disueltos totales

## Resumen

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos ampliamente diseminados en la naturaleza. Entre ellas, los miembros de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* incluyen especies que pueden causar infecciones cerebrales fulminantes. La mayoría de los casos clínicos en México se refieren a la meningoencefalitis causada por *Naegleria fowleri* tras la exposición al agua de canales de riego en Mexicali, pero no se ha reportado ningún caso de encefalitis ni de queratitis por *Acanthamoeba* en esta región. En esta tesis se evaluó la presencia de amibas de vida libre de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* y su relación con algunos parámetros fisicoquímicos del agua del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali en Baja California. Se seleccionaron dos sitios del canal, se tomaron muestras de agua y de sedimento, en el mes de julio de 2019. Se registraron *in situ* los parámetros fisicoquímicos del agua: temperatura, pH, oxígeno disuelto, conductividad y sólidos disueltos totales. En medio NNE se cultivaron muestras de sedimento y se incubaron a 30 °C y 37° C. Después de filtrar las muestras de agua se cultivaron en las mismas condiciones y se identificaron morfológicamente. Se aislaron un total de 8 cepas, de las cuales seis corresponden a *Acanthamoeba* y dos a *Naegleria*. Se identificó morfológicamente a *Naegleria sp.* y a las especies *Acanthamoeba astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. rhyssodes* y *A. polyphaga*, además del hallazgo de *A. lugdunensis* en el Valle. Los parámetros fisicoquímicos del agua se encuentran dentro del rango óptimo para su crecimiento: temperatura de 32.6 y 32.5 °C, pH de 8.12 y 8.17, oxígeno disuelto de 2.76 y 9.2 mg/L, conductividad de 1119 y 1650  $\mu$ S/cm y sólidos disueltos totales de 800 y 767 ppm, en el sitio 1 y 2, respectivamente. La presencia de las amibas del grupo *Naegleria-Acanthamoeba* reportadas en este estudio son motivo para considerar al canal Pacífico como de alto riesgo para los usuarios, no solo porque se encontró a *Naegleria* sino porque todas las especies que se identificaron morfológicamente como *Acanthamoeba* tienen reportes de potencial patógeno.

## Abstract

Free-living amoebae (FLA) are protozoa widely disseminated in nature. Among them, members of the genera *Naegleria* and *Acanthamoeba* include species that can cause fulminant brain infections. Most clinical cases in Mexico refer to meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri* after exposure to water from irrigation canals in Mexicali, but no cases of *Acanthamoeba* encephalitis or keratitis have been reported in this region. In this thesis, the presence of free-living amoebas of the genera *Naegleria* and *Acanthamoeba* and their relationship with some physicochemical parameters of the water from the Pacific irrigation canal of the Valley of Mexicali in Baja California, was evaluated. Two canal sites were selected, water and sediment samples were taken in July 2019. The physicochemical parameters of the water were recorded *in situ*: temperature, pH, dissolved oxygen, conductivity and total dissolved solids. Sediment samples were cultured in NNA medium and incubated at 30 °C and 37 °C. After filtering, the water samples were cultured under the same conditions and morphologically identified. A total of 8 strains were isolated, of which six correspond to *Acanthamoeba* and two to *Naegleria*. *Naegleria sp.* and the species *Acanthamoeba astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes* and *A. polyphaga*, in addition to the finding of *A. lugdunensis* in the Valley. The physicochemical parameters of the water are within the optimal range for its growth: temperature of 32.6 and 32.5 °C, pH of 8.12 and 8.17, dissolved oxygen of 2.76 and 9.2 mg/L, conductivity of 1119 and 1650  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , and total dissolved solids of 800 and 767 ppm in the water from sites 1 and 2, respectively. The presence of the amoebae of the *Naegleria-Acanthamoeba* group reported in this study is reason to consider the Pacific canal as high risk for users, not only because *Naegleria* was found but also because all the species that were morphologically identified as *Acanthamoeba* have reports of pathogenic potential.

# 1 Introducción

## 1.1. Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre son protistas aerobios, unicelulares y eucariotas de naturaleza ubicua. Estas amibas son microorganismos cosmopolitas que viven en ambientes húmedos como el suelo o agua, desde ahí pueden llegar arrastradas por escurrimientos a los sistemas acuáticos, además se han encontrado en el aire, como otra forma de dispersión en el medio ambiente (Rivera *et al.*, 1987; Rivera *et al.*, 1991; Bonilla y Ramírez, 2019). Dado que no están adaptadas al parasitismo, se les denomina anfizoicas por su capacidad de existir como organismos de vida libre y sólo ocasionalmente como endoparásitos en el ser humano y en los animales (Page, 1988; John, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997). Entre ellas, algunos géneros incluyen especies que son agentes causantes de infecciones cerebrales mortales en humanos, como *Naegleria* y *Acanthamoeba* (Siddiqui *et al.*, 2016).

## 1.2. Aspectos ecológicos y médicos

El hábitat de las amibas es diverso, han sido aisladas del suelo, polvo, aire, agua dulce, salada, tratada, residual, termal y embotellada, piscinas, canales de riego, grifos domésticos, filtros de unidades de calefacción, ventilación, aire acondicionado, torres de enfriamiento, acuarios domésticos, piscinas de hidroterapia hospitalarias, sistemas de irrigación dental, estaciones de lavado de ojos, soluciones oftálmicas y lentes de contacto (Sawyer *et al.*, 1977; Rivera *et al.*, 1987; De Jonckheere, 1991; Martínez y Visvesvara, 1997; Bonilla *et al.*, 1999; Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Visvesvara *et al.*, 2007; Gertiser, 2010; Visvesvara, 2013).

Son imprescindibles en el circuito microbiano de las comunidades naturales del suelo y acuáticas, asociándose y alimentándose por fagocitosis de bacterias, cianobacterias, diatomeas, otros protozoos y hongos mediante pseudópodos (Sawyer, 1980), y a través de pinocitosis pueden vivir en forma axénica por medio de la captación de nutrientes disueltos

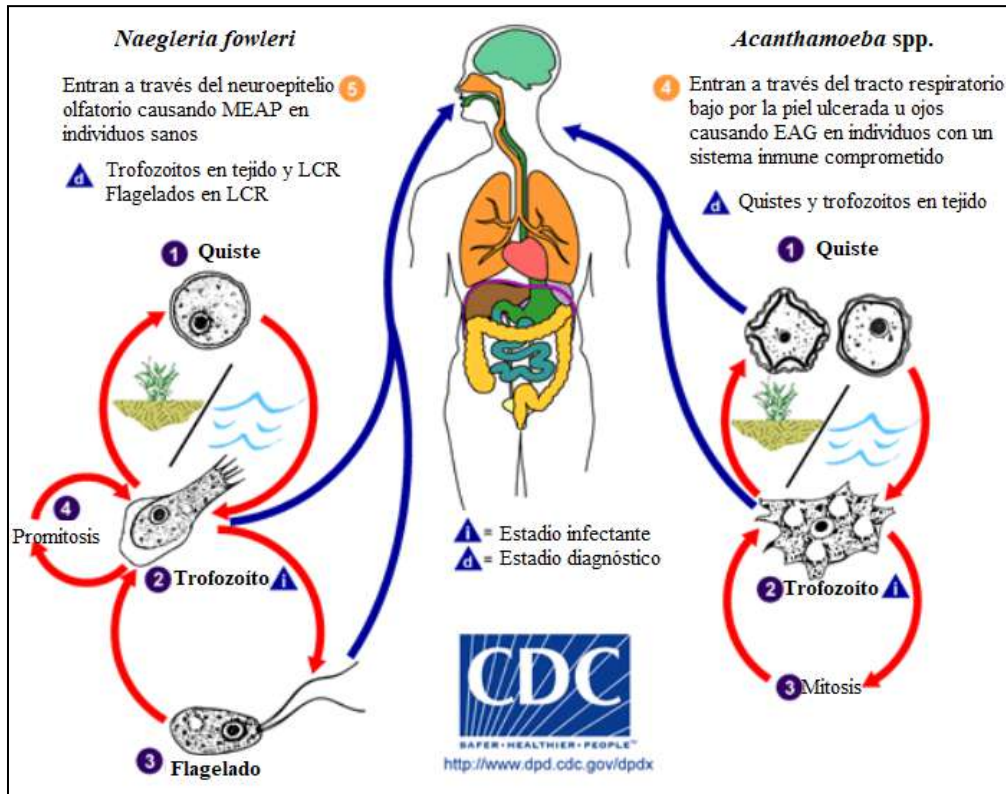
en el ambiente (Khan, 2006). También estimulan el incremento en la tasa de transformación bacteriana del P y del N a formas aprovechables para las plantas, lo que genera una mayor producción de biomasa vegetal (Tyndall *et al.*, 1989).

Los miembros de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* han cobrado principal relevancia ya que constituyen especies que se comportan como parásitos patógenos y oportunistas capaces de establecer infecciones parasitarias en el SNC de animales, incluidos gorilas, monos, perros, ovinos, bovinos, caballos, canguros, aves, reptiles, anfibios, peces e incluso invertebrados (Khan, 2006; Visvesvara y Maguire, 2006; Visvesvara *et al.*, 2007).

En el ser humano provocan afecciones graves en el SNC de personas sanas o inmunodeficientes, como lo es la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), una infección fulminante de rápida progresión, producida por *Naegleria fowleri*, o la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), una enfermedad crónica de progresión lenta producida por *Acanthamoeba* que afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos (Martinez y Visvesvara, 1997; Marciano-Cabral y Cabral, 2007). *Acanthamoeba* también provoca queratitis amibiana (QA), una inflamación crónica de la córnea que amenaza la visión. Además, produce acantamebiasis cutánea, una infección oportunista de la piel que produce nódulos y úlceras en el tronco o extremidades y neumonitis, una importante causa de mortalidad tras el trasplante de pulmón (Visvesvara, 2013; Bonilla y Ramírez, 2019).

La MEAP se presenta principalmente en jóvenes sanos que refieren el antecedente de exposición a agua estancada o contaminada, al desarrollar actividades recreativas dentro de cuerpos de agua generalmente durante las épocas cálidas, mientras que *Acanthamoeba* al ser oportunista se puede desarrollar en cualquier época del año (Visvesvara *et al.*, 2007). La infección del cerebro (Fig. 1) ocurre después de que las amibas alcanzan la cavidad nasal e invaden la mucosa olfatoria, penetran el epitelio nasal, migran a través de los nervios olfatorios atravesando la placa cribiforme y llegan al neuroepitelio olfatorio para invadir al cerebro (Schuster y Visvesvara, 2004). Las ulceraciones en la piel y los ojos suelen ser la

puerta de entrada de las amibas y una vez que ingresan se dispersan por vía hematogena al SNC de los hospederos (Martinez y Visvesvara, 1997; Clarke y Niederkorn, 2006).



**Figura 1.** Ciclo de vida de *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* spp. (CDC, 2019).

Recientemente, han generado interés debido a su capacidad para tener asociaciones endosimbióticas con bacterias (*Legionella* spp., *Mycobacterium avium*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia* spp., *Helicobacter pylori*, *Afpia felis* y *Escherichia coli*) y virus (adenovirus, enterovirus y mimivirus) patógenos para el humano, al ofrecerles mecanismos de dispersión y protección ante biocidas ambientales y antibióticos aplicados al hospedero (Greub y Raoult, 2004; Bonilla y Ramírez, 2019).

### **1.3. Estado actual de *Naegleria* y *Acanthamoeba* en Mexicali, B. C.**

En México se han notificado alrededor de 11 casos de MEAP causada por *N. fowleri* entre 1984 y 2007, siendo la mayoría provenientes de Mexicali, B. C. (Rodríguez, 1984; Valenzuela *et al.*, 1984; Lopez-Corella *et al.*, 1989; Vargas-Zepeda *et al.*, 2005; Cervantes-Sandoval *et al.*, 2007), pero aún no se ha reportado ningún caso de EAG ni de QA por *Acanthamoeba* en esta entidad.

El Valle de Mexicali se caracteriza por un ambiente desértico y predominan las altas temperaturas, especialmente durante los meses de verano. Debido a la falta de instalaciones recreativas disponibles, las condiciones extremas incitan a que la población haga uso de los canales de riego para refrescarse, lo que representa un gran riesgo para la salud, ya que *Naegleria fowleri* es termofílica y su temperatura óptima de proliferación puede alcanzar los 40 °C o incluso los 45 °C (Visvesvara *et al.*, 2007). Por tanto, la tasa de infección es mayor y más probable durante la temporada de verano (Visvesvara, 2013; De Jonckheere, 2011). Por otro lado, se ha prestado muy poca atención a la presencia de amibas del género *Acanthamoeba*, la cual incluye también especies patógenas que responden a las condiciones climáticas que prevalecen en el Valle.

En la actualidad los medios locales siguen notificando los nuevos casos de infecciones amibianas en los canales de riego de Mexicali, desafortunadamente no se reportan en la literatura científica y muchos casos pasan inadvertidos al diagnóstico clínico y de laboratorio.

## 2 Antecedentes

Lares-Villa *et al.* (1993) reportaron la identificación de seis cepas de *Naegleria*, cinco de pacientes con MEAP y uno de una muestra de agua de un canal artificial en el que nadaron las víctimas antes de contraer la enfermedad. Los casos ocurrieron en agosto y septiembre de 1990, en el Valle de Mexicali, Baja California. Encontraron formas tróficas de amibas durante la observación microscópica directa de muestras de LCR de los pacientes. Los valores de temperatura y pH fueron de 28 a 32 °C y de 8.3 a 8.6, respectivamente. La técnica de inmunofluorescencia indirecta de anticuerpos y el enfoque isoeléctrico permitieron identificar a los aislados como *N. fowleri*, mientras que la prueba de patogenicidad en ratones confirmó su virulencia.

Rivera *et al.* (1993) aislaron AVL de piscinas y tinas de fisioterapia en la Ciudad de México. Identificaron los aislamientos por morfología y por enfoque isoeléctrico de proteínas totales e isoenzimas en agarosa. Aislaron veintinueve cepas amibianas y los géneros más frecuentes fueron *Acanthamoeba* (con cuatro cepas patógenas), *Vahlkampfia*, *Hartmannella* y *Naegleria*. La temperatura de los cuerpos de agua analizados fue de 14 a 39 °C, pH de 5.3 a 9.3 y los niveles de cloro libre residual fueron de 0 a 7.0 mg/ml (no recuperaron AVL de piscinas con niveles de cloruro de más de 5.31 mg/ml). Aislaron a las cepas con mayor frecuencia en primavera y verano.

Lares-Villa *et al.* (2001) realizaron un estudio en 3 tinas de hidroterapia, 3 jacuzzis y 9 piscinas de uso recreativo en Hermosillo, Sonora. Identificaron las cepas con base en criterios morfológicos, fisiológicos y de patogenicidad. Los jacuzzis y cinco piscinas de uso recreativo fueron positivas al aislamiento de amibas de vida libre. Aislaron 42 cepas e identificaron 31, distribuidas en 5 géneros diferentes. Los valores de temperatura y pH fueron de 25 a 44 °C y de 6.8 a 8.0, respectivamente. *Acanthamoeba* fue el más frecuente y destaca la presencia de *A. polyphaga*, *A. astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. royreba* y *A. quina*, reconocidas como patógenas, seguido por *Hartmannella*, *Willaertia*, *Platyamoeba* y *Naegleria*.



Ramírez *et al.* (2009) determinaron la calidad microbiológica (coliformes totales, coliformes fecales y AVL) en trece pozos del acuífero de Zacatepec, Morelos. Todos los pozos presentaron contaminación por coliformes totales y los coliformes fecales estuvieron ausentes en cuatro de los pozos. La contaminación más alta fue en abril y julio. Detectaron AVL en todos los pozos, con mayor incidencia en diciembre y enero. Los valores de pH, temperatura y OD fueron de 6.7 a 7.3, de 25.1 a 28.0 °C y de 2.9 a 4.8 mg/L, respectivamente. Aislaron 22 especies pertenecientes a 16 géneros, el más frecuente fue *Hartmannella*. De las amibas potencialmente patógenas, detectaron a *Acanthamoeba* con baja frecuencia.

Ramírez *et al.* (2012) determinaron la presencia de AVL en agua de pozos del municipio de Tizayuca, Hidalgo. Detectaron amibas en todos los pozos, encontraron 13 especies de 9 géneros: *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Mayorella*, *Platyamoeba*, *Rosculus*, *Thecamoeba*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Vexillifera*, siendo *Hartmannella* la que se presentó con mayor frecuencia. De las AVL reportadas como patógenas, solamente aislaron la especie *Acanthamoeba polyphaga*, pero con baja frecuencia. El pH fue de 6.37 a 8.27, la temperatura osciló entre 24 y 32 °C y el valor más bajo de OD fue de 2.4 a 5.0 mg/L. Determinaron que no existe riesgo en consumir el agua, pero debe de ser desinfectada para evitar problemas de salud a los usuarios.

Bonilla-Lemus *et al.* (2014) evaluaron la presencia y distribución de amibas en arroyos de la Cuenca de México. Identificaron 120 AVL pertenecientes a 18 géneros. Los géneros más frecuentes fueron *Vannella*, *Rosculus* y *Acanthamoeba*. La temperatura, pH y conductividad fueron de 4.9 a 16.9 °C, de 6.0 a 8.0 y de 63 a 76 µS/cm, respectivamente. La frecuencia de *Naegleria* y *Acanthamoeba* fue baja y sólo tres aislamientos de *Acanthamoeba* fueron invasivos en ratones y se recuperaron de los cerebros.

Andrade *et al.* (2015) identificaron amibas de vida libre obtenidas de ríos de la Cuenca de México y las relacionaron con algunos parámetros fisicoquímicos. Aislaron 38 cepas de las cuales se identificaron 12 especies, siendo *A. triangularis*, *A. polyphaga* y *Naegleria sp.*

potencialmente patógenas, sin embargo, la prueba de patogenicidad resultó negativa. Los parámetros fisicoquímicos del agua fueron: temperatura de 6.6 a 16.7 °C, pH de 6.6 a 7.7, OD de 6 a 10 mg/L y SDT de 38 a 221 ppm. La mayor riqueza específica estuvo asociada con los valores más altos de temperatura.

Ramírez *et al.* (2016) determinaron la presencia y distribución de AVL en ocho manantiales de agua potable y recreativa en Morelos, México. De las 48 muestras, 41 resultaron positivas para amibas e identificaron 15 géneros, siendo *Vermamoeba* y *Naegleria* los de mayor frecuencia y distribución. La temperatura, el pH y el OD estuvieron en rangos de 17 a 32.4 °C, 5.8 a 7.1 y 0.7 a 5.8 mg/L, respectivamente. Los coliformes totales variaron de 0 a 2370 ufc/100ml y los coliformes fecales de 0 a 1315 ufc/100ml. No encontraron una relación estadística significativa entre AVL y bacterias coliformes, pero encontraron concentraciones más altas de coliformes totales y fecales en dos manantiales, donde obtuvieron los números más altos de aislamientos de amibas.

Robles *et al.* (2019) evaluaron la calidad microbiológica y fisicoquímica de siete piscinas de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. Bacteriológicamente todas las piscinas estuvieron dentro de la norma para coliformes fecales, sin embargo, encontraron *Pseudomonas aeruginosa* en tres piscinas. Aislaron cinco especies de AVL, de las cuales *Acanthamoeba polyphaga* es la única reportada con potencial patógeno. La temperatura del agua fue de 18 a 33 °C, pH de 6.2 a 8.5, OD de 5.5 a 9.7 mg/L y SDT de 303 a 3490 ppm.

Bonilla-Lemus *et al.* (2020) evaluaron la presencia de especies de *Naegleria* en canales de riego en el Valle de Mexicali. Aislaron e identificaron morfológicamente once cepas de *Naegleria*. Cuatro aislamientos mataron al 100% de los ratones en los primeros diez días y recuperaron amibas del cerebro y pulmones. Los parámetros fisicoquímicos del agua fueron: temperatura de 16 a 20 °C, pH de 7.3 a 7.7, OD de 3.6 a 4.2 mg/L y conductividad de 1400 a 1800 µS/cm. Los resultados revelaron la presencia de *Naegleria* en todos los canales muestreados. La identificación molecular confirmó la presencia de cinco especies diferentes: *N. fowleri*, *N. australiensis*, *N. gruberi*, *N. clarki* y *N. pagei*.

### 3 Justificación

El Valle de Mexicali se caracteriza por un ambiente desértico que alcanza los 50 °C en verano, esto conlleva a un aumento de la temperatura del agua de los canales de riego y la consecuente proliferación de amibas patógenas, que viven y se multiplican en aguas cálidas.

Debido a las temperaturas extremas y a que no hay instalaciones recreativas disponibles en el Valle, la población hace usos de los canales de riego como sitios acuáticos recreativos. En tal sentido, se seleccionó esta área porque la mayoría de los casos clínicos en México se han informado en esta región, pues existe una asociación de la MEAP producida por *Naegleria* con un historial de natación en estos canales durante el verano, sin embargo, aún no se han reportado casos de EAG ni de QA por *Acanthamoeba* que es un género con potencial patógeno ampliamente diseminado en el ambiente.

Resulta fundamental el estudio de las condiciones que favorecen la presencia de amibas del grupo *Naegleria-Acanthamoeba* presentes en el canal de riego Pacifico, para evitar actividades recreativas en el canal y así prevenir y controlar posibles brotes de infecciones en la zona.

## **4 Objetivo**

### **4.1. Objetivo general**

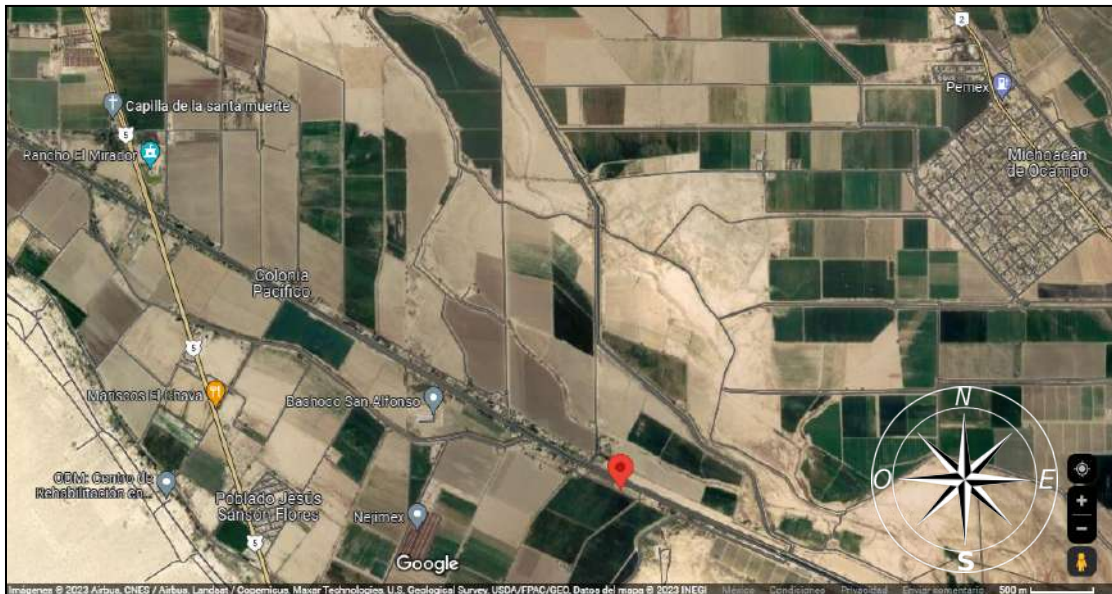
Evaluar la presencia de amibas de vida libre de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* y su relación con algunos parámetros fisicoquímicos del agua del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C.

#### **4.1.1. Objetivos particulares**

- Aislar e identificar morfológicamente las amibas de vida libre de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* provenientes del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C.
- Correlacionar los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, pH, oxígeno disuelto, conductividad y sólidos disueltos totales) con la presencia de amibas.

## 5 Área de estudio

El Valle de Mexicali se encuentra en Baja California, Norte de la República Mexicana. El Valle se localiza en el noreste de la entidad y tiene una superficie aproximada de 3,709 km<sup>2</sup>. De acuerdo con la clasificación climática de Köppen, modificada por García (2004), predomina el tipo de clima BW(h')(x')(e'), el cual corresponde a un clima seco muy árido, cálido con temperatura media anual mayor a 22 °C. La precipitación media anual no supera los 55 milímetros. El relieve topográfico es muy bajo, siendo el límite oeste la parte más elevada con un promedio de 21 metros sobre el nivel del mar. Los suelos que dominan son los regosoles, vertisoles y xerosoles, fundamentales para el uso agrícola (Fig. 2). El Valle se abastece del río Colorado (agua superficial), de los acuíferos del Valle de Mexicali y del Valle de San Luis Río Colorado (agua subterránea) (CONAGUA, 2011).



**Figura 2.** Ubicación del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C. (Google Maps, 2022).

El Valle tiene un sistema agrícola intensivo que depende de un sistema de riego que se origina en el río Colorado, este sistema de riego consta de una red de embalses y canales, entre ellos se encuentra el canal de riego Pacífico (32°26'37.0" N, 115°20'35.0" W) (Fig. 3). El muestreo se realizó en dos sitios de dicho canal de uso agrícola y humano: el sitio 1 se caracteriza por estar cerca de la compuerta, a 600 m de la carretera San Felipe; el sitio 2 es

un canal a 2 km de la carretera San Felipe (dirección al Canal Ejido Michoacano). Ambos canales tienen aproximadamente 2 metros de profundidad.



**Figura 3.** Canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C.

## **6 Materiales y métodos**

### **6.1. Trabajo de Campo**

#### **6.1.1. Muestreo y registro de parámetros fisicoquímicos**

Las muestras de agua se obtuvieron en dos sitios del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C. en el mes de julio de 2019, aproximadamente a 2 km de distancia entre los sitios de muestreo. En recipientes estériles, se tomó una muestra de agua de 250 ml del sitio 1 (se agregó un poco de sedimento del mismo sitio) y 2. La temperatura del agua, pH, OD, conductividad ( $K_{25}$ ) y SDT se midieron *in situ* utilizando el equipo multiparamétrico LV, SensoDirect 150. Estos análisis están adaptados de métodos estándar para el examen de agua y aguas residuales (APHA, AWWA, WEF, 1995). Las muestras se transportaron a temperatura ambiente al laboratorio de Microbiología Ambiental del Grupo de Investigación de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (GICyMA).

## **6.2. Procesamiento de muestras en el laboratorio**

### **6.2.1. Concentración de las muestras de agua**

Para concentrar las muestras de agua, se utilizó la técnica de filtración, con filtros de membranas (millipore) de 3 micras de diámetro del poro, para filtrar 100 ml de cada muestra de agua.

### **6.2.2. Cultivo monoxénico**

Después de la filtración por duplicado, las superficies de las membranas se colocaron sobre el medio agar no nutritivo adicionado con *Enterobacter aerogenes* (NNE). Con una pipeta Pasteur estéril, se tomaron aproximadamente 0.3 gramos del frasco que contenía la muestra de sedimento con poco de agua y se distribuyeron directamente en la superficie del medio NNE. Posteriormente se incubaron de forma invertida en una bolsa de plástico (para disminuir la desecación). Una de las cajas Petri se incubó a 37 °C y la otra a 30 °C. Después de 48 horas y durante una semana las placas se revisan con un microscopio invertido para verificar el crecimiento amibiano.

### **6.2.3. Cultivo axénico**

Tras la obtención de los cultivos amibianos libres de otros microorganismos, se eligió el sitio del medio NNE con mayor crecimiento de amibas y se colocaron en medios líquidos Bactocasitona y medio PBSGM (Rivera *et al.* 1987) con 10% de suero de ternera (Anexo) y se incubaron a la temperatura de aislamiento.

### **6.2.4. Identificación por morfología**

Se observaron preparaciones en fresco de cada muestra en un microscopio óptico equipado con contraste de fases (Zeiss K7 con objetivo 40×) para medir 50 trofozoítos y 50 quistes de cada cepa y se identificaron por medio de las claves dicotómicas de Page (1988) y Pussard y Pons (1977).

## 7 Resultados y discusión

### 7.1. Aislamiento de amibas de vida libre

Se aislaron 8 cepas de amibas de vida libre, de las cuales 6 corresponden al género *Acanthamoeba* y 2 al género *Naegleria*. De las 6 cepas de *Acanthamoeba*, tres se recuperaron a 37 °C y el resto a 30 °C, mientras que las dos cepas de *Naegleria* se obtuvieron a 37 °C. El sitio 1 presentó el mayor número de aislados (Tabla 1), siendo muestras correspondientes al agua con sedimento.

**Tabla 1.** Temperatura de aislamiento de *Acanthamoeba* y *Naegleria*

Género	Clave de la cepa	Sitio	37 °C	30 °C
<i>Acanthamoeba</i>	1 (37)	1	×	
	1 agua (37)	1	×	
	1 (30)	1		×
	1 agua (30)	1		×
	2 (37)	2	×	
	2 (30)	2		×
<i>Naegleria</i>	1 (37) Nae	1	×	
	2 (37) Nae	2	×	

\*Clave de las cepas: 1 (sedimento del sitio 1), 1 agua (agua del sitio 1) y 2 (agua del sitio 2).

Dado que la mayoría de las cepas que se reportaron en este estudio se aislaron a 37 °C, es probable que haya representantes patógenos de estos géneros en el canal de riego. Se ha demostrado que las cepas que son infecciosas para los humanos y otros mamíferos son termofílicas, por lo que se desarrollan a temperaturas arriba de 30 °C (Schuster y Visvesvara, 2004) y con el aumento de temperatura previsto como resultado del calentamiento global, se prevé un incremento de casos de MEAP y de EAG, pues el aumento en la temperatura del agua creará nichos ideales para estas amibas (Cogo *et al.*, 2004).



Las amibas termofílicas como *N. fowleri*, pueden sobrevivir a temperaturas de hasta 45 °C. Esta cualidad preadapta la especie a la temperatura corporal de los mamíferos, sin embargo, *N. lovaniensis* también es termotolerante y no es patógena en animales de experimentación (Visvesvara *et al.*, 2007). Por tanto, la termotolerancia no determina la capacidad de infección de *Naegleria*. Esto coincide con un estudio de amibas (incluidas *Naegleria* y *Acanthamoeba*) aisladas de estanques en Oklahoma durante los meses de verano, donde reportaron que el 90% eran termotolerantes, de las cuales sólo el 2% eran patógenas para los ratones (John y Howard, 1996), en ese sentido, se sostiene lo que Schuster y Visvesvara (2004) mencionan, acerca de que todas las amibas patógenas son termotolerantes, pero no todas las termotolerantes son patógenas.

En consecuencia, para verificar el potencial patógeno de las amibas del canal de riego en estudios posteriores, es importante probar su capacidad de proliferación a 43 °C, sin embargo, la prueba de tolerancia a la temperatura no es suficiente para determinar su patogenicidad y por ello, los aislamientos identificados morfológicamente como *Naegleria* y *Acanthamoeba* se deben someter a un ensayo de PCR para su identificación a nivel de especie, así como a pruebas de patogenicidad, en las cuales, para confirmar que los ratones murieron debido a la MEAP o la EAG, se deben recuperar amibas del cerebro y otros órganos (Bonilla-Lemus *et al.*, 2020).

De acuerdo con Schuster y Visvesvara (2004), los factores principales en la distribución de las amibas en el agua son la presencia de un suministro de alimento bacteriano disponible y las aguas cálidas. En conjunto, favorecen el crecimiento y la propagación de las amibas, particularmente aquellas cepas que son termófilas como las que se reportaron en este estudio. Khan, (2006) reportó que las biopelículas proporcionan nichos atractivos para las amibas, ya que satisfacen sus requisitos nutricionales y brindan resistencia a los desinfectantes, en ese sentido, es posible que en este estudio las aguas cálidas del canal y el sedimento del sitio 1, favorezcan la formación de estructuras muy semejantes a las biopelículas y que funcionen de manera similar, al estar aportando nutrientes que pueden estimular la transformación de las amibas en su forma vegetativa y también las puede estar

manteniendo viables en el ambiente en forma de quiste (Khan, 2006). Por dicha razón se debe prevenir la exposición al agua del canal de riego pues el sedimento que se encuentra en el canal puede proporcionar los nutrientes que favorecen el desarrollo de la forma infectiva de las amibas, lo que a su vez puede aumentar el riesgo de desarrollar alguna patología.

Stahl y Olson (2021) informaron que varios taxones eucariotas se han correlacionado con la presencia de *N. fowleri* en biopelículas. Morgan *et al.* (2016) mencionaron una coocurrencia significativa de *N. fowleri* con *Stenostomum* (una familia de platelmintos de agua dulce), y *Monogononta* (una clase de rotíferos). Puzon *et al.* (2017) también informaron que una clase de rotíferos (*Philodinidae*), se encontraba con mayor frecuencia con *N. fowleri*, al igual que los miembros del filo *Nematoda* y encontraron diferentes AVL en biopelículas con comunidades eucariotas distintivas. La identificación de una clase de rotíferos positivamente correlacionada con la presencia de *N. fowleri* es interesante, ya que se ha planteado la hipótesis de que los rotíferos se alimentan de *Naegleria* (Jamerson *et al.*, 2008). Las biopelículas pueden ser el reservorio de gran variedad de microorganismos, incluidos diferentes taxones como los que se mencionaron previamente que pueden ser indicadores útiles de la presencia de AVL específicos, incluida *N. fowleri* y *Acanthamoeba*.

## **7.2. Identificación de amibas de vida libre**

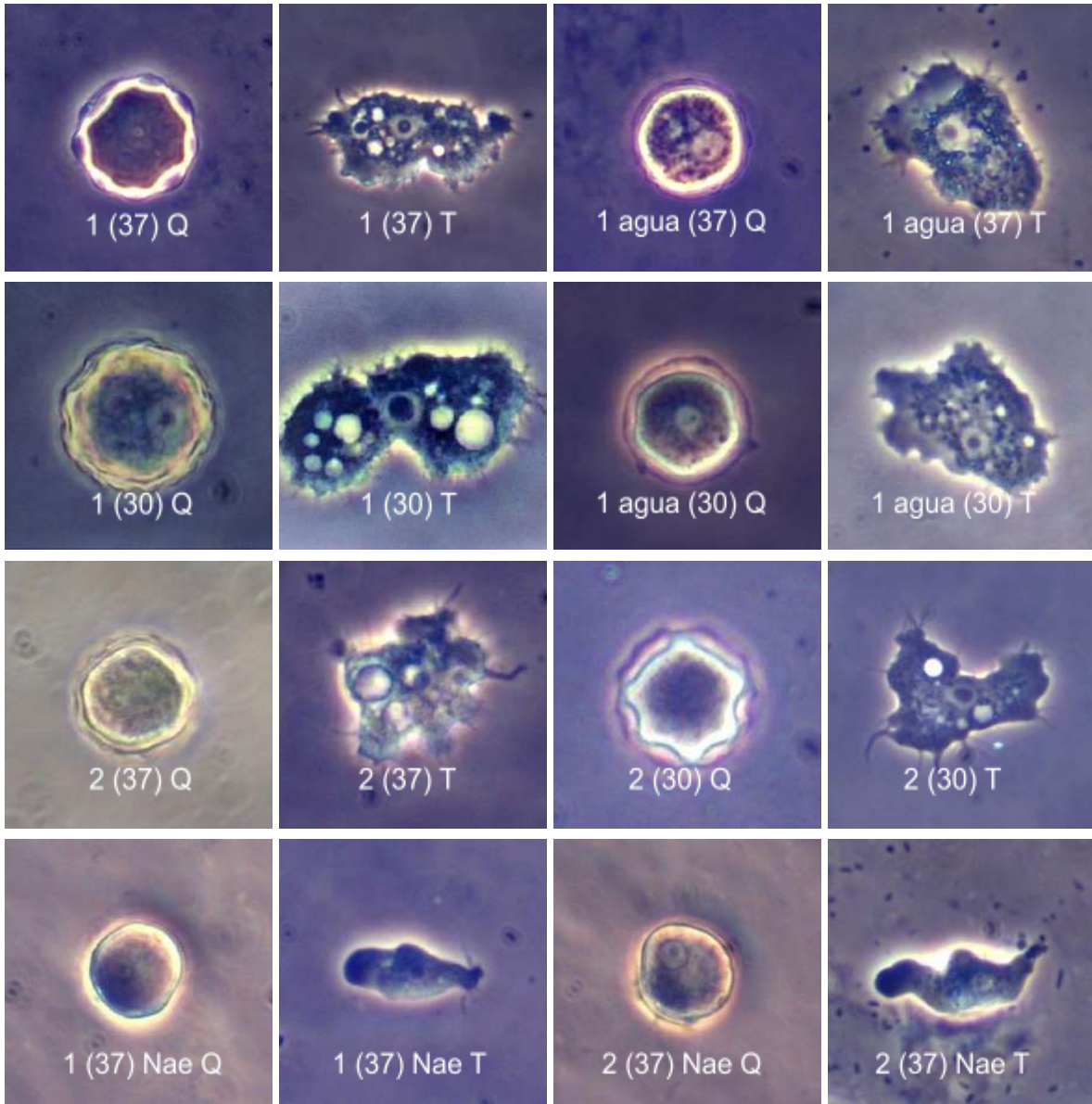
De las amibas aisladas se identificaron los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* por medio de la medición de 50 quistes, 50 trofozoítos y 50 flagelados (en el caso de *Naegleria*) de cada cepa. En la Tabla 2 se observa el diámetro promedio de las amibas. Los valores de los quistes de *Acanthamoeba* oscilaron entre 14.46 y 23.64  $\mu\text{m}$  y los trofozoítos entre 25.80 y 33.76  $\mu\text{m}$ , mientras que los quistes de *Naegleria* oscilaron entre 11.79 y 14.37  $\mu\text{m}$ , los trofozoítos entre 21.66 y 23.75  $\mu\text{m}$  y los flagelados entre 23.77 y 24.51  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 2.** Valores morfométricos promedio de las amibas aisladas del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C.

Género	Clave de la cepa	Quiste (µm) x <sup>-</sup>	Trofozoíto (µm) x <sup>-</sup>	Flagelado (µm) x <sup>-</sup>	Identificación morfológica
<i>Acanthamoeba</i>	1 (37)	23.64	25.80	–	<i>A. astronyxis</i>
	1 agua (37)	16.50	25.83	–	<i>A. culbertsoni</i>
	1 (30)	16.57	32.60	–	<i>A. rhyodes</i>
	1 agua (30)	14.46	23.60	–	<i>A. polyphaga</i>
	2 (37)	15.40	29.14	–	<i>A. lugdunensis</i>
	2 (30)	14.89	33.76	–	<i>A. lugdunensis</i>
<i>Naegleria</i>	1 (37) Nae	11.79	21.66	24.51	<i>Naegleria sp.</i>
	2 (37) Nae	14.37	23.75	23.77	<i>Naegleria sp.</i>

En este trabajo se realizó la identificación morfológica de los aislamientos de *Acanthamoeba* a nivel de especie, debido a que el quiste de casi todas las especies muestran características distintivas (Pussard y Pons, 1977; Page, 1988), pero no pasó lo mismo con los aislamientos de *Naegleria*, que sólo se logró identificar a nivel de género (Fig. 4).

Se identificó morfológicamente a *Naegleria sp.* y a las especies *Acanthamoeba astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. polyphaga* y *A. lugdunensis* (Tabla 2). En el sitio 1 (agua y sedimento) se aisló a *A. astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. polyphaga* y *Naegleria sp.* En el sitio 2 (agua) se aisló a *A. lugdunensis* y *Naegleria sp.* Es importante mencionar que aunque la identificación morfológica nos permite conocer la posible especie, es fundamental someter a los aislamientos a un ensayo de PCR para verificar su identificación a nivel de especie. A continuación se muestran las micrografías de quistes y trofozoítos de las cepas aisladas así como la descripción de algunas de las características que permitieron la identificación morfológica de las amibas.



**Figura 4.** Micrografías de quistes (Q) y trofozoítos (T) de las cepas de *Naegleria* y *Acanthamoeba* aisladas del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C. Identificación morfológica: *A. astronyxis*: 1 (37) Q y 1 (37) T. *A. culbertsoni*: 1 agua (37) Q y 1 agua (37) T. *A. rhyodes*: 1 (30) Q y 1 (30) T. *A. polyphaga*: 1 agua (30) Q y 1 agua (30) T. *A. lugdunensis*: 2 (37) Q y 2 (37) T. *A. lugdunensis*: 2 (30) Q y 2 (30) T. *Naegleria* sp.: 1 (37) Nae Q y 1 (37) Nae T. *Naegleria* sp.: 2 (37) Nae Q y 2 (37) Nae T. Microscopio óptico (40×).

*Acanthamoeba astronyxis* (cepa 1 (37)) se caracterizó por presentar grandes trofozoítos y quistes, con un valor promedio de 25.80 y 23.64  $\mu\text{m}$ , respectivamente. El ectoquiste y el endoquiste están muy separados y se diferencian fácilmente. El ectoquiste es ligeramente arrugado y el endoquiste posee una forma más o menos estrellada que tiene de cinco a siete brazos. El endoquiste se encuentra con el ectoquiste en los extremos de los brazos y el opérculo se encuentra al nivel del ectoquiste (Fig. 4) (Pussard y Pons, 1977; Visvesvara, 1991).

*Acanthamoeba culbertsoni* (cepa 1 agua 37) tuvo quistes con un diámetro promedio de 16.50  $\mu\text{m}$  y trofozoítos de 25.83  $\mu\text{m}$ . El ectoquiste es delgado y está suavemente ondulado. El endoquiste se caracteriza por ser redondo y el núcleo se aprecia fácilmente (Fig. 4) (Pussard y Pons, 1977; Visvesvara, 1991).

*Acanthamoeba rhysodes* (cepa 1 (30)) midió un diámetro promedio de 16.57  $\mu\text{m}$  (quiste) y 32.60  $\mu\text{m}$  (trofozoíto). El ectoquiste y el endoquiste están muy juntos, razón por la cual no se diferencian fácilmente. El ectoquiste es delgado y está arrugado. El endoquiste es ligeramente estrellado y los brazos no están bien definidos. El opérculo se aprecia en la unión del endoquiste y el ectoquiste (Fig. 4) (Pussard y Pons, 1977; Visvesvara, 1991).

*Acanthamoeba polyphaga* (cepa 1 agua 30) presentó quistes y trofozoítos pequeños que en promedio midieron 14.46 y 23.60  $\mu\text{m}$ , respectivamente. El ectoquiste y el endoquiste están muy separados. El ectoquiste es grueso y rugoso, el endoquiste es poligonal y en general los brazos no están bien desarrollados. También se pudo apreciar el núcleo (Fig. 4) (Pussard y Pons, 1977; Visvesvara, 1991).

*Acanthamoeba lugdunensis* (cepa 2 (37)) midió un diámetro promedio de 15.40  $\mu\text{m}$  (quiste) y 29.14  $\mu\text{m}$  (trofozoíto) mientras que el quiste y trofozoíto de la cepa 2 (30) midió 14.89 y 33.76  $\mu\text{m}$ , respectivamente. El ectoquiste de ambas cepas se caracterizó por ser

rugoso, el endoquiste poligonal y tenían casi el mismo número de brazos, de entre 3 y 7 (Fig. 4) (Pussard y Pons, 1977; Yu, 2004).

El diámetro promedio de los quistes, trofozoítos y flagelados de *Naegleria sp.* (cepa 1 (37) Nae) fueron de 11.79, 21.66 y 24.51  $\mu\text{m}$ , respectivamente y el de la cepa 2 (37) Nae fueron de 14.37, 23.75 y 23.77  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Ambas cepas presentaron el estadio flagelar. Fueron visibles de 1 a 3 poros en los quistes. En ambas cepas se visualizó el citoplasma granular, un núcleo bien definido y el lobópodo. Además se observaron los movimientos eruptivos característicos del género (Fig. 4) (Page, 1988).

La capacidad de *Naegleria* y *Acanthamoeba* para cambiar de fenotipo y formar quistes, resulta conveniente para su patogénesis, pues esta estructura le permite sobrevivir en condiciones ambientales extremas (Visvesvara *et al.*, 2007), como las que caracterizan al Valle de Mexicali. Cuando las amibas se enfrentan a tensiones ambientales como falta de alimento, aumento de la osmolaridad, temperaturas y pH extremos, inducen la transformación de los trofozoítos a la etapa de quiste. En términos simples, el trofozoíto mantiene una actividad metabólica mínima y se encierra dentro de una capa resistente. Más precisamente, durante la etapa de enquistamiento, el exceso de comida, agua y partículas son expulsados y el trofozoíto se condensa en una estructura redondeada (prequiste), que madura en un quiste de doble pared, la pared exterior sirve como un caparazón para ayudar a que el parásito sobreviva en condiciones hostiles (Khan, 2006; Siddiqui y Khan, 2012).

Aunque el quiste de *Naegleria* es resistente al estrés ambiental (por ejemplo, la desecación), es más frágil que el quiste de *Acanthamoeba*, que contiene celulosa en la pared, lo que le confiere mayor resistencia en condiciones adversas (Visvesvara *et al.*, 2007), eso explicaría la presencia de *Acanthamoeba* en los dos sitios del canal, sin embargo, aunque el quiste de *Naegleria* es más lábil, no limitó su presencia en ambos sitios.

Es importante tener en cuenta que tanto *Naegleria* como *Acanthamoeba* son organismos de vida libre que se encuentran comúnmente en ambientes acuáticos naturales (Page, 1967; Rivera *et al.*, 1989; Rivera *et al.*, 1991; Khan, 2006; Marciano-Cabral y Cabral, 2007; Siddiqui *et al.*, 2016). Sin embargo, también pueden sobrevivir en medios artificiales, como los sistemas de distribución de agua o los canales de riego, donde pueden ser agentes causantes de unas infecciones cerebrales mortales en humanos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Bonilla-Lemus *et al.* 2020). En tal sentido, la presencia de estas especies en los dos sitios del canal de riego Pacífico, indica la naturaleza ubicua de estos microorganismos, lo que a su vez, proporciona a las amibas un acceso más amplio para acercarse a los hospederos que realizan actividades recreativas en el canal contaminado.

Se sabe que varias especies de *Acanthamoeba* (*A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. royreba*, *A. hatchetti*, *A. healyi* y *A. divionensis*) causan infecciones humanas (Visvesvara *et al.*, 2007), principalmente en pacientes con VIH/SIDA o que padecen enfermedades crónicas, diabetes, que se han sometido a un trasplante de órganos o están debilitados por cualquier otro motivo sin antecedentes recientes de exposición al agua dulce recreativa.

Por otra parte, De Jonckheere (2014) menciona que hasta ese año se habían descrito 47 diferentes naeglerias. De todas las descritas sólo *N. australiensis*, *N. italica* y *N. philippinensis* pueden ser patógenas en el modelo de ratón de MEAP, pero no se han identificado en ningún caso humano, únicamente a *N. fowleri* (De Jonckheere, 2004; Visvesvara *et al.*, 2007).

Dado que todas las especies identificadas en este trabajo tienen reportes de potencial patógeno, es muy probable que las personas que realicen actividades recreativas en el canal Pacífico desarrollen alguna infección por la presencia de las amibas de vida libre que se identificaron en este estudio.

### 7.3. Parámetros fisicoquímicos del agua

En los dos sitios del canal de riego Pacífico se realizó la medición de los parámetros fisicoquímicos del agua, con la finalidad de correlacionar las condiciones ambientales con la presencia de amibas de vida libre. La temperatura y el pH no mostraron mucha variación entre los dos sitios de muestreo. El OD osciló entre 0.25 y 9.2 mg/L; la conductividad, entre 1119 y 1650  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ; y los sólidos disueltos totales, entre 767 y 800 ppm (Tabla 3).

**Tabla 3.** Parámetros fisicoquímicos del agua del canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B.C.

Muestra	Tipo de muestra	Temperatura (°C)	pH	OD (mg/L)	Conductividad ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	SDT (ppm)
1	Agua y sedimento	32.6	8.12	0.25	1119	800
2	Agua	32.5	8.17	9.2	1650	767

\*Oxígeno disuelto (OD). Sólidos disueltos totales (SDT).

#### 7.3.1. Temperatura

La temperatura del agua es uno de los principales factores que favorecen la proliferación de las amibas de vida libre (Bonilla-Lemus *et al.*, 2014). En este estudio la temperatura es similar en ambos sitios de muestreo (32.5 °C y 32.6 °C) (Tabla 3), por lo que puede asumirse que los factores que influyen en la temperatura son similares en ambas muestras. Estos valores de temperatura del agua pueden depender de varios factores, entre ellos, la latitud, la altitud, la estación del año, la profundidad del agua, entre otras. Una posible explicación para la presencia de estos organismos en el canal de riego podría ser la alta temperatura del agua, que se encuentra dentro del rango óptimo para su reproducción.



Las amibas de vida libre patógenas como algunas especies de *Naegleria* y *Acanthamoeba* se caracterizan por proliferar en el agua cuando la temperatura ambiente supera los 30 °C (Visvesvara *et al.*, 2007), como en este estudio que la temperatura ambiental fue de 44 °C, debido a que el muestreo se realizó en verano. En consecuencia, todas las especies descritas en este estudio (*Acanthamoeba astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. rhysodes*, *A. polyphaga*, *A. lugdunensis* y *Naegleria sp.*) tienen reportes de potencial patógeno (Visvesvara *et al.*, 2007).

Dado que la temperatura del agua que se registró en los dos sitios del canal de riego Pacífico fue superior a los 32 °C, la presencia de amibas de vida libre es consecuente con los reportes de estos géneros amibianos, en donde se menciona que *Naegleria* se ha encontrado por encima de los 28 °C (De Jonckheere, 2004), e incluso la especie *N. fowleri* puede persistir por períodos breves (24 a 96 horas) a temperaturas del agua superiores a 45 °C (Lam *et al.*, 2019) y de minutos a horas puede resistir entre 50 °C y 65 °C (Chang 1978). Por otro lado, la temperatura óptima para el crecimiento de *Acanthamoeba* es de 25 °C, aunque se sabe que muchos aislamientos crecen a temperaturas más altas (Martinez y Visvesvara, 1997).

En un estudio, Lares-Villa *et al.* (1993) informaron la presencia de *N. fowleri*, aislada en cinco casos fatales de MEAP en Mexicali y uno de una muestra de agua cuyas temperaturas oscilaron entre 28 °C y 32 °C. En otro estudio realizado por Lares-Villa y Hernández-Peña (2010), cuantificaron naeglerias termófilas en aguas naturales utilizadas con fines recreativos en Sonora y reportaron que estuvieron presentes principalmente durante el verano (entre 29 °C y 35 °C). En un estudio realizado por Hernández-Peña *et al.* (2019) evaluaron aguas de fuentes artificiales de Chihuahua, con temperaturas que oscilaron entre 20.5 °C y 30 °C y reportaron el aislamiento de *Naegleria* y *Acanthamoeba*. Asimismo, Bonilla *et al.* (2020), aislaron cinco especies diferentes de *Naegleria* en canales de riego del Valle de Mexicali con temperaturas del agua de 16 °C a 20 °C.

Los estudios antes mencionados y los resultados obtenidos coinciden con los valores óptimos para la presencia de amibas del grupo *Naegleria-Acanthamoeba*. Un factor fundamental para que las amibas se adapten a estas temperaturas es su capacidad para formar quistes que son estructuras de resistencia ante el calor (Martinez y Visvesvara, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004) y es determinante para su éxito en las condiciones de temperatura que predominan en el canal. En ese sentido, queda de manifiesto que gracias a esa característica, son capaces de sobrevivir a amplios intervalos de temperatura del agua.

Es importante mencionar que los casos mortales se han registrado en verano, cuando la temperatura del agua y la del ambiente son más altas que en el resto del año. De esa manera, por un lado, las amibas de vida libre tienen las condiciones óptimas de temperatura para multiplicarse y por otro lado, aumenta el número de personas que se introducen a los canales para refrescarse y con eso aumenta el riesgo de infectarse. Esta tendencia sugiere que el aumento de casos de MEAP durante el verano en Mexicali puede deberse a una mayor actividad recreativa del agua como resultado del aumento tanto de la temperatura ambiente como la del agua del canal.

Debido a que la MEAP y la EAG son enfermedades que afectan a pacientes sanos o cuya integridad metabólica, fisiológica o inmunológica está comprometida o debilitada, los casos pueden ocurrir en cualquier época del año sin un patrón de ocurrencia estacional (Visvesvara *et al.*, 2007). En tal sentido, la presencia de estos géneros en los cuerpos de agua que son utilizados para fines recreativos, es motivo de preocupación, pues aunque las enfermedades producidas por las amibas de vida libre son relativamente raras, la mortalidad es alta y los niños suelen ser las principales víctimas.

### 7.3.2. pH

*Naegleria* y *Acanthamoeba* tienden a proliferar en aguas neutras o ligeramente alcalinas (Bonilla y Ramírez, 2019). En este estudio el pH del agua del sitio 2 es ligeramente mayor (8.17) que el del sitio 1 (8.12) (Tabla 3). Esto podría deberse a la presencia de materia orgánica en la muestra de agua del sitio 1, así como a las actividades antropogénicas que se realizan cerca del canal, que incrementan los niveles de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) en la atmósfera y disminuye el pH del agua.

En ese sentido, el  $\text{CO}_2$  presente en la atmósfera se disuelve en el agua y reacciona con ella, formando ácido carbónico ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ), este último libera iones hidrógeno ( $\text{H}^+$ ) en solución, lo que puede disminuir ligeramente el pH del agua en el sitio 1. Es importante destacar que esta reacción se relaciona estrechamente con el fenómeno del cambio climático, ya que la actividad humana ha aumentado los niveles de dióxido de carbono en la atmósfera, lo que a su vez provoca cambios en los cuerpos de agua, afectando su pH.

Sin embargo, el pH registrado en ambos sitios es alcalino y los factores que pudieron influir en el pH del agua incluyen las aguas residuales de origen doméstico que se liberan en el canal sin un adecuado tratamiento, que pueden introducir compuestos alcalinos y aumentar el pH, además de las actividades humanas como la agricultura que predomina en el Valle de Mexicali.

En un estudio realizado por Bonilla-Lemus *et al.* (2020) informaron un pH que osciló entre 7.3 y 7.7, en canales de riego de Mexicali. En tanto, Lares-Villa *et al.* (1993) reportaron un pH de 8.3 a 8.6 en el agua de un canal artificial del Valle de Mexicali. En los estudios antes mencionados y en este trabajo predominaron los valores de pH que tienden a la neutralidad, lo que favorece la presencia de estos protozoos (Bonilla y Ramírez, 2019). Sin embargo, las amibas se encuentran en una amplia gama de condiciones de pH. Schuster y Visvesvara (2004), indicaron que las amibas patógenas del género *Acanthamoeba* pueden crecer a un pH que varía de 4 a 12. En un estudio realizado por Weik y John (1977) reportaron que *N. fowleri* crece mejor a un pH ligeramente ácido de 5.5 a 6.5 que coincide

con el pH óptimo de 6.5 que reportó Cerva, en 1978. Lam *et al.* (2019) informaron la viabilidad de *N. fowleri* a diferentes condiciones de pH en agua dulce. Cuando se incubaba a un pH de 1 o 2, no es viable inmediatamente. Es viable durante más de 96 horas a un pH de entre 4 y 11. Se mantiene estable durante 24 horas a un pH de 12 y a partir de 13, las amibas son viables hasta 4 horas posteriores a la incubación.

Dado que en este estudio los valores de pH fueron óptimos al ser alcalinos, se espera la incidencia de amibas de vida libre patógenas y no patógenas. Sin embargo, es importante verificar el potencial patógeno de las amibas del canal de riego Pacífico en estudios posteriores, pues las amibas patógenas se pueden encontrar en un amplio rango de pH.

### **7.3.3. Oxígeno disuelto**

El oxígeno disuelto es un factor importante para la supervivencia de las amibas de vida libre, debido a que son aerobias (Martinez *et al.*, 1973; John, 1982). En el caso de *Naegleria* y *Acanthamoeba*, requieren valores mínimos de oxígeno disuelto de 2 mg/L para su desarrollo (Bonilla y Ramírez, 2019). Sin embargo, las amibas patógenas prefieren aguas con bajo contenido de OD, pues como lo reportó De Jonckheere en 2014, estos microorganismos son capaces de sobrevivir en ambientes anóxicos, cuando intentan sobrevivir como quistes en el lodo del fondo o pueden vivir anaeróbicamente en presencia de bacterias metanogénicas.

La muestra de agua del sitio 1 tiene un valor muy bajo de OD (0.25 mg/L) (Tabla 3), valor óptimo para amibas patógenas como las que se reportan en este estudio, lo que podría indicar una alta carga de materia orgánica. Debido a que el canal está cerca de áreas urbanas, recibe descargas continuas de aguas residuales que proporcionan materia orgánica y bacterias que pueden consumir el oxígeno presente en el agua y modificar el OD. Esto puede ser la causa principal de la baja concentración de OD.

La segunda muestra tiene un valor más alto de OD (9.2 mg/L), lo que puede indicar menor cantidad de materia orgánica y menor actividad microbológica. En consecuencia, las temperaturas altas del canal y la presencia de amibas y otros microorganismos pueden influir indirectamente en la concentración de oxígeno disuelto en el canal de riego.

Bonilla-Lemus *et al.* (2020) observaron un OD entre 3.6 y 4.2 mg/L e identificaron a *N. fowleri*, *N. australiensis*, *N. gruberi*, *N. clarki* y *N. pagei* en canales del Valle de Mexicali. En otro estudio realizado por Andrade *et al.* (2015) en ríos de la Cuenca de México, aislaron 38 cepas e identificaron 12 especies, siendo *A. triangularis*, *A. polyphaga* y *Naegleria sp.* potencialmente patógenas y obtuvieron valores desde 6 hasta 10 mg/L. Los reportes antes mencionados coinciden con los valores de OD obtenidos en este estudio, así como con la presencia de *Naegleria* y *Acanthamoeba*, lo que confirma la capacidad de estos microorganismos para adaptarse a diferentes condiciones de OD.

La presencia de amibas con potencial patógeno en este trabajo se podría deber a que las amibas patógenas (*N. fowleri*) en comparación con las no patógenas (*N. gruberi*), consumen menos oxígeno, probablemente porque la menor demanda de oxígeno mejora la capacidad de *N. fowleri* para prosperar en aguas calientes donde se reducen las concentraciones de OD (Stahl y Olson, 2021). Finalmente, *N. fowleri* se ha aislado de sedimentos anaeróbicos, lo que sugiere que las condiciones anóxicas no matan todos los estadios de vida de las amibas, por lo que es posible que permanezcan viables en forma de quiste.

#### **7.3.4. Conductividad**

El grupo *Naegleria-Acanthamoeba* se ha asociado con aguas contaminadas o estancadas (Visvesvara *et al.*, 2007) y es probable que estos microorganismos se puedan desarrollar en ambientes acuáticos con altas tasas de conductividad eléctrica, como es el caso de las aguas residuales y contaminadas que presentan sales, nutrientes y otros compuestos disueltos en el agua.

La conductividad de ambas muestras es alta (1119 y 1650  $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) (Tabla 3), esto indica la presencia de sales disueltas en el agua de los dos sitios de muestreo. Además, los altos valores encontrados pueden ser indicativos de una alta carga de contaminantes orgánicos e inorgánicos, esto se puede confirmar debido a que entre el sitio de muestreo 1 y el 2 hay varias casas y como no hay drenaje parte de sus desechos van hacia el canal, además, se observaron algunos grupos de familias que estaban haciendo actividades recreativas (comiendo y algunos nadando o solamente introducidos en el canal).

Algunos de los factores que pueden influir en la conductividad del agua incluyen estas descargas continuas de aguas residuales y las actividades recreativas junto con las de tipo agrícola que se desarrollan cerca del canal, ya que estas actividades elevan las concentraciones de potasio, magnesio, calcio, carbonato y sulfato (Baird y Cann, 2012) que podrían favorecer el crecimiento de *Naegleria* y *Acanthamoeba*.

*Naegleria* ha sido aislada de canales riego en Mexicali entre los 1400 y 1800  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Bonilla-Lemus *et al.*, 2020), mientras que *Acanthamoeba*, se reportó en arroyos de la cuenca de México entre los 63 y 76  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Bonilla-Lemus *et al.*, 2014). Asimismo, Gallegos-Neyra *et al.* (2019) identificaron amibas entre ellas a *Naegleria* y *Acanthamoeba* en un balneario natural en Oaxaca y reportaron una conductividad entre 8.6 y 10.6  $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Estos estudios y los datos obtenidos, indican que *Naegleria* y *Acanthamoeba* son muy tolerantes a una amplia variedad de iones y contaminantes, incluyendo sales.

Poco se sabe de la influencia de la conductividad en la distribución de las amibas en ambientes acuáticos como los canales de riego, lo que dificulta demostrar una asociación clara entre este parámetro y la presencia de amibas. Resulta importante desarrollar un ensayo con esta variable para muestras ambientales, dado que diferentes iones y concentraciones de iones pueden afectar a las amibas de manera diferente dependiendo de sus vías metabólicas, por lo que se necesita más investigación en ese sentido.

### 7.3.5. Sólidos disueltos totales

*Naegleria* y *Acanthamoeba* pueden encontrar los nutrientes que necesitan para sobrevivir en aguas con altas concentraciones de sólidos disueltos totales (SDT). La primera muestra tiene un valor más alto de sólidos disueltos totales (800 ppm) que la segunda (767 ppm) (Tabla 3), lo que podría estar relacionado con los bajos niveles de OD del sitio 1 (0.25 mg/L). Los altos valores de sólidos disueltos totales encontrados en ambas muestras pueden ser indicativos de una alta carga de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el canal.

Los sólidos disueltos totales pueden influir en la calidad del hábitat y la supervivencia de los microorganismos presentes. Una de las características principales de la zona es la falta de drenaje y aunque gran parte del uso del agua es agrícola, otra parte significativa es para uso doméstico. El canal se encuentra cerca de áreas urbanas y recibe descargas de aguas residuales que proporcionan materia orgánica y bacterias, que sirven de alimento a las amibas. Esto coincide con lo reportado por Bonilla-Lemus *et al.* (2014) quienes determinaron que la mayor riqueza de especies se encontró en arroyos ubicados en áreas de actividad agrícola y en los cercanos a pequeñas poblaciones que vierten aguas residuales en ellos. En ese sentido, la presencia de las amibas se puede atribuir a las actividades antropogénicas como la agricultura, actividades recreativas y el establecimiento de asentamientos humanos carentes de adecuados servicios de drenaje.

En un estudio realizado por Andrade *et al.* (2015) identificaron AVL incluidas *Acanthamoeba* y *Naegleria* obtenidas de ríos de la Cuenca de México y reportaron valores de SDT con variaciones de entre 38 y 221 ppm. Por otro lado, Robles *et al.* (2019) reportaron valores de 303 a 3490 ppm en piscinas de la Ciudad de México. Ambos estudios y los resultados obtenidos indican la capacidad de las amibas para adaptarse a diferentes concentraciones de SDT. Finalmente, el conocimiento de estos valores de SDT son importantes para anticipar la posible presencia de amibas en canales de riego que son una atracción recreativa popular principalmente durante el verano, donde la presencia de amibas representa un riesgo potencial para los humanos.

#### 7.4. Presencia de amibas en el canal de riego Pacífico del Valle de Mexicali, B. C.

Aunque *N. fowleri* sigue siendo la amiba más estudiada en esta zona, otras especies como *Acanthamoeba* spp. son objeto de un interés creciente debido a su potencial patógeno. *Naegleria* y *Acanthamoeba* parecen estar aisladas de manera muy frecuente y ubicua en el canal, en gran medida porque en su ciclo de vida experimentan la transformación entre la forma de trofozoíto y de quiste, este último les permite resistir mejor las condiciones ambientales hostiles como el agotamiento de nutrientes, los cambios de temperatura o la variación del pH, como lo refieren Schuster y Visvesvara (2004).

La presencia de amibas en este estudio se ve favorecida por las condiciones físicas y químicas del agua que se encuentran dentro de los valores óptimos, además de las actividades antropogénicas como la agricultura, las actividades recreativas y el establecimiento de asentamientos humanos carentes de drenaje, lo que convierte al canal en una fuente potencial de infección en la región.

Cabe mencionar que se han realizado algunos trabajos de tesis en el Valle, pero no del canal Pacífico. Suárez (2005) aisló amibas de 9 canales del Valle de Mexicali y los géneros más frecuentes fueron *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Acanthamoeba*. Vargas (2005) identificó 9 géneros incluidos *Acanthamoeba* y *Naegleria* de 14 canales de riego distribuidos en el Valle de Mexicali e identificó a *A. polyphaga*, *A. culbertsoni*, *N. fowleri* y *Naegleria* sp. Calderón (2008) obtuvo 255 aislamientos de 14 canales de riego, distribuidos en 14 géneros, siendo *Naegleria* y *Acanthamoeba* los más frecuentes e identificó a las especies *N. gruberi* y *N. fowleri*. Ramírez (2019) aisló 18 especies del canal Revolución, incluyendo a las especies *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. astronyxis*, *A. palestinensis*, *N. gruberi*, *N. fowleri* y *Naegleria* sp. Rodríguez (2021) identificó 13 géneros en 3 canales del Valle, los más frecuentes fueron *Acanthamoeba* (*A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis*), *Naegleria*, (*N. clarki* y *N. australiensis*) *Rosculus* y *Vermamoeba*. Estos trabajos y los datos obtenidos complementan el registro de amibas en la región con el fin de tener conciencia y considerar el riesgo que implica el uso recreativo de estos canales.



Algunas de las especies que se reportan en este estudio como *A. astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. polyphaga* y *Naegleria sp.* coinciden con las descritas en los trabajos antes mencionados (Vargas, 2005; Ramírez, 2019; Rodríguez, 2021), pero la especie *A. lugdunensis* no se ha reportado previamente en el Valle de Mexicali. El hallazgo de estas especies es preocupante pues todas las especies de *Acanthamoeba* documentadas en este estudio causan infecciones humanas (Visvesvara *et al.*, 2007). En ese sentido, la presencia de estas amibas en el canal Pacífico es evidencia del riesgo potencial que implica realizar actividades recreativas en el canal.

Debido a que la MEAP se produce principalmente en individuos sanos y la EAG en hospederos con funciones inmunes debilitadas, no existen métodos claramente definidos para la prevención de las infecciones por estas amibas. Sin embargo, en el caso de la QA, debido a que las lentes de contacto y las soluciones para el cuidado de las lentes son factores de riesgo bien conocidos, es necesario educar a los usuarios de lentes de contacto sobre la importancia del cuidado adecuado de los lentes, para la prevención de infecciones y se debe advertir a los usuarios de lentes de contacto que no los usen mientras nadan o realizan cualquier otra actividad acuática (Visvesvara *et al.*, 2007). En general, para reducir la posibilidad de contraer alguna infección por amibas se recomiendan medidas que impidan la entrada de agua por la nariz, como evitar bucear o saltar al agua, taparse la nariz o usar un tapón nasal especialmente en los canales donde se ha reportado la presencia de las amibas del grupo *Naegleria-Acanthamoeba*.

Es muy posible que una gran cantidad de casos de MEAP, EAG y QA no hayan sido detectados debido a la falta de experiencia para identificar a las amibas, el retraso en el diagnóstico, la falta de una terapia óptima o el alto grado de virulencia. En ese sentido, existe una necesidad urgente de aumentar la conciencia del público y de los profesionales de la salud, así como implementar estrategias educativas para evitar consecuencias graves para las personas y como lo mencionan Bonilla-Lemus *et al.* (2020), es imprescindible desarrollar métodos rápidos de detección temprana de las amibas en muestras ambientales y clínicas que sean acordes a los recursos e infraestructura del país. Adicionalmente, es

sensato establecer programas de monitoreo de amibas para determinar rutinariamente el conteo total de coliformes para anticipar condiciones favorables para el crecimiento de AVL.

Este estudio aportó datos sobre las condiciones en las que se desarrollan las amibas en esta región, así como el hallazgo de *A. lugdunensis* en la zona. Se debe seguir estudiando la zona para identificar a las amibas molecularmente y realizar pruebas para descartar su patogenicidad. La presencia de las amibas del grupo *Naegleria-Acanthamoeba* que se aislaron del canal Pacífico, es una llamada de atención para tener precaución en el uso recreativo del canal y evitar un riesgo a la salud de los usuarios. Las autoridades locales de salud pública deben considerar el monitoreo del canal para AVL y colocar las advertencias apropiadas.

## 8 Conclusiones

- Se aislaron un total de ocho cepas, de las cuales seis corresponden al género *Acanthamoeba* y dos a *Naegleria*.
- El sitio 1 (muestra de agua con sedimento) puede favorecer la formación de estructuras semejantes a las biopelículas y funcionar de manera similar al satisfacer los requisitos nutricionales de las AVL y fomentar la transformación en su forma infectiva (trofozoíto), o mantenerlas viables en el ambiente en forma de quiste.
- La capacidad de *Naegleria* y *Acanthamoeba* para cambiar de fenotipo resulta conveniente para su patogénesis, pues el quiste que poseen les permite resistir las condiciones ambientales extremas del Valle de Mexicali.
- Se identificó morfológicamente a *Naegleria sp.* y a las especies *A. astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes* y *A. polyphaga*, además del hallazgo de *A. lugdunensis* en el Valle.
- En el sitio 1 (agua y sedimento) se aisló a *A. astronyxis*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes*, *A. polyphaga* y *Naegleria sp.* En el sitio 2 (agua) se aisló a *A. lugdunensis* y *Naegleria sp.*
- La presencia de amibas en este estudio se puede atribuir a las condiciones físicas y químicas del agua, actividades antropogénicas como la agricultura, actividades recreativas y asentamientos humanos carentes de adecuados sistema de drenaje.
- El canal Pacífico debe ser considerado como de alto riesgo para los usuarios, pues se identificó a *Naegleria* y hay evidencia de que todas las especies de *Acanthamoeba* documentadas en este estudio se han reportado como patógenas. Las autoridades locales de salud pública deben considerar el monitoreo del canal para amibas de vida libre y colocar las advertencias apropiadas.

## 10 Literatura citada

1. Adl, S. M., Bass, D., Lane, C. E., Lukes, J., Schoch, C. L., Smirnov, A., Agatha, S., Berney, C., Brown, M. W., Burki, F., Cárdenas, P., Cepicka, I., Chistyakova, L., Del Campo, J., Dunthorn, M., Edvardsen, B., Eglit, Y., Guillou, L., Hampl, V., Heiss, A. A., Hoppenrath, M., James, T. Y., Karn-kowska, A., Karpov, S., Kim, E., Kolisko, M., Kudryavtsev, A., Lahr, A. J. G., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., Mann, D. G., Massana, R., Mitchell, E. A. D., Morrow, C., Park, J. S., Pawlowski, J. W., Powell, M. J., Richter, D. J., Rueckert, S., Shadwick, L., Shimano, S., Spiegel, F. W., Torruella, G., Youssef, N., Zlatogursky, V., and Zhang, Q. 2019. *Revisions to the Classification, Nomenclature, and Diversity of Eukaryotes*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 66(1), 4–119.
2. Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. L., Lynn, D. H., Mcmanus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, L., Schoch, C. L., Smirnov, A. and Spiegel, F. W. 2012. *The Revised Classification of Eukaryotes*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59(5), 429–514.
3. American Public Health Association; AmericanWaterWorks Association; Water Environment Federation. 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed.; American Public Health Association: Washington, DC, USA.
4. Andrade, M. A., Carrasco, Ma. M., Ortíz, R., Ibarra, Ma. R., Carmona, J. y Bonilla, P. 2015. *Amibas de vida libre y potencialmente patógenas de ríos de la Cuenca de México*. *Tendencias de Investigación en Limnología Tropical*, 2, 115–120.
5. Baird, C. and Cann, M. 2012. *Environmental Chemistry*. Fifth ed. W. H. Freeman, Macmillan. New York, USA.

6. Berger, P., Papazian, L., Drancourt, M., La Scola, B., Auffray, J.-P., and Raoult, D. 2006. *Ameba-associated Microorganisms and Diagnosis of Nosocomial Pneumonia*. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 248–255.
7. Bonilla-Lemus, P., Caballero Villegas, A. S., Carmona Jiménez, J., and Lugo Vázquez, A. 2014. *Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin*. *Experimental Parasitology*, 145, S28–S33.
8. Bonilla-Lemus, P., Rojas-Hernández, S., Ramírez-Flores, E., Castillo-Ramírez, D. A., Monsalvo-Reyes, A. C., Ramírez-Flores, M. A., Barrón-Graciano, K., Reyes-Battle, Ma., Lorenzo-Morales, J. and Carrasco-Yépez Ma. M. 2020. *Isolation and Identification of Naegleria Species in Irrigation Channels for Recreational Use in Mexicali Valley, Mexico*. *Pathogens*, 9(10), 1–14.
9. Bonilla, P. y Ramírez, E. 2019. *Amibas de vida libre con potencial patógeno*. En: Becerril M.A. (Ed). *Parasitología Médica*. McGraw-Hill Interamericana. 5a edición. Pp. 33–44 ISBN 13:978-607-15 1422-6.
10. Bonilla, L., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderón, A., Gallegos, E. y Hernández, D. 1999. Occurrence of pathogenic and free-living amoeba in aquatic systems of the Huasteca Potosina, México. In *Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope*, M. Munawar, S. Lawrence y D. Malley (eds.). *Ecovision World Monograph Series*. Backhuys Publishers, Holanda, 37–44.
11. Calderón, A. 2008. *Aislamiento de la ameba patógena Naegleria fowleri del agua de los canales de riego de Mexicali, Baja California*. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. UNAM, Facultad de Ciencias.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. *Free Living Amebic Infections [Acanthamoeba spp.] [Balamuthia mandrillaris] [Naegleria fowleri] [Sappinia spp.]*. DPDx - Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern. <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html> (Página revisada por última vez: 23 de agosto de 2019).

13. Cerva, L. 1978. *Some further characteristics of the growth of Naegleria fowleri and N. gruberi in axenic culture*. Folia Parasitologica, 25(1), 1–8.
14. Cervantes-Sandoval, I., de Serrano-Luna, J. J., Tapia-Malagon, J. L., Pacheco-Yepez, J., Silva-Olivares, A., Galindo-Gomez, S., Tsutsumi, V. and Shibayama, M. 2007. *Characterization of Naegleria fowleri strains isolated from human cases of primary amoebic meningoencephalitis in Mexico*. Revista de Investigación Clínica, 59(5), 342–347.
15. Chang, S. L. 1978. *Resistance of pathogenic Naegleria to some common physical and chemical agents*. Applied and Environmental Microbiology, 35(2), 368–375.
16. Clarke, D. W., and Niederkorn, J. Y. 2006. *The pathophysiology of Acanthamoeba keratitis*. Trends in Parasitology, 22(4), 175–180.
17. Cogo, P. E., Scagli, M., Gatti, S., Rossetti, F., Alaggio, R., Laverda, A. M., Zhou, L., Xiao, L., and Visvesvara, G. S. 2004. *Fatal Naegleria fowleri meningoencephalitis, Italy*. Emerging Infectious Diseases, 10, 1835–1837.
18. Comisión Nacional del Agua. 2011. *Descripción del Sistema Ambiental Regional y Señalamiento de Tendencias del Desarrollo y Deterioro de la Región*. Manifestación de Impacto Ambiental Modernización de la Red de Riego Agrícola Distrito de Riego 014 Río Colorado Valle de Mexicali. Cisco Consultores Ambientales e Ingeniería Dennis, 4, 1–72.
19. De Jonckheere, J. F. 1991. *Ecology of Acanthamoeba*. Clinical Infectious Diseases, 13(Supplement\_5), S385–S387.
20. De Jonckheere, J. F. 2011. *Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate Naegleria fowleri*. Infection, Genetics and Evolution, 11(7), 1520–1528.
21. De Jonckheere, J. F. (2004). *Molecular Definition and the Ubiquity of Species in the Genus*. Protist, 155(1), 89–103.

22. De Jonckheere, J. F. 2014. *What do we know by now about the genus Naegleria?* Experimental Parasitology, 145, S2–S9.
23. Dingle, A. D. and Fulton, C. 1966. *Development of the flagellar apparatus of Naegleria.* The Journal of Cell Biology, 31(1), 43–54.
24. Fulton, C., and Dingle, A. D. 1967. *Appearance of the flagellate phenotype in populations of Naegleria amebae.* Developmental Biology, 15(2), 165–191.
25. Gallegos-Neyra, E. M., Álvarez-Barrientos, J. L., Mayen-Estrada, E. R., Vargas-Arzola, J., Mendoza-Romero, Ma. J. y Corona-Arzola, A. D. 2019. *Primer registro de amibas de vida libre en el balneario natural "Hierve el Agua" en el municipio de San Lorenzo Albarradas, estado de Oaxaca.* Revista de Zoología, 30, 1–13.
26. Gallegos-Neyra, E. M., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M. del R., y Mayén-Estrada, R. 2014. *Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México.* Revista Mexicana de Biodiversidad, 85, 10–25.
27. García, E. 2004. *Modificaciones al sistema de clasificación de Köppen.* Instituto de Geografía, UNAM.
28. Gertiser, M., E. Giagante, E. Sgattoni, N. Basabe, F. Rivero, and Luján, H. 2010. *Queratitis por Acanthamoeba sp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina.* Revista Argentina de Microbiología, 42(2), 122–5.
29. Greub, G., and Raoult, D. 2004. *Microorganisms Resistant to Free-Living Amoebae.* Clinical Microbiology Reviews, 17(2), 413–433.
30. Hernández-Peña, C.-C., Saénz-Montoya, G., Alvarado-Soto, S., Carrillo-Méndez, J.-D., Soto-Padilla, M.-Y., Otero-Ruiz, A., y Lares-Jiménez, L.-F. 2019. *Identificación de Naegleria spp. y Acanthamoeba spp. en agua de fuentes de Ciudad Juárez, Chihuahua.* Revista Latinoamericana De Recursos Naturales, 15(3), 88–96.

31. Jamerson, M., Remmers, K., Cabral, G. and Marciano-Cabral, F. 2008. *Survey for the presence of Naegleria fowleri Amebae in lake water used to cool reactors at a nuclear power generating plant*. Parasitology Research, 104(5), 969–978.
32. John, D. and Howard, M. 1995. *Seasonal distribution of pathogenic free living amoebae in Oklahoma waters*. Parasitology Research, 81(3): 193–201.
33. John, D. T. 1993. *Opportunistically pathogenic free-living amoebae*. In Parasitic protozoa, J. P. Kreier and J. R. Baker (ed.), 2nd ed., vol. 3. Academic Press, New York, 143–246.
34. John, D.T., 1982. *Primary amebic meningoencephalitis and the biology of Naegleria fowleri*. Annual Review of Microbiology, 36(1), 101–123.
35. Khan, N. A. 2006. *Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health*. FEMS Microbiology Reviews, 30(4), 564–595.
36. Lam, C., He, L. and Marciano-Cabral, F. 2019. *The Effect of Different Environmental Conditions on the Viability of Naegleria fowleri Amoebae*. Journal of Eukaryotic Microbiology, 66(5):752–756.
37. Lares-Villa, F. and Hernández-Peña, C. 2010. *Concentration of Naegleria fowleri in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007–October 2008)*. Experimental Parasitology, 126(1), 33–36.
38. Lares-Villa, F., Ayala-Montenegro, I. y Verdugo-Escoboza, E. 2001. *Amibas de vida libre aisladas de jacuzzis y piscinas de uso recreativo en Hermosillo, Sonora*. Instituto Tecnológico de Sonora, 3(10), 39–48.
39. Lares-Villa, F., De Jonckheere, J. F., De Moura, H., Rechi-Iruretagoyena, A., Ferreira-Guerrero, E., Fernández-Quintanilla, G., Ruíz-Matus, C. and Visvesvara, G. S. 1993. *Five Cases of Primary Amebic Meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: Study of the Isolates*. Journal of Clinical Microbiology, 31(3), 685–688.



40. Lopez-Corella, E., De Leon, B. and De Jonckheere, J. F. 1989. *Primary amebic meningoencephalitis caused by Naegleria fowleri in an adolescent from Huetamo, Michoacan, Mexico*. Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 46(9), 619–622.
41. Marciano-Cabral, F., and Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba spp. as agents of disease in Humans*. Clinical Microbiology Reviews, 16(2), 273–307.
42. Marciano-Cabral, F., and Cabral, G. A. 2007. *The immune response to Naegleria fowleri amebae and pathogenesis of infection*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 51(2), 243–259.
43. Martinez, A. J. 1985. *Free-Living Amebas: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease*. CRC Press, Broca Raton, FL, 166.
44. Martinez, A. J., and Visvesvara, G. S. 1997. *Free-living, Amphizoic and Opportunistic Amebas*. Brain Pathology, 7(1), 583–598.
45. Martinez, A. J., Duma, R. J., Nelson, E. C. and Moretta, F. L. 1973. *Experimental Naegleria Meningoencephalitis in mice. Penetration of the olfactory mucosal epithelium by Naegleria and pathologic changes produced: a light and microscope study*. Laboratory Investigation, 29(2), 121–33.
46. Morgan, M. J., Halstrom, S., Wylie, J. T., Walsh, T., Kaksonen, A. H., Sutton, D., Braun, K. and Puzon, G. J. 2016. *Characterization of a Drinking Water Distribution Pipeline Terminally Colonized by Naegleria fowleri*. Environmental Science & Technology, 50(6), 2890–2898.
47. Page, F. C. 1967. *Re-Definition of the Genus Acanthamoeba with Descriptions of Three Species*. The Journal of Protozoology, 14(4), 709–724.
48. Page, F. C. 1988. *A new key to freshwater and soil Gymnamoebae with instructions for culture*. Culture Collection of Algae and Protozoa. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres, 122.

49. Pussard, M. and Pons, R. 1977. *Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre Acanthamoeba (Protozoa, Amoebida)*. Protistologica, 13, 557–98.
50. Puzon, G. J., Wylie, J. T., Walsh, T., Braun, K. and Morgan, M. J. 2017. *Comparison of biofilm ecology supporting growth of individual Naegleria species in a drinking water distribution system*. FEMS Microbiology Ecology, 93(4), 1–8.
51. Ramirez, E., Robles, E., Martinez, M., Sainz, Ma. G., Martinez, B., Rivas, B. I., and Rocha, A. 2016. *Distribution of free-living amoebae in springs in Morelos, Mexico*. Global Advanced Research Journals, 5(6), 057–067.
52. Ramírez, E., Robles, E., Sáinz, Ma. G., Ayala, R., y Campoy, E. 2009. *Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México*. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 25(4), 247–255.
53. Ramírez Flores, E., Robles Valderrama E., Ayala Patiño R. y Martínez Rodríguez B. 2012. *Calidad amebológica del agua de pozos utilizados para suministro de agua potable en el Estado de Hidalgo*. Ingeniería, 16(3), 219–228.
54. Ramírez, M. A. 2019. *Amebas de vida libre en el canal de riego Revolución en el Ejido Saltillo Mexicali, Baja California Norte*. Tesis de licenciatura en Biología. UNAM, FESI.
55. Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramirez, E., Bonilla, P., Calderon, A., Martinez, J., Rodriguez, S., and Alcocer, J. 1989. *Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico*. Environmental Research 50, 289–295.
56. Rivera, F., Lares, F., Ramirez, E., Bonilla, P., Rodriguez, S., Labastida, A., Ortiz, R. and Hernández, D. 1991. *Pathogenic Acanthamoeba Isolated During an Atmospheric Survey in Mexico City*. Clinical Infectious Diseases, 13(Supplement\_5), S388–S389.
57. Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rdríguez, S., Ortiz, R., Zaldívar, B., Ramírez, P., and Durán, A. 1993. *Pathogenic and Free-living*

- Amoebae Isolated from Swimming Pools and Physiotherapy Tubs in Mexico.* Environmental Research 62, 43–52.
58. Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P., and Lares, F. 1987. *Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and Environs.* Environmental Research, 42(1), 149–154.
59. Robles, E., Ramírez, E., Sáinz, Ma. G., Martínez, B., Ayala, R., González, Ma. E., Hernández, P. and Olmos, M. 2019. *Microbiological and Physico-chemical Study of Swimming Pool Water.* International Research Journal of Advanced Engineering and Science, 4(4), 15–20.
60. Rodríguez, A. 2021. *Amebas de vida libre de tres canales de riego del Valle de Mexicali, Baja California.* Tesis de licenciatura en Biología. UNAM, FESI.
61. Rodríguez-Pérez, E.G. 1984. *Meningoencefalitis por Naegleria fowleri, informe de un caso.* Infectología, 4(10), 263–266.
62. Sawyer, D. 1980. *Current Therapeutic Findings.* Drug Intelligence & Clinical Pharmacy, 14(6), 441–447.
63. Sawyer, T., Visvesvara, G., and Harke, B. 1977. *Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of Acanthamoeba hatchetti, n. sp.* Science, 196(4296), 1324–1325.
64. Schuster, F. L., and Visvesvara, G. S. 2004. *Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals.* International Journal for Parasitology, 34(9), 1001–1027.
65. Siddiqui, R., Ali, I. K. M., Cope, J. R., and Khan, N. A. 2016. *Biology and pathogenesis of Naegleria fowleri.* Acta Tropica, 164, 375–394.
66. Siddiqui, R., and Khan, N. 2012. *Biology and pathogenesis of Acanthamoeba.* Parasites & Vectors, 5(1), 6.

67. Stahl, L. M., and Olson, J. B. 2021. *Environmental abiotic and biotic factors affecting the distribution and abundance of Naegleria fowleri*. FEMS Microbiology Ecology, 97(1), 1–13.
68. Suárez, G. 2005. *Presencia y distribución de amibas potencialmente patógenas en el valle de Mexicali, Baja California, México*. Tesis de maestría en Ciencias Biológicas. UNAM, FESI.
69. Tyndall, R. L., K. S. Ironside, P. L. Metler, E. L. Tan, T. C. Hazen, and Fliermans, C. B. 1989. *Effect of thermal additions on the density and distribution of thermophilic amoebae and pathogenic Naegleria fowleri in a newly created cooling lake*. Applied and Environmental Microbiology, 55(3), 722–732.
70. Valenzuela, G., Lopez-Corella, E. and De Jonckheere, J. F. 1984. *Primary amoebic meningoencephalitis in a young male from northwestern Mexico*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 78(4), 558–559.
71. Vargas, A. 2005. *Amibas de vida libre patógenas en canales de riego del Valle de Mexicali, Baja California*. Tesis de licenciatura en Biología. UNAM, FESI.
72. Vargas-Zepeda, J., Gomez-Alcala, A. V., Vasquez-Morales, J. A., Licea-Amaya, L., De Jonckheere, J.F. and Lares-Villa, F. 2005. *Successful treatment of Naegleria fowleri meningoencephalitis by using intravenous amphotericin B, fluconazole and rifampicin*. Archives of Medical Research, 36(1), 83–86.
73. Visvesvara, G. S. 1991. *Classification of Acanthamoeba*. Reviews of Infectious Diseases, 13(5), 8369–72.
74. Visvesvara, G. S. 2010. *Amebic meningoencephalitis and keratitis: challenges in diagnosis and treatment*. Current Opinion in Infectious Diseases, 23(6), 590–594.
75. Visvesvara, G. S. 2013. *Infections with free-living amoebae*. Handbook of Clinical Neurology, 153–168.

76. Visvesvara, G. S., and Maguire, J. H. 2006. *Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea*. Tropical Infectious Diseases, 1114–1125.
77. Visvesvara, G. S., Moura, H., and Schuster, F. L. 2007. *Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., Balamuthia mandrillaris, Naegleria fowleri, and Sappinia diploidea*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 50(1), 1–26.
78. Weik, R.R. and John, D.T. 1977. *Agitated mass cultivation of Naegleria fowleri*. The Journal of Parasitology, 63, 868–871.
79. Yu, H,-S. 2004. *Laboratory Investigation of Acanthamoeba lugdunensis from Patients with Keratitis*. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 45(5), 1418–1426.

## Anexo

### Medios de cultivo para amibas de vida libre

#### Agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE).

Mezclar en seco todos los ingredientes (Tabla 4), agregar 500 ml de agua destilada y disolver, completar el volumen de 1000 ml y hervir hasta que se disuelva el agar completamente.

Esterilizar a 121 °C durante 15 minutos. Se vierten 20 ml en cajas Petri. Cuando el agar se ha solidificado se vierten 5 gotas de una suspensión concentrada de la bacteria *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor a 68 °C durante 60 minutos, distribuyendo la suspensión de la bacteria sobre la superficie del agar. Las cajas se guardan en el refrigerador hasta su uso.

**Tabla 4.** Agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* (NNE).

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	0.004 g
NaHPO <sub>4</sub>	0.142 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.136 g
Bactoagar	15 g
Agua destilada	1000 ml

### **Medio Bactocasitona**

Mezclar los ingredientes (Tabla 5). Se vacía 2.7 ml de medio en tubos con tapón de rosca y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos, se deja enfriar y se guardan en el refrigerador, hasta su uso.

Cuando se utilice el medio, se sacan los tubos del refrigerador, se ponen a temperatura ambiente y se les agrega 0.3 ml de suero bovino fetal o suero de ternera con antibiótico.

**Tabla 5.** Medio Bactocasitona.

Bactocasitona	20 g
Agua destilada	1000 ml

### **Medio Chang.**

Mezclar los ingredientes (Tabla 6). Se vacía 2.7 ml de medio en tubos con tapón de rosca y se esteriliza a 121 °C durante 15 minutos, se deja enfriar y se guardan en el refrigerador, hasta su uso.

**Tabla 6.** Medio Chang.

Peptona biotriptasa	16.6 g
NA <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.5 g
Dextrosa	2.7 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.9 g
Agua destilada	1000 ml

## Glosario

Anfizoicas	Dualidad tanto de vivir libremente en la naturaleza, como de inducir enfermedades en el ser humano y en los animales.
Anóxicos	Zonas de agua marina, agua dulce o de aguas subterráneas en las que el oxígeno disuelto está agotado.
Axénico	Cultivo de microorganismo que se desarrolla en un ambiente donde no hay ninguna otra especie viva.
Conductividad	Capacidad que tienen las sales inorgánicas en solución (electrolitos) para conducir la corriente eléctrica.
Diseminados	Que se esparce o se distribuye de forma amplia en el ambiente, los tejidos u órganos del cuerpo.
Eucariota	Que tiene el núcleo diferenciado mediante una membrana.
Fagocitosis	Ingestión de grandes partículas, como microorganismos o restos celulares, que se almacenan en vacuolas llamadas fagosomas.
Hematógena	Que se origina en la sangre o se disemina por la corriente sanguínea.
Inmunocomprometido	Paciente cuyo sistema inmunitario puede verse debilitado por una serie de enfermedades y sus tratamientos.
Inmunodeficiente	Paciente sano cuyo sistema inmunitario tiene una capacidad reducida para combatir infecciones.
Inmunofluorescencia de anticuerpos	Técnica para detectar determinado antígeno mediante la utilización de anticuerpos marcados con fluorescencia.
Isoelectroenfoque	Método de separación de proteínas mediante la aplicación de un campo eléctrico.
Meninges	Tres capas de tejido conectivo que protegen el cerebro y la médula espinal.
Opérculo	Estructura por donde se libera el trofozoíto, se ubica en la unión del endoquiste y el ectoquiste.



Oportunista	Microorganismo que afecta sobre todo a inmunocomprometidos, ya sea por desnutrición, patologías cuyo tratamiento se basa en una terapia inmunosupresora, pacientes oncológicos y a pacientes con el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.
Oxígeno disuelto	Cantidad de oxígeno gaseoso (O <sub>2</sub> ) en el agua, expresada en términos de su presencia en el volumen de agua.
Patógeno	Microorganismo capaz de producir alguna enfermedad o daño en un hospedero sano o inmunodeficiente.
Pinocitosis	Ingestión de líquidos y solutos (incluidas macromoléculas) mediante pequeñas vesículas.
Queratitis	Inflamación de la córnea (tejido transparente con forma de cúpula, que recubre la pupila y el iris).
Quiste	Parásito en estado latente (no se alimenta y no se reproduce).
Regosoles	Suelo mineral muy débilmente desarrollado en materiales no consolidados.
Sólidos disueltos totales	Medida del contenido de todas las sustancias inorgánicas y orgánicas contenidas en un líquido.
Termotolerancia	Capacidad de un organismo para reducir la susceptibilidad al choque térmico, y adaptarse al calor.
Trofozoítos	Parásito en forma activa e infectiva (puede alimentarse y reproducirse).
Vertisoles	Suelos muy arcillosos, con grietas profundas cuando están secos.
Xerosoles	Suelos áridos que contienen materia orgánica; la capa superficial es clara, debajo de ésta hay minerales arcillosos o sales.