



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores

Iztacala

“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

Que para obtener el título de Bióloga

Presenta:

Jessica Lizbeth Álvarez Barrientos

Directora de tesis: D en C. Elvia Manuela Gallegos Neyra

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2016





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.

Agradecimientos

A mis padres

Sabiendo que jamás encontraré la forma de agradecer su constante apoyo y confianza, sólo espero que comprendan que mi esfuerzo y logros han sido también suyos e inspirados en ustedes, en su valentía, en su constancia. Gracias por estar presentes en cada momento. Los amo.

A mi hermano

Que compartió su conocimiento y habilidad.

A D en C Elvia M. Gallegos Neyra

Por su tiempo, dedicación, apoyo, paciencia y sobre todo por su amistad. Por cada nueva experiencia y aprendizaje que he adquirido, no sólo académico, si no personal.

M en C Arturo Calderón Vega

Por el tiempo que dedicó, por su enseñanza, la paciencia y la ayuda que me brindó en todo momento.

A mis sinodales

Por el tiempo dedicado.

Dedicatoria.

A mis padres

Cada triunfo ha sido gracias a su apoyo y a su amor incondicional durante todos estos años, gracias por caminar siempre a mi lado, por animarme a ser mejor cada día y dar lo mejor de mí. Por enseñarme a ser valiente.

A mi hermano

Porque a pesar de tantas diferencias, siempre nos tendremos el uno al otro. Enfréntate a la vida con valentía.

A la D en C Elvia M. Gallegos Neyra

Gracias por enseñarme que, a pesar de caer, uno puede volver a levantarse aún con más fuerza.

Aza

Nunca pares, nunca te conformes, hasta que lo bueno sea mejor y lo mejor excelente.

*Aprendí que el coraje no es la ausencia de miedo, sino el triunfo sobre él.
El hombre valiente no es aquel que no siente miedo, si no el que conquista ese
miedo.*

Nelson Mandela

A la memoria del M en C Arturo Calderón Vega

LOS MEJORES MAESTROS

Los maestros te abren la mente,
enseñándote las maravillas del intelecto
así como el milagro
de pensar por uno mismo.

Un maestro ejercita
los músculos mentales de sus alumnos
estirándolos y fortaleciéndolos,
para que puedan tomar decisiones acertadas,
encontrar su lugar en el mundo
y ser independientes.

Los mejores maestros se preocupan
de que sus alumnos aprendan
para que den lo mejor de sí
y desarrollen todo su potencial.

Tú eres uno de ellos, maestro
¡Gracias!

Anónimo

CONTENIDO

	Página
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	2
1. Amibas de vida libre	2
2. Taxonomía	4
3. Amibas de vida libre potencialmente patógenas	5
3.1 <i>Naegleria fowleri</i>	5
3.1.1 Características morfológicas.....	5
3.2 <i>Acanthamoeba</i> spp.	6
3.2.1 Características morfológicas.....	7
3.3 <i>Balamuthia mandrillaris</i>	9
3.3.1 Características morfológicas.....	9
3.4 <i>Sappinia diploidea</i>	10
3.4.1 Características morfológicas.....	10
4. Ciclo de vida.	11
5. Infecciones amibianas del sistema nervioso	12
5.1 Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP).....	12
5.2 Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)	13
5.3 Queratitis amibiana (QA).....	14
5.4 Acantamebiosis cutánea (AC).....	14
6. Epidemiología en México por AVL	15
III. ANTECEDENTES	17
1. Registros de amibas de vida libre en cuerpos de agua en el mundo	17
2. Registros de amibas de vida libre en cuerpos de agua en México.....	18
IV. JUSTIFICACIÓN	20
V. OBJETIVOS	22
1. General.....	22
2. Particulares	22
VI. ÁREA DE ESTUDIO	23
1. Ubicación de la zona de estudio	23

2.	Descripción general del balneario	24
VI.	MATERIAL y MÉTODOS	27
1.	Trabajo de campo	27
1.1	Recolecta y transporte de muestras	27
1.2	Registros de factores ambientales “ <i>in situ</i> ”	28
1.2.1	Temperatura del agua y atmosférica (°C)	28
1.2.2	pH	29
1.2.3	Conductividad (μS/cm).....	29
2.	Trabajo de laboratorio.....	29
2.1	Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre	29
2.2	Clonación	30
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
1.	Aislados amibianos	31
2.	Taxonomía, descripción y registro fotográfico.....	36
3.	Parámetros Fisicoquímicos	55
3.1	pH.....	55
3.2	Temperatura del agua.....	56
3.3	Temperatura atmosférica.....	57
3.4	Conductividad (μS/cm).....	58
3.5	Coliformes totales	58
4.	Índice de Jaccard.....	59
5.	Mexico y la Meningoencefalitis Amibiana Primaria.....	61
VIII.	CONCLUSIONES	62
IX.	BIBLIOGRAFÍA	65
X.	ANEXO	77

I. RESUMEN

Los casos de meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), queratitis amibianas (QA) y acantamebiosis cutánea (AC) ocasionados por Amibas de Vida Libre (AVL), a nivel mundial son frecuentes, mientras que en México estas enfermedades son casi desconocidas. Actualmente no se posee ninguna información acerca de reportes de estas enfermedades por AVL para el estado de Oaxaca lo que podría sugerir desconocimiento de la problemática.

Se realizó un estudio en el balneario natural “Hierve el Agua” ubicado en el municipio de San Lorenzo Albarradas, Oaxaca, el cual comprendió dos muestreos y donde se obtuvo un total de 40 muestras, 20 en cada muestreo, correspondientes a cuatro biotopos: biopelícula flotante, biopelícula adherida, sedimentos y muestra mixta de agua.

El primer muestreo se realizó en el mes de septiembre de 2012 (época de lluvia) en donde se aislaron un total de 19 especies de AVL pertenecientes a siete géneros, de las cuales ocho especies son reportadas como patógenas para el ser humano y el segundo muestreo en el mes de abril de 2013 (época de sequía), con un total de 18 especies pertenecientes a nueve géneros, siete de ellas reportadas como patógenas.

Durante el estudio no se observaron variaciones temporales y espaciales importantes de pH, temperatura y conductividad en el sistema acuático lo que indica una estabilidad de las condiciones ambientales, además de que se sitúan en un intervalo en el que las AVL pueden desarrollarse.

En conclusión la época del año con mayor probabilidad de exposición a las AVL potencialmente patógenas es durante épocas secas; además de que en el lugar no se cumple con la NORMA Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, donde los requisitos sanitarios y de calidad del agua que deben cumplir las albercas los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* deben estar ausentes.(Diario Oficial de la Federación, 2012)

II. INTRODUCCIÓN

1. Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoos de gran importancia médica y ecológica, constituyen un grupo muy extenso, tienen una distribución cosmopolita, se encuentran prácticamente en todo tipo de ambientes como casquetes polares, en el suelo y agua (Rivera *et al.*, 1979; Kyle y Noblet, 1986). Así mismo algunas especies pueden comportarse en ocasiones como parásitos facultativos y oportunistas. Por esta característica se les denomina también amibas anfizoicas, aludiendo a su capacidad de sobrevivir tanto en vida libre como en el interior de hospederos (Garaycochea *et al.*, 2008) .

En el agua desempeñan un papel fundamental en el flujo energético y en el reciclado de los nutrimentos son un enlace fundamental entre desintegradores y niveles tróficos superiores, convirtiéndose en un eslabón importante en el circuito microbiano acuático, se alimentan selectivamente de bacterias y materia orgánica, pudiendo controlar el número y la diversidad de estas especies en su fase trófica y al pasar a su estado quístico, pueden ser diseminados a la atmósfera (Fenchel, 1987; Sleight, 1989).

Además tienen la capacidad de establecer y estimular la producción de biopelículas mediante la adhesión a las superficies y secretar sustancias metabólicas tales como polisacáridos de glucosa y proteínas (Khan *et al.*, 2000), las cuales pueden ser desarrolladas en sustratos sólidos en contacto con el agua (biopelículas fijas) o en la interfase agua-aire (biopelículas flotantes) (Hsu *et al.*, 2011) lo que les permite interactuar con una gran cantidad de microorganismos (Khan, 2006), por ejemplo, *Legionella pneumophila*, una bacteria intracelular facultativa que es el agente causante de la legionelosis, coloniza las biopelículas lo que le proporcionan un ambiente rico para su replicación (Bigot *et al.*, 2013).

Algunas bacterias pueden beneficiarse de las interacciones con las AVL por su capacidad para resistir la digestión intracelular, así como la de poder crecer dentro la forma trófica de la amiba; también han sido descritos como vehículos de microorganismos patógenos incluyendo a *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae* (Astorga *et al.*, 2011). Además, se ha demostrado que la virulencia de las bacterias patógenas hacia su hospedero (amibas) puede también reflejarse en animales y humanos (Thomas *et al.*, 2009).

Las especies de AVL consideradas patógenas para el hombre comprenden solo cuatro géneros: *Balamuthia*, *Sappinia*, *Naegleria* y *Acanthamoeba* (Xuan *et al.*, 2008; Ledee *et al.*, 2009; Uribarrenn, 2014) estas son termotolerantes, tienen preferencia por los cuerpos de agua con temperaturas elevadas y se observan más frecuentemente en cuerpos de agua con temperaturas por arriba de los 25 °C, en las aguas naturales de los trópicos y subtrópicos, aguas termales y aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales. En países templados y fríos las amibas patógenas proliferan mejor durante los meses más cálidos, lo que lleva a pensar en un patrón estacional (Rondanelli, 1987; Rivera *et al.*, 1994). Algunos investigadores, han propuesto que el incremento brusco de temperatura atmosférica más que una temperatura elevada constante es lo que realmente favorece la predominancia de las naeglerias patógenas (Rodríguez, 1994; Pernin y Pelandakis, 2001), otros parámetros físicos y químicos del agua que las favorecen son: niveles óptimos de oxígeno, pH cercano a la neutralidad, alimento suficiente (bacterias y materia orgánica) y un mínimo de humedad; sin embargo, pueden soportar variaciones amplias en cualquiera de estos parámetros (Gallegos, 1997; Bonilla *et al.*, 2000; Smirnov y Thar, 2003).

2. Taxonomía

La clasificación taxonómica clásica dividió el reino Protozoa en cuatro grupos: Sarcodina (amibas), Mastigophora (flagelados), Sporozoa (protozoos parásitos) e infusorios (ciliados) (Visvesvara *et al.*, 2007). Esta taxonomía ha sido totalmente abandonada por la Sociedad Internacional de Protozoólogos por una basada en enfoques morfológicos modernos, las vías bioquímicas y filogenia molecular. De acuerdo a este nuevo esquema los eucariontes han sido clasificados en seis clusters o “súper grupos” llamados: Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata y Excavata. En cuanto a las AVL potencialmente patógenas según la nomenclatura actual han sido clasificadas en dos súper grupos, como puede observarse en la figura 1 (Adl *et al.*, 2005).



Figura 1. Clasificación de las AVL patógenas para el hombre según Adl *et al.*, 2005

3. Amibas de vida libre potencialmente patógenas

3.1 *Naegleria fowleri*

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 (MEAP); el gran daño tisular que provoca, han hecho merecedor a este protozoo del sobrenombre de “amiba come cerebro” (Tapia, 2012).

El ciclo de vida de *Naegleria fowleri* incluye una etapa de alimentación ameboide (trofozoíto), una de natación rápida temporal (ameboflagelado) y un quiste, que es una estructura de resistencia donde la amiba se encuentra en 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 (Fig.2) (Smirnov y Thar, 2003).

3.1.1 Características morfológicas

- Trofozoíto: Los trofozoítos corresponden a amébidos con forma limax que en preparaciones frescas miden de 15 a 25 μm de diámetro, tienen un citoplasma abundante vacuolado o granular, y un gran núcleo central, claro y esférico con un nucleólo esférico prominente y refringente (Oddó, 2006); se observa una vacuola contráctil y pequeñas vacuolas digestivas. Se desplaza a través de pseudópodos redondeados, o lobópodos, de tamaño variable y con frecuentes cambios de dirección, puede presentar uno o dos pseudópodos a la vez (Pérez de Galindo *et al.*, 2012); se le conoce como amiba “limax” que presenta un desplazamiento rápido.
- Estadio flagelar: Este estadio es transitorio, mide de 10 a 16 μm , su organelo de locomoción son de dos a diez flagelos, aunque ocasionalmente pueden encontrarse más flagelos (Oddó, 2006). Durante la fase flagelada la amiba no se divide ni alimenta (Tapia, 2012), puede evidenciarse el núcleo de las AVL, colocado siempre hacia el extremo anterior respecto a la dirección del movimiento y una vacuola contráctil colocada siempre hacia el extremo posterior, posición característica del género, es un estado transitorio (Pérez de Galindo *et al.*, 2012).

- Quiste: Son uninucleados, esféricos e inmóviles y además constituyen la forma de resistencia del parásito (Pereira y Pérez, 2003) mide de 8 a 12 μm de diámetro, con una pared doble lisa, con uno o dos poros planos (Bonilla *et al.*, 2007).

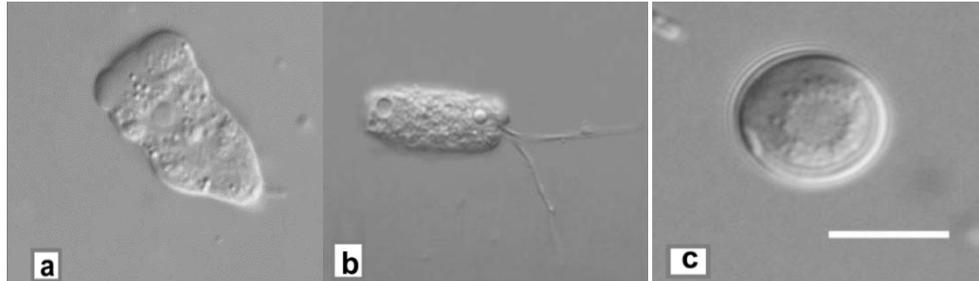


Figura 2. Etapas del ciclo de vida de *Naegleria fowleri*: trofozoíto (a) flagelado (b) y quiste (c) (John, 1993).

3.2 *Acanthamoeba* spp.

Las amibas del género *Acanthamoeba* se encuentran entre los organismos más ampliamente distribuidos en la naturaleza, pueden tolerar un amplio rango de osmolaridad, temperatura, salinidad, pH y pueden sobrevivir a 37 °C. En este género se encuentran especies que son potencialmente patógenas para el hombre tales como: *Acanthamoeba castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis* y *A. divionensis* (Marciano, 2003).

El género *Acanthamoeba* spp. puede ocasionar Queratitis Amibiana (QA), una infección crónica de la córnea con compromiso serio de la visión, principalmente en usuarios de lentes de contacto; Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) que afecta el sistema nervioso central y desencadena la muerte del paciente en pocos días; Acantamebosis Cutánea (AC) caracterizada por lesiones ulcerosas supurativas en la piel y sinusitis, sólo se presentan en individuos inmunocomprometidos (Gertiser *et al.*, 2010), también puede presentar patologías en otros órganos como el bazo, tiroides, etc.

3.2.1 Características morfológicas

- Trofozoíto: Es la fase en la que se divide y se sabe que es la etapa infecciosa (Fig.3a) (Da Rocha *et al.*, 2009), se caracteriza por la presencia de proyecciones espinosas superficiales llamadas acantópodos; el citoplasma es abundante y tiene un aspecto granular y vacuolar; además tienen un núcleo claro, central y esférico con un prominente y denso nucléolo redondeado (Oddó, 2006).
- Quiste: Los quistes son inactivos y protegen al organismo de ambientes nocivos (Fig.3b). Los quistes son resistentes a biocidas y cloración (Da Rocha *et al.*, 2009). Tienen dos paredes, el ectoquiste y el endoquiste. Aún se mantiene para efectos de la identificación taxonómica la clasificación definida por Pussard y Pons (1977), en la que el género *Acanthamoeba* se divide en tres grupos en base a las diferencias de tamaño y características morfológicas de los quistes (Cuadro 1).

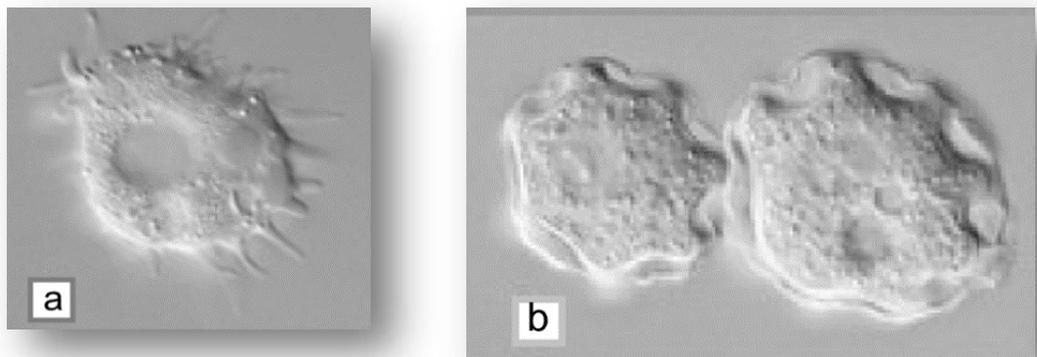
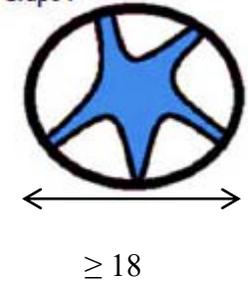
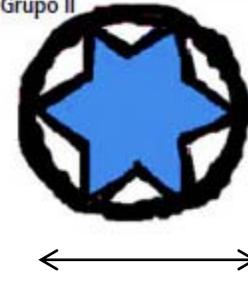
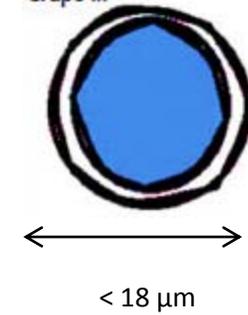


Figura 3. *Acanthamoeba* spp.: trofozoíto (a) y quiste (b) (John, 1993)

Cuadro1. Clasificación definida por Pussard y Pons para especies de género *Acanthamoeba* (1977).

<p>Grupo I</p>	<p>Grupo I</p> 	<p>Consiste de especies caracterizadas por grandes quistes y trofozoítos con endoquiste en forma estrellada y ectoquiste que puede ser liso o rugoso.</p>
<p>Grupo II</p>	<p>Grupo II</p> 	<p>Contiene amibas donde el ectoquiste es rugoso y grueso, mientras que el endoquiste puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado.</p>
<p>Grupo III</p>	<p>Grupo III</p> 	<p>El ectoquiste es delgado y ondulado mientras que el endoquiste es generalmente redondeado.</p>

3.3 *Balamuthia mandrillaris*

Esta amiba fue aislada originalmente del tejido cerebral de un babuino [*Papio sphinx* (Fig.4a)] que murió en el zoológico de San Diego (Marciano *et al.*, 2000). Hasta la fecha, se han descrito más de 100 casos de meningoencefalitis granulomatosa amibiana causada por este agente (Zúñiga *et al.*, 2011). Aunque *Balamuthia* ha sido descrita como una amiba de vida libre, sólo hay dos informes de su aislamiento en el medio ambiente; la distribución precisa, nicho, o fuente de alimento preferido de *B. mandrillaris* no se conoce. Puede haber varias explicaciones para esto, como que *B. mandrillaris* pueda ser menos abundante en el ambiente que otras amibas de vida libre, limitándose sólo a ciertos nichos ambientales, siendo difíciles de aislar y que sean organismos de lento crecimiento (Matin *et al.*, 2008).

3.3.1 Características morfológicas

- Trofozoíto: Mide de 15 a 60 μm de diámetro y tiene una característica estructura de ramificación irregular.
- Quiste: Mide de 10 a 30 μm , compuesto por tres paredes, una pared externa fina e irregular conocida como ectoquiste, una capa intermedia fibrilar conocida como mesoquiste, y una pared interior gruesa llamada endoquiste (Fig. 4b) (Matin *et al.*, 2008).

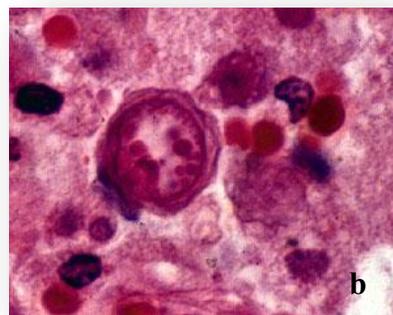


Figura 4. *Papio sphinx* (a) y quiste de *Balamuthia mandrillaris* en tejido cerebral (b)

3.4 *Sappinia diploidea*

El género *Sappinia* está ampliamente distribuido en el ambiente, ha sido aislado de heces, hojarasca, alces, bisontes, ganado y el recto de lagartos. *Sappinia* sp. no había demostrado ser patógena en humanos o animales experimentales ya que nunca fue implicado en una patología antes de reportarse el único caso humano de infección que involucró a un hombre de 38 años de edad inmunocompetente, el cual sobrevivió a la infección (Trabelsi *et al.*, 2012; Vélez *et al.*, 2013). En un principio, basándose en el criterio morfológico y de inmunofluorescencia la infección fue atribuida a *Sappinia diploidea* (Marciano, 2009), sin embargo, un estudio filogenético más reciente y exhaustivo indicó que esta cepa podría, de hecho, ser una nueva especie dentro de este género, que está más estrechamente relacionada con *S. pedata* (Trabelsi *et al.*, 2012).

3.4.1 Características morfológicas

- Trofozoíto: Mide de 40 a 80 μm , se caracteriza por la presencia de dos núcleos fuertemente opuestos, una locomoción monopodial y una superficie celular sin ninguna proyección subpseudopodial (Fig.5a).
- Quiste: Mide de 18 a 25 μm , está caracterizado por la formación de quistes bicelulares, que al parecer se reproducen sexualmente. Tienen doble pared y poros nucleares. Algunas células albergan bacterias endosimbiontes en vacuolas citoplasmáticas. Los quistes pueden sobrevivir al paso a través del estómago con su fluido gástrico, pero su presencia intestinal no es sinónimo de infección (Visvesvara *et al.*, 2007) (Fig.5b).

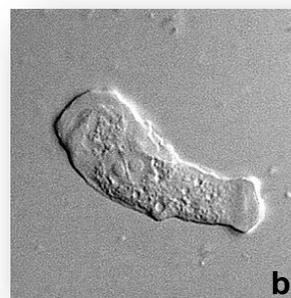


Figura 5. Quiste (a) *Sappinia* sp y trofozoíto (b) de *Sappinia* sp. Medical Care Development International, 2009.

4. Ciclo de vida.

Los ciclos de vida de *Acanthamoeba* spp. y de *Balamuthia* sp. presentan una forma vegetativa o trofozoíto y una forma quística, ambas formas se pueden encontrar en los tejidos del hospedero humano (Gallegos, 1997) que entran a través de un foco primario en piel o en el tracto respiratorio (senos paranasales, pulmón, etc.), por inhalación de aire, aerosoles y polvo que contengan quistes o trofozoítos; el acceso al SNC es por vía hematógica, a partir del neuroepitelio olfatorio (Peralta, 2009; Tapia, 2012).

Naegleria fowleri presenta tres estadios en su ciclo de vida, la infección inicia con la inhalación de agua o polvo que contienen trofozoítos o quistes, luego, a través de la mucosa nasal o piel, atraviesan el bulbo olfatorio y llegan al SNC (Tapia, 2012) (Fig.6).

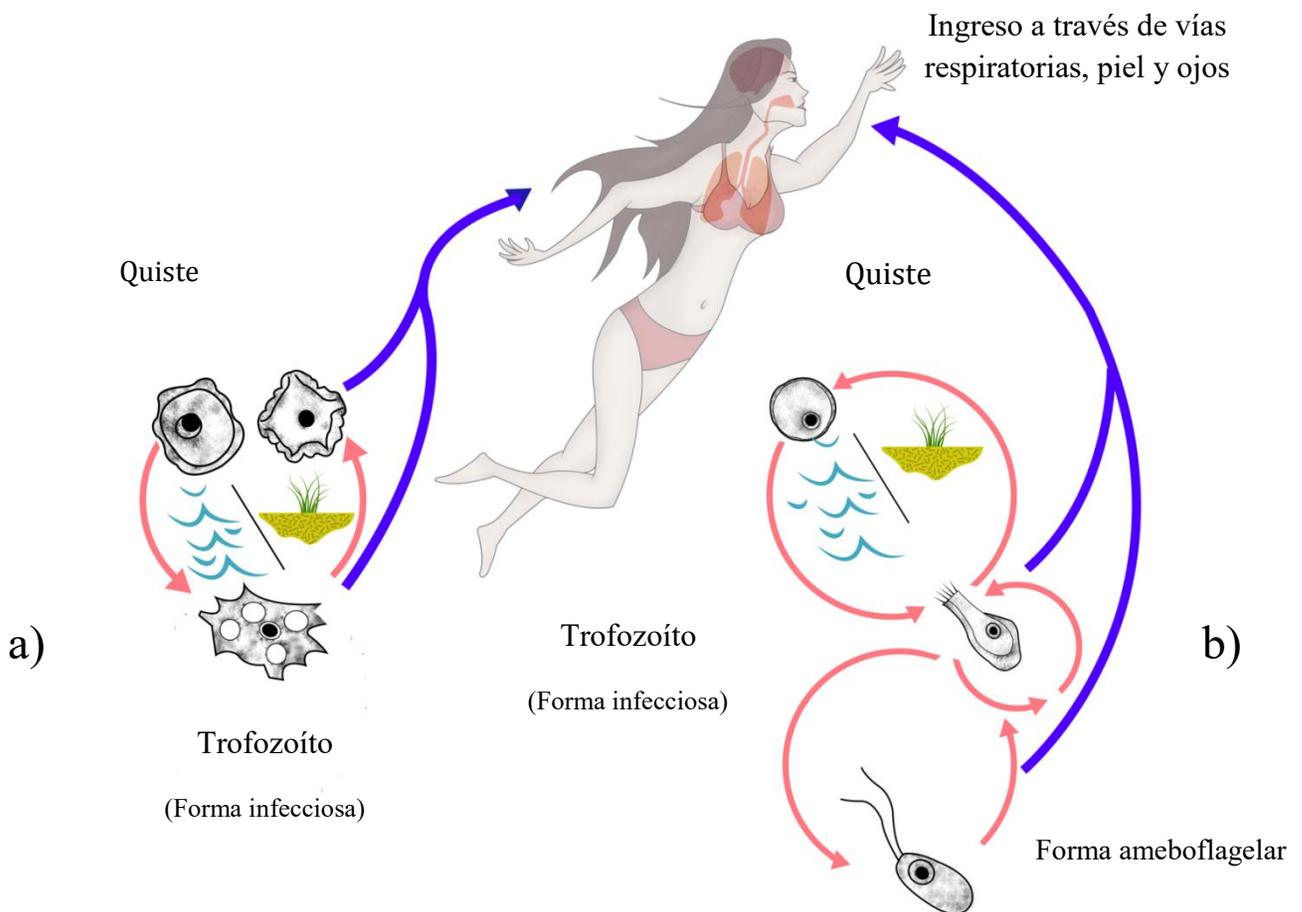


Figura 6. Esquema representativo del ciclo de vida de *Acanthamoeba* sp. (a) y *Naegleria* sp. (b).

5. Infecciones amibianas del sistema nervioso

Del total de especies conocidas de AVL sólo un grupo muy restringido es responsable de infecciones oportunistas y no oportunistas en humanos y otros animales incluyendo a los géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia* y *Sappinia* (Trabelsi *et al.*, 2012).

Estos organismos son capaces de producir infecciones en el sistema nervioso central (SNC), como la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) y la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) (Garaycochea *et al.*, 2008), así como infecciones en la piel como la acantamebiosis cutánea (AC) y en los ojos como la queratitis amibiana (QA).

5.1 Meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP)

El agente causal de la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) es *Naegleria fowleri*; esta ocurre de manera más típica en niños inmunocompetentes y adultos jóvenes (Visvesvara *et al.*, 2007) y ocasiona la muerte en un lapso de 3 a 7 días después de haberse adquirido la infección. La mayoría de los casos han tenido como antecedente la natación en época calurosa de personas sanas y jóvenes. Casi todos los casos de MEAP han sido diagnosticados *post mortem*, con excepción de algunos reportes en México, Inglaterra, Australia y los Estados Unidos (Rondanelli, 1987). La MEAP sigue un curso agudo caracterizado por meningitis hemorrágica, el cuadro clínico tiene un inicio súbito, con curso rápido y fulminante, caracterizado por cefalea frontal, bitemporal intensa, fiebre (38 a 40 °C), náusea, vómito (proyectil) y signos de irritación meníngea: rigidez de nuca (signos de Kernig y Brudzinski), encefalitis, fotofobia, edema cerebral, convulsiones, hipertensión intracraneal, progreso rápido a letargia, confusión y coma. La gran mayoría de los pacientes mueren aproximadamente a las 48 ó 72 horas (o hasta una semana después) del inicio del cuadro, principalmente por paro cardiorrespiratorio y edema pulmonar (Dirección General de Epidemiología, 2012).

5.2 Encefalitis amibiana granulomatosa (EAG)

La encefalitis amibiana granulomatosa sigue un curso más subagudo o crónico, en que la afectación de la piel y las lesiones metastásicas cerebrales son las características más sobresalientes (Seas y Bravo, 2006). La vía de entrada e invasión al SNC es hematógena, con el foco primario en la piel o en el tracto respiratorio (pulmón), por inhalación de aire, aerosoles y polvos que contengan quistes o trofozoítos, en pacientes con enfermedad crónica o inmunocomprometidos. Se desconoce el periodo de incubación. El cuadro clínico es de inicio insidioso, caracterizado por cambios neurológicos debidos a una masa ocupante, única o múltiple en el cerebro; se puede presentar hemiparesia, cambios en la personalidad, somnolencia, convulsiones, cefalea de tipo insidioso, fiebre esporádica (bajos grados), y rigidez de la nuca en la mayoría de los casos; la náusea, el vómito y la letargia pueden ser manifestaciones tempranas de la infección. Algunos pacientes pueden presentar parálisis de los nervios craneales (principalmente el III y el VI), ataxia cerebral y coma. A menudo la muerte se presenta por bronconeumonía (Dirección General de Epidemiología, 2012). A pesar del nombre de encefalitis granulomatosa, el componente granulomatoso puede ser irrelevante o estar ausente.

Varias especies del género *Acanthamoeba* y *B. mandrillaris* representan a agentes oportunistas que causan el cuadro denominado encefalitis amibianas granulomatosa (EAG). 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 *Hartmannella* (Oddó, 2006). Así mismo en el mundo sólo ha sido reportado un caso de encefalitis amibiana causada por *Sappinia* sp. (Qvarnstrom *et al.*, 2009).

5.3 Queratitis amibiana (QA)

La queratitis amibiana (QA) corresponde a un proceso inflamatorio crónico activo producido por *Acanthamoeba* spp. que afecta la córnea y a veces la conjuntiva y otras estructuras oculares, asociado en ocasiones al antecedente de un traumatismo corneal y la exposición a agua contaminada (Oddó, 2006). Es una enfermedad difícil de diagnosticar y tratar, ya que las manifestaciones clínicas se confunden a menudo con las de la queratitis herpética, fúngica, microbacteriana o viral, lo que provoca que el diagnóstico correcto y el comienzo del tratamiento se retrasen semanas o meses (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). Hallazgos recientes implican al genotipo T4 principalmente *A. castellanii* en el 94% de los casos como agente etiológico de la queratitis de origen amibiano (Booton *et al.*, 2009).

5.4 Acanamebiosis cutánea (AC)

La acantamebiosis cutánea (AC) es una infección inusual oportunista de la piel producida por amebas de vida libre del género *Acanthamoeba*; puede ser una lesión primaria de la piel o manifestación secundaria de una infección extracerebral diseminada, algunos casos son claramente primarios, también puede ocurrir una diseminación hematogena en un cuadro de EAG típico, con puerta de entrada en el tracto respiratorio inferior. En algunos casos las manifestaciones de la lesión cutánea anteceden a las de la invasión del SNC, incluso con la epidermis intacta en varios enfermos y la presencia de trofozoítos y quistes en las zonas dérmicas inflamadas. Otros pacientes muestran lesiones ulceradas con abundante exudado purulento. La acantamebiosis ocular también se puede difundir en el sistema nervioso central y causar encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), que suele ser mortal (Paltiel *et al.*, 2004; Oddó, 2006; D'Auria *et al.*, 2012).

6. Epidemiología en México por AVL

Hasta diciembre del año 2008, fueron diagnosticados 34 casos de MEAP (Cuadro 2), en los años siguientes según la Dirección General de Epidemiología en la República Mexicana la tendencia durante los años 2008 a 2014 ha presentado variaciones (Cuadro 3), con respecto a la EAG diez casos: Riestra-Cañeda y colaboradores (1987) efectuaron el diagnóstico de cuatro casos *post mortem* causados por *B. mandrillaris* en Guadalajara, Jalisco. Posteriormente, Uribe-Uribe (2001) reportó seis casos más, dos del Distrito Federal, uno del Estado de México, dos de Guanajuato y uno de Puebla.

Cuadro 2. Casos humanos de meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) en la República Mexicana (Tapia, 2012).

Caso	Fecha	Edad	Sexo	Días 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	Cultio	BC.
23	ago-92	13	M	16	LCR	BC.
24	sep-92	9	M	?	LCR	BC.
25	jul-94	13	M	10	LCR	Tamps.

Casos	Fecha	Edad	Sexo	Días infección	Dx	Entidad federativa
26	jul-98	11	M	?	LCR	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.
						BC.
*31	2003	9	M	?	Cultivo	(Mexicali)
*32	2005	20	M	?	Cultivo	Sonora
						BC.
*33	jul-06	8	M	?	Cultivo	(Tijuana)
*34	may-08	12	M	?	Cultivo	Hidalgo

Cuadro 3. Casos humanos de meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) en la República Mexicana hasta el año 2014.

Fecha	Edad	Sexo	Entidad federativa
Agosto-2009	20-24	M	BC
Marzo- 2012	50-59	F	Edo. de Méx
Septiembre-2013	60-64	F	Hidalgo
Mayo-2014	5-9	M	DF
Junio-2014	15-19	M	BC
Julio-2014	15-19	M	BC
Julio-2014	45-49	M	Edo. de Méx

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

III. ANTECEDENTES

1. Registros de amibas de vida libre en cuerpos de agua en el mundo

- Los primeros reportes sobre amibas de vida libre a nivel mundial, fueron realizados por Culbertson y cols., (1958) quienes establecieron por primera vez el potencial patógeno y características de *Acanthamoeba* spp., posteriormente De Jonckheere (1979) realizó un trabajo en 16 piscinas públicas en Bélgica demostrando que el género *Acanthamoeba* fue el más frecuentemente encontrado debido probablemente a la gran resistencia conferida por sus quistes.
- Kyle y Noblet (1986), determinaron la distribución de amibas relacionándola con parámetros ambientales en los lagos Issaqueena y Willard's, en Estados Unidos.
- John y Howard (1995), realizaron un estudio sobre la distribución estacional de AVL en el que obtuvieron 2016 muestras de agua del río Oklahoma; las amibas patógenas identificadas fueron: *Naegleria australiensis* (38%), *Acanthamoeba* sp. (35%), *N. fowleri* (18%) y *Leptomyxa* sp. (9%).
- Ettinger y cols. (2003), realizaron un estudio sobre la distribución de AVL en el río James, Virginia, EUA, analizando diversos factores fisicoquímicos como temperatura del agua, pH, oxígeno disuelto y coliformes fecales, logrando correlacionar la permanencia de las AVL con la presencia de coliformes fecales y aislaron de la columna de agua y sedimento cinco géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia* y *Vannella*, siendo *Naegleria* y *Vannella* los géneros amibianos más frecuentemente aislados.
- Muñoz y cols. (2003), analizaron en Santiago de Chile un total de ocho piscinas públicas de las cuales cinco resultaron positivas a las AVL, la amiba patógena, que

se encontró con mayor frecuencia fue el género *Naegleria* con un 7.8% y para *Acanthamoeba* un 4.7%.

- Lorenzo–Morales y cols. (2005), en Tenerife, España, analizaron muestras de agua de uso potable y agua de mar e identificaron a *Acanthamoeba* como el organismo más frecuentemente aislado; además registraron que el potencial patógeno de esta amiba se incrementó principalmente por las temperaturas elevadas y la osmolaridad.
- Guisasola (2011), llevó a cabo un análisis retrospectivo descriptivo de casos de abscesos corneales por *Acanthamoeba* spp. confirmados por laboratorio en un periodo de 18 meses (abril de 2009 a septiembre de 2010), en el Hospital Oftalmológico Santa Lucia, Buenos Aires, Argentina.

2. Registros de amibas de vida libre en cuerpos de agua en México

- En México los primeros estudios sobre AVL comenzaron con los trabajos de Rivera y cols. (1978), en muestras de piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México, encontrando una gran diversidad de AVL.
- Rivera y cols. (1993), estudiaron la presencia de AVL en albercas para fisioterapia en la Ciudad de México, en el que registraron al género *Acanthamoeba* como el más frecuente en las épocas de primavera y verano.
- Gallegos (1997), realizó un estudio sobre amibas de vida libre con potencial patógeno en la Huasteca Potosina en el estado de San Luis Potosí, en donde encontró seis géneros: *Acanthamoeba*, *Echinamoeba*, *Hartmannella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia* y *Willaertia* relacionando su presencia con varios parámetros ambientales, concluyendo que los que más influencia tuvieron sobre el crecimiento y distribución de las amibas fueron la temperatura del agua y materia orgánica.

- Lares-Villa y cols. (2001), aislaron e identificaron en cuerpos de agua de uso recreativo de Hermosillo, Sonora cinco géneros, cuyas frecuencias fueron: *Acanthamoeba* (48%), *Hartmannella* (41%), *Willaertia* (3.6%), *Platyamoeba* (3.6%) y *Naegleria* (3.6%).
- Lares-Jiménez y Lares-Villa (2009) aislaron e identificaron morfológicamente 11 géneros de AVL en aguas superficiales de la región del Valle del Mayo, Sonora. El número y frecuencia de cepas de los distintos géneros de AVL aislados variaron con respecto a la temperatura de aislamiento, predominando los géneros termofílicos y un mayor número de cepas mesofílicas.

IV. JUSTIFICACIÓN

Los casos de meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), queratitis amibianas (QA) y acantamebiosis cutánea (AC) ocasionados por Amibas de Vida Libre, a nivel mundial son frecuentes, mientras que en México estas enfermedades no lo son. Actualmente no se posee ninguna información acerca de reportes de estas enfermedades por AVL para el estado de Oaxaca lo que podría sugerir desconocimiento de la problemática al respecto. Sin embargo, es importante mencionar que, debido a la falta de conocimiento entre los médicos y los laboratoristas clínicos, un número de casos de infecciones debidas a las AVL podrían estar subdiagnosticados pudiendo pasar desapercibidas y reportando a los pacientes como enfermos debido a otros agentes patógenos como bacterias, virus, hongos y cisticercos, aún cuando el diagnóstico clínico pueda indicar la ausencia de estos microorganismos (Gallegos, 1997).

En el municipio de San Lorenzo de Albarradas en el estado de Oaxaca se ubica un balneario muy popular que se abastece de agua no termal, pero con temperaturas que alcanzan los 27 °C que proviene de un sistema de origen natural. A este balneario asisten niños, jóvenes y adultos mayores de diferentes zonas del país para llevar a cabo actividades recreativas y de sanación.

Considerando que las AVL se encuentran ampliamente distribuidas en cuerpos de agua de casi cualquier tipo, ya que son uno de los grupos de protistas con mayor distribución en la naturaleza debido a la gran resistencia conferida por sus quistes y que las condiciones ambientales del balneario “Hierve el Agua” pueden constituir un ambiente propicio para el asilamiento de AVL potencialmente patógenas , el que usuarios que puedan estar en contacto con estos organismos oportunistas podría representar un riesgo para la salud y causar severas infecciones en las personas que incluso las puedan llevar a la muerte.

Se efectuó por primera vez un monitoreo para demostrar la presencia de géneros amibianos potencialmente patógenos en Oaxaca, en el balneario “Hierve el Agua” lo que representa un potencial riesgo para los usuarios de este centro de recreo acuático natural. Lo anterior

realza la importancia en la detección de estos protistas en balnearios de aguas termales y no termales con una alta densidad de visitantes, sobretodo en épocas vacacionales que coinciden con los meses mas calurosos y hacer cumplir la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010 requisito sanitario y de calidad del agua que deben cumplir las aguas recreativas de contacto directo y que contempla en estas la ausencia de las amibas patógenas *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* con sus 11 especies patógenas al humano.

V. OBJETIVOS

1. General

- Aislar e identificar amibas de vida libre potencialmente patógenas en el agua del balneario natural del centro ecoturístico “Hierva el Agua” en el municipio de San Lorenzo de Albarradas, estado de Oaxaca en dos épocas del año (seca y lluvia).

2. Particulares

- Aislar y cultivar amibas de vida libre potencialmente patógenas a partir de muestras del agua de piscinas del balneario.
- Ubicar taxonómicamente a través de sus características morfológicas a las amibas de vida libre patógenas presentes.
- Registrar y relacionar los factores fisicoquímicos y bacteriológicos (temperatura del agua, temperatura atmosférica, conductividad, pH y coliformes totales) con la presencia de amibas de vida libre.
- Determinar la distribución estacional de AVL en los cuerpos de agua del centro recreativo para identificar la época del año con mayor probabilidad de exposición a las AVL potencialmente patógenas.
- Ubicar las pozas donde se encuentran las amibas de vida libre potencialmente patógenas que representan un peligro para la salud pública y emitir recomendaciones preventivas para los usuarios y administradores del balneario.

VI. ÁREA DE ESTUDIO

1. Ubicación de la zona de estudio

Las cascadas de “Hierve el Agua” se ubican a 70 km al oriente de la ciudad de Oaxaca a $16^{\circ} 51' 56.43''$ N y $96^{\circ} 16' 32.43''$ O, en la población de San Isidro Roaguía en el Municipio de San Lorenzo Albarradas en el distrito de Tlacolula, a una altitud de 1720 msnm (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, gobierno del estado de Oaxaca, 2002) (Fig.7).



Figura. 7 Ubicación del área de estudio (Google maps, 2015)

2. Descripción general del balneario

Estas estructuras son conocidas como “cascadas de sal” o “cascadas petrificadas”, formadas por agua sobresaturada de carbonato de calcio que brota de pequeñas grietas o fisuras de los cuerpos de caliza de la formación Tepozcolula (Cretácico Superior), formando ojos de agua y manantiales de agua que, al escurrir por un escarpe de más de 200 m de profundidad, van configurando grandes estalactitas semejantes a las que se forman en las grutas (Fig. 8).



Figura 8. Cascadas petrificadas en el centro ecoturístico de “Hierve el Agua”, estado de Oaxaca

El nombre del lugar “Hierve el Agua”, sugiere la presencia de aguas termales, pero en realidad su temperatura varía entre los 22 y 27 °C, es agua naturalmente carbonatada que contiene una cantidad anormalmente alta de gas de dióxido de carbono disuelto, derivado del magma, desde la metamorfosis de la piedra caliza o de otros procesos complejos. Bajo

tierra, el agua se confina bajo gran presión, lo que mantiene el gas; en “Hierve el Agua”, las fracturas en la roca proporcionan vías de escape, lo que permite al agua subterránea salir a la superficie rápidamente y la repentina liberación de presión provoca la efervescencia liberando burbujas de gas que crean pequeños géiseres y hacen que el agua de manantial pareciera que hierve (Caran y Neely, 2006).

En la explanada denominada “El Anfiteatro”, se localizan cuatro manantiales, con un flujo considerable en época de lluvia y en época de estiaje la cantidad de agua que brota se reduce. Tres de ellos vierten su agua en dos pozas, mientras que el otro se encuentra a unos 300 m al sureste de “El Anfiteatro” y es el que forma la “cascada petrificada”. El agua contenida en las pozas adquiere una tonalidad verde turquesa, debido a la cantidad de minerales disueltos que contiene (Fig. 9).



Figura 9. Pozas en el balneario de “Hierve el Agua”, estado de Oaxaca fotografía tomada durante época de lluvia (a) y fotografía tomada durante época de sequía (b).

El agua en su constante fluir, precipita la calcita en la parte externa de la oquedad, de esta manera la estalactita adopta una forma cónica anillada irregular. Este proceso es posible verlo en las paredes de las albercas con precipitaciones de calcita en forma corrugada (Malpica, 2003).

Las características de su agua, la belleza natural y el sitio arqueológico han permitido que sea un sitio de interés ecoturístico. La única cascada similar es la de Pamukkale, situada en Turquía (National Geographic, 2012).

El sitio no solamente atrae turistas debido a su belleza y rareza; muchos geólogos son atraídos por la caprichosa formación de la cascada y las pendientes de los manantiales. Asimismo, arqueólogos visitan este hermoso lugar por su importancia en la agricultura local; “Hierve el Agua” es un intrincado sistema de riego basado en canales provenientes de manantiales construidos y operados desde hace más de 2,500 años. Se ha determinado que este sistema de riego, único en México, y el uso de terrazas para maximizar el aprovechamiento del escurrimiento del agua en las pendientes naturales es muy antiguo. Se cree también que “Hierve el Agua” fue probablemente un sitio ceremonial zapoteca, debido a la belleza y a los abruptos contrastes en el mismísimo corazón de la Sierra (Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, gobierno del estado de Oaxaca, 2002).

La vegetación que rodea al balneario está compuesta por diferentes especies de encinos, además de variadas cactáceas como: tetechos, nopales y biznagas; además, aquí abundan los magueyes y los agaves espadín y tobalá que se utilizan para la producción del mezcal (Fig.10) (Instituto de Geología, UNAM, 2012).



Figura 10. Vegetación en “Hierve el Agua”.

VI. MATERIAL y MÉTODOS

Se llevaron a cabo dos muestreos en colaboración con la Universidad Autónoma “Benito Juárez” de Oaxaca (UABJO) en el centro ecoturístico “Hierve el Agua”, el primer muestreo se efectuó durante el mes de septiembre de 2012 (época de lluvia) y el segundo a finales del mes de abril de 2013 (época de sequía).

1. Trabajo de campo

1.1 Recolecta y transporte de muestras

En cada muestreo se recolectaron 20 muestras, un total de 40 para ambos muestreos, del agua proveniente de los cuatro cuerpos de agua del lugar (Fig.11), que incluyeron diferentes biotopos para cada uno de ellos y que fueron:

- a) Biopelícula Flotante (**Bf**) (Recolección manual)
- b) Biopelícula adherida (**Ba**) (Recolección por raspado de la superficie de la pared interior)
- c) Sedimento (**S**) (Recolección manual)
- d) Muestra mixta de agua de superficie, a media profundidad y del fondo (**Mm**) (Recolección manual)

La toma de muestras de agua, biopelículas y sedimento se efectuó en tubos estériles de polipropileno (NALGENE) de boca ancha de 100 y 1000 ml



Figura 11. Referencia geográfica de los sitios de muestreo, donde con los número del uno al cinco se marca la ubicación de las cinco pozas, mientras que la dirección de la flecha indica la fluctuación del agua (Google earth, 2015).

1.2 Registros de factores ambientales “*in situ*”

Para comprobar la posible relación de los factores ambientales y la presencia de amibas, se hicieron las siguientes determinaciones en el balneario: temperatura del agua y atmosférica ($^{\circ}$ C), pH y conductividad (μ S/cm).

1.2.1 Temperatura del agua y atmosférica ($^{\circ}$ C)

Se registró la temperatura del agua y la temperatura atmosférica con un termómetro digital HANNA modelo H19040; para los valores del agua se sumergió el electrodo a una profundidad de 15 cm aproximadamente con el tiempo necesario para que el electrodo se estabilizara y en el caso de la temperatura ambiental el electrodo se expuso al ambiente y de igual forma se dejó estabilizar para poder tomar la lectura.

1.2.2 pH

El registro se efectuó el registro de pH con un potenciómetro pH/EC/TDS Waterproof Hanna Instruments. De igual manera se introdujo el electrodo al agua, se dejó estabilizar y se tomó la lectura.

1.2.3 Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)

El parámetro de conductividad tiene una estrecha relación con la temperatura a la que se está tomando el registro, por lo que las lecturas obtenidas se ajustaron a un factor de corrección de 25 °C (Arredondo y Ponce, 1998) y se registró con un potenciómetro pH/EC/TDS Waterproof Hanna Instruments.

2. Trabajo de laboratorio

Las muestras de agua fueron transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Investigación en Patógenos Emergentes (LIPE) de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) de la FES-Iztacala UNAM, para su procesamiento.

2.1 Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre

Biopelícula y sedimentos. De cada muestra de agua, biopelículas y sedimento se tomaron alícuotas de 50 mL se concentraron por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min (centrífuga Boeco-U32) (De Jonckheere, 1979).

Se decantó el sobrenadante hasta dejar un volumen final aproximado de 0.5 ml y el sedimento se suspendió y se vació en una caja de Petri con agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* medio monoxénico (NNE) (De Jonckheere, 1979). La observación de las placas de medio no nutritivo con *E. aerogenes* (NNE) se realizó con un microscopio invertido para verificar el crecimiento amebiano, revisándolas al siguiente día. En las cajas de Petri con amibas se marcó la zona de mayor abundancia,

se cortó un trozo de agar de aproximadamente 5 mm², y se transfirió a otra placa (NNE) nueva y se mantuvo a la temperatura ambiente en posición invertida dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación; se etiquetó cada caja según el sitio de muestreo (Gallegos,1997)

2.2 Clonación

Transcurridas 24 h de incubación se separaron los trofozoítos y se hicieron las resiembras necesarias con el objeto de aislar y separar las especies amibianas presentes en los cultivos. La identificación de los aislados amibianos se realizó tomando en cuenta los criterios morfológicos de los quistes y trofozoítos, mediante el uso de claves taxonómicas y los atlas de amibas de vida libre elaborados por Page (1988) y Pussard y Pons (1977). Las muestras fueron tomadas haciendo un barrido con solución salina y fueron colocadas en portaobjetos para ser observadas en el microscopio Nikon Eclipse TS100 invertido en contraste de fases a 10, 20 y 40x, se procedió a tomar un registro fotográfico con cámara fotográfica Nikon coolpix 9.

2.3 Índice de Jaccard

Se utilizó el índice de Jaccard o coeficiente de Jaccard para medir el grado de similitud entre los cuerpos de agua, así como entre temporadas. (Chao *et al.*, 2004)

2.4 Coliformes totales

Se realizó un análisis de medición de coliformes fecales totales en cada sitio de muestreo por medio de nmp (APHA. 2005).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Aislados amibianos

EL primer muestreo del estudio se realizó el mes de septiembre del 2012 (época de lluvia) y el segundo muestreo el mes de abril del 2013 (época seca), obteniéndose un total de 40 muestras, 20 en cada muestreo, correspondientes a cuatro biotopos: biopelícula flotante, biopelícula adherida, sedimentos y muestra mixta de agua.

Durante el primer muestreo se obtuvo un 90% (18 muestras) (Cuadro 6) de aislados positivos para AVL, identificándose 13 especies pertenecientes a cinco géneros (Cuadro 4).

Cuadro 4. Géneros y especies amibianas aisladas en el primer muestreo, época de lluvia.

Géneros	Especies
<i>Acanthamoeba</i>	<i>Acanthamoeba astronyxis</i> <i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba palestinensis</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba rhysodes</i> <i>Acanthamoeba triangularis</i> <i>Acanthamoeba sp.</i>
<i>Naegleria</i>	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Naegleria gruberi</i>
<i>Thecamoeba</i>	<i>Thecamoeba sp.</i>
<i>Vannella</i>	<i>Vannella simplex</i>
<i>Vahlkampfia</i>	<i>Vahlkampfia sp.</i>

Durante el segundo muestreo se obtuvo un 65% (13 muestras) de aislados positivos para AVL; identificándose un total de 18 especies pertenecientes a 9 géneros (Cuadro 5).

Cuadro 5. Géneros y especies amibianas aisladas durante época de sequía.

Géneros	Especies
<i>Acanthamoeba</i>	<i>Acanthamoeba astronyxis</i> <i>Acanthamoeba castellanii</i> <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> <i>Acanthamoeba griffini</i> <i>Acanthamoeba palestinensis</i> <i>Acanthamoeba polyphaga</i> <i>Acanthamoeba rhyodes</i> <i>Acanthamoeba triangularis</i> <i>Acanthamoeba</i> sp.
<i>Echinamoeba</i>	<i>Echinamoeba</i> sp.
<i>Hartmannella</i>	<i>Hartmannella</i>
<i>Naegleria</i>	<i>Naegleria fowleri</i> <i>Naegleria gruberi</i>
<i>Rosculus</i>	<i>Rosculus ithacus</i>
<i>Saccamoeba</i>	<i>Saccamoeba</i> sp.
<i>Thecamoeba</i>	<i>Thecamoeba</i> sp.
<i>Vannella</i>	<i>Vannella platypodia</i> <i>Vannella simplex</i>
<i>Vahlkampfia</i>	<i>Vahlkampfia</i> sp.

En la figura 12 se puede observar la proporción de géneros amibianos aislados en la época de lluvia, siendo *Acanthamoeba* el género predominante seguido de *Naegleria*, ambos géneros de importancia médica, esto puede ser debido al carácter cosmopolita, además de

que tanto *Acanthamoeba* como *Naegleria* tienen un estado quístico el cual es relativamente resistente, en el caso de *Acanthamoeba*, los quistes secos pueden sobrevivir por varios años y pueden ser regularmente aislados del polvo e incluso del aire y son de gran importancia en la identificación de las especies del género; los quistes de *Naegleria* pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo si se mantiene húmedos (Warhust, 1985). Así mismo cabe mencionar que en todos los sitios de muestreo hubo presencia de AVL esto porque todos los cuerpos son alimentados por el mismo ojo de agua, aunque el segundo y cuarto sitio fueron aquellos que presentaron una mayor riqueza de especies, esto podría explicarse que al ser los cuerpos de agua más grandes y atractivos para los turistas, hay una mayor interacción con los suelos donde las amibas de vida libre son más abundantes (Greub y Raoult, 2004) y los demás cuerpos de agua, de la misma forma en casi todas las muestras hubo presencia de amibas (Cuadro 6), esto podría deberse a que durante el mes de septiembre la precipitación pluvial promedio del mes fue de 219.5 mm³ (CONAGUA, 2012) y al ser cuerpos de agua con poca profundidad, el aire y el agua tienen un impacto en este, lo que puede llevar a que haya una mezcla del agua superficial y de la columna del agua provocando que las amibas se encuentren también en esta, incluso en forma trófica en formas llamadas “flotantes”, cabe destacar que en las muestras que tuvieron una mayor riqueza de especies amibianas, refieren a biopelículas que son un conjunto de células microbianas que se encuentran en una matriz de polisacárido principalmente, que les proporciona, protección contra depredadores y amortiguan cambios de pH, temperatura, osmolaridad entre otros factores fisicoquímicos (Chang *et al.*, 2010; Kokare *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009).

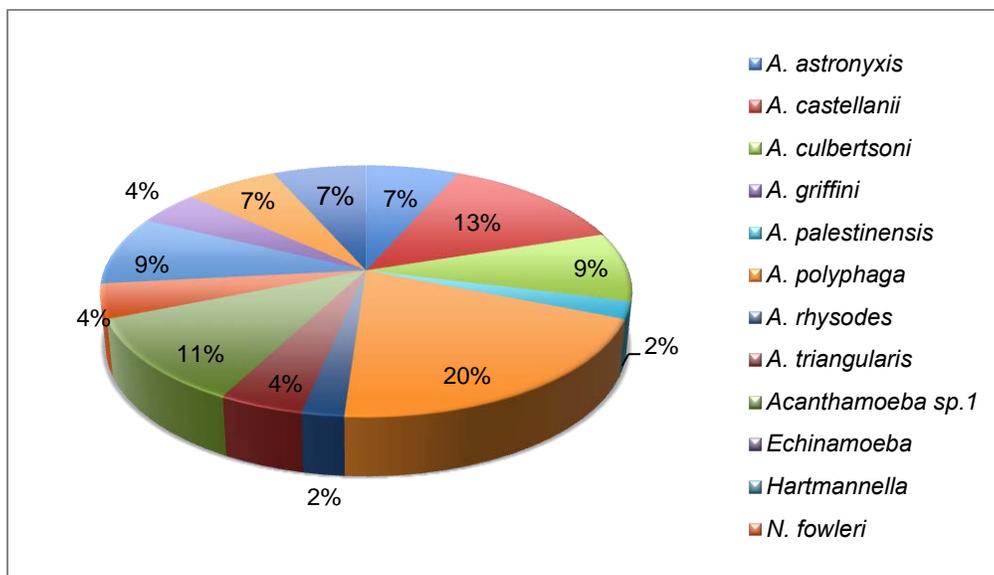


Figura 12. Proporción de géneros amibianos encontrados en época de lluvia en los cuatro sitios de muestreo.

Durante la época seca los géneros predominantes fueron: *Acanthamoeba* y *Naegleria* (Fig. 13); además de que se puede observar un aumento en la riqueza específica, esto puede deberse a que hubo una mayor densidad de biopelículas en comparación al primer muestreo ya que la precipitación pluvial media fue de 13.6 mm, por lo que la corriente de agua pudo verse disminuida a comparación del primer muestreo permitiendo la formación de biopelículas más densas ya que el agua está confinada, acumulándose materia orgánica; condiciones que favorecen la presencia biopelículas en donde las AVL encuentran las condiciones óptimas para su desarrollo (Bonilla *et al.*, 2010).

Al igual que en el primer muestreo en todos los sitios hubo presencia de amibas y como puede observarse durante esta ocasión en todos los cuerpos de agua hubo una cantidad considerable de aislados positivos esto pudo ser ocasionado a que durante la época de primavera hay una mayor afluencia de visitantes aumentando la interacción con los suelos donde las amibas de vida libre son más abundantes (Greub y Raoult, 2004) y aumenta la temperatura ambiental y en consecuencia la del agua y biopelículas. Durante el muestreo no hubo presencia (Cuadro 7) en la columna de agua, ya que, aunque las AVL son habitantes comunes en el suelo y agua (Sleigh, 1989) en los medios acuáticos viven adheridas a

partículas flotantes, en sedimentos y en menor cantidad en la columna de agua (Kyle y Noblet, 1986).

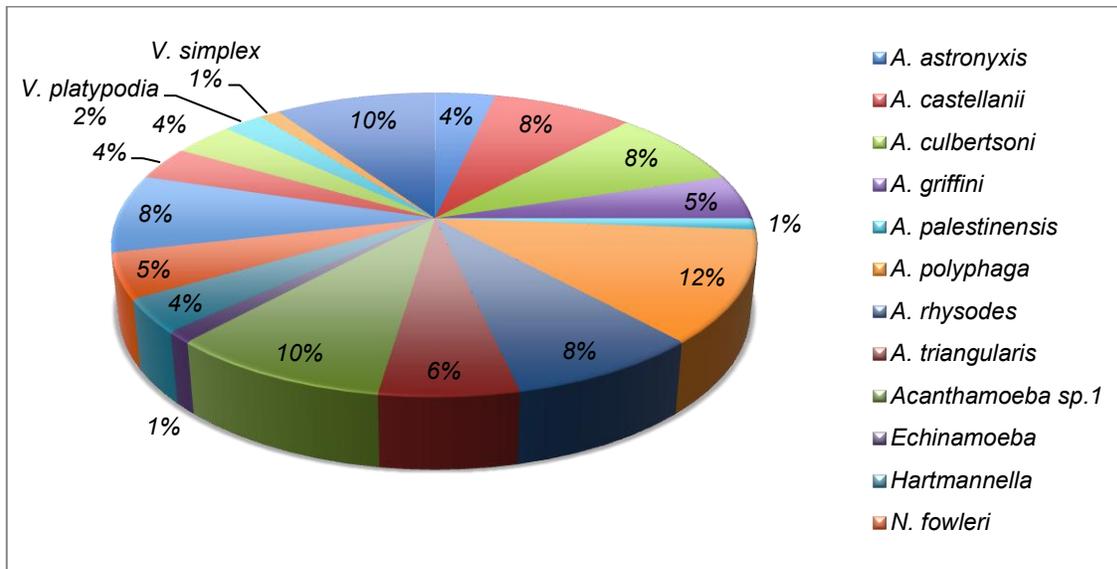


Figura 13. Proporción géneros amibianos encontrados en el segundo muestreo en los cuatro sitios de muestreo

Cabe mencionar que, de las amibas detectadas, *Hartmannella*, *Vannella* y *Vahlkampfia* se han encontrado asociadas a casos de encefalitis y queratitis en humanos, pero no se ha comprobado su papel como agentes causantes de dichas enfermedades (Ramírez *et al.*, 2009).

Según la NORMA Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, los requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas, los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* deben estar ausentes esto con la finalidad de prevenir y minimizar riesgos a la salud por ingestión, contacto e inhalación del microorganismos, el tener presencia de estos géneros durante ambas épocas, en cada sitio y cada muestreo indica que estos cuerpos de agua no deberían tener uso recreativo, lo que nos muestra el deficiente control y vigilancia de las condiciones sanitarias de operación y mantenimiento del lugar por parte de las autoridades de la Secretaría de Salud.

2. Taxonomía, descripción y registro fotográfico

La identificación morfológica de los aislados obtenidos se realizó en base a los criterios establecidos en las claves taxonómicas de Page (1988) y Pussard y Pons (1997). Todos los aislados fueron observados en fresco al microscopio óptico, en cuanto a los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria* las características de los quistes son cruciales para su identificación además de su forma trófica, mientras que para los demás géneros las características son sólo la forma trófica.

Fotografías tomadas por Jessica Lizbeth Alvarez Barrientos

Acanthamoeba polyphaga

Pushkarew, 1913; emend Volkonski, 1931

Grupo II

Pequeña proporción de quistes reticulados; endoquiste muy irregular, prácticamente nunca estrellado, ectoquiste menos plegado que *A. castellanii* y *A. mauritaniensis*, delgado, ampliamente separado de endoquiste, diámetro medio del quiste de 14 μm . Perteneciente al grupo II.

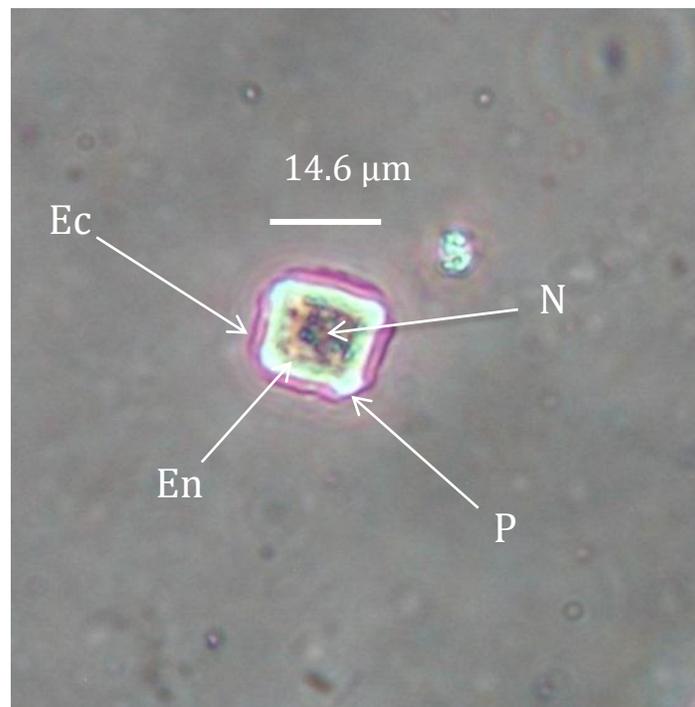


Figura 14. Quiste de *Acanthamoeba polyphaga*. Ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), poro (**P**), núcleo (**N**). Fotografía tomada con microscopio de luz invertido en contraste de fases 40x.

Acanthamoeba astronyxis

Ray y Hayes, 1954; emend Page, 1967

Grupo I

Todos o casi todos los brazos del endoquiste en contacto con el ectoquiste, más de 9 brazos, su diámetro de 19.2 a 22 μm .

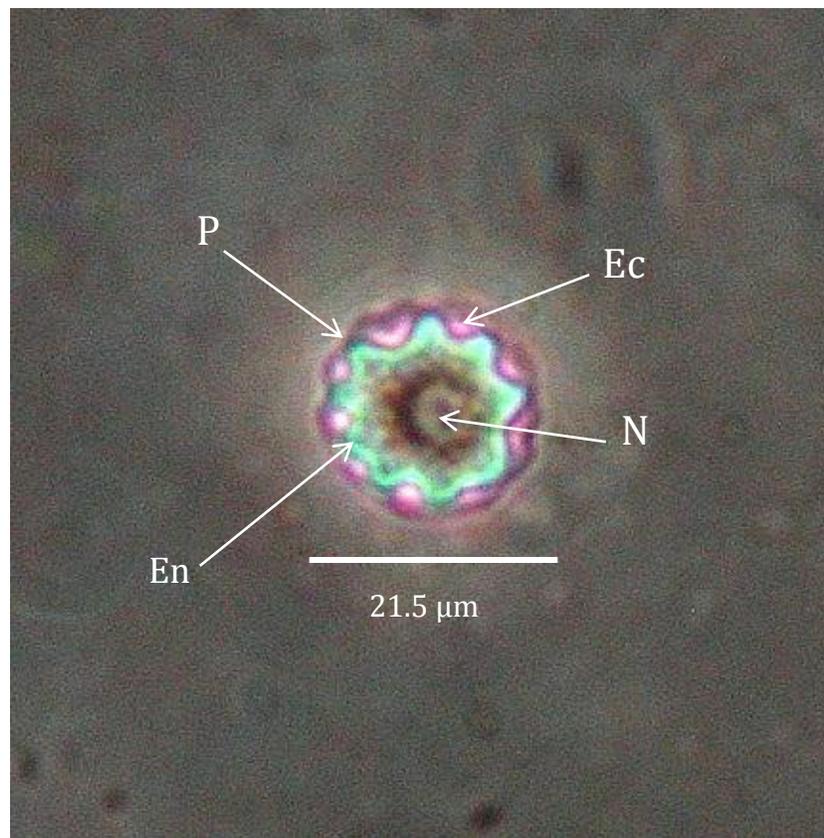


Figura 15. Quiste de *Acanthamoeba astronyxis*. Ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), poro (**P**), núcleo (**N**). Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40x.

Acanthamoeba castellanii

Douglas, 1930; emend Volkonski, 1931

Grupo II

Quiste reticulado, endoquiste mas o menos esférico conectado al ectoquiste por pequeños brazos cónicos, ectoquiste grueso y muy rugoso, diámetro del quiste 14-16 μm .

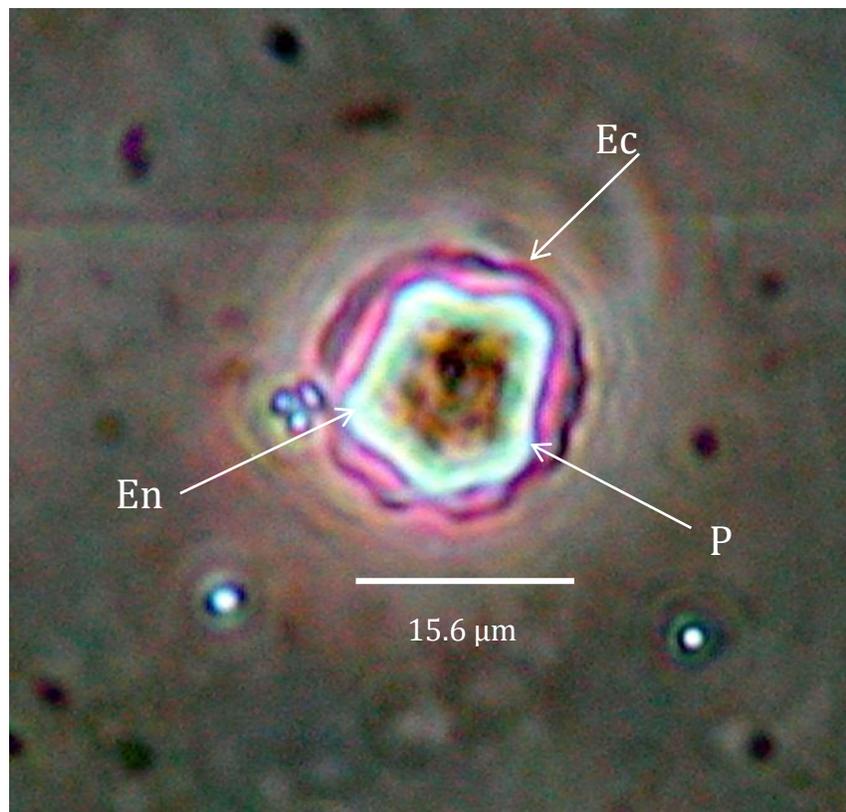


Figura 16. Quiste de *Acanthamoeba castellanii* Ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), poro (**P**), núcleo (**N**). Fotografía tomada en microscopio de luz invertido en contraste de fases 40x.

Acanthamoeba culbertsoni

Singh y Das, 1970; emend. Griffin, 1972

Grupo III

Endoquiste usualmente regular y redondeado, ocasionalmente ligeramente poligonal, ectoquiste delgado ondulado: con 5 a 6 poros, con un diámetro de 15 a 18 μm .

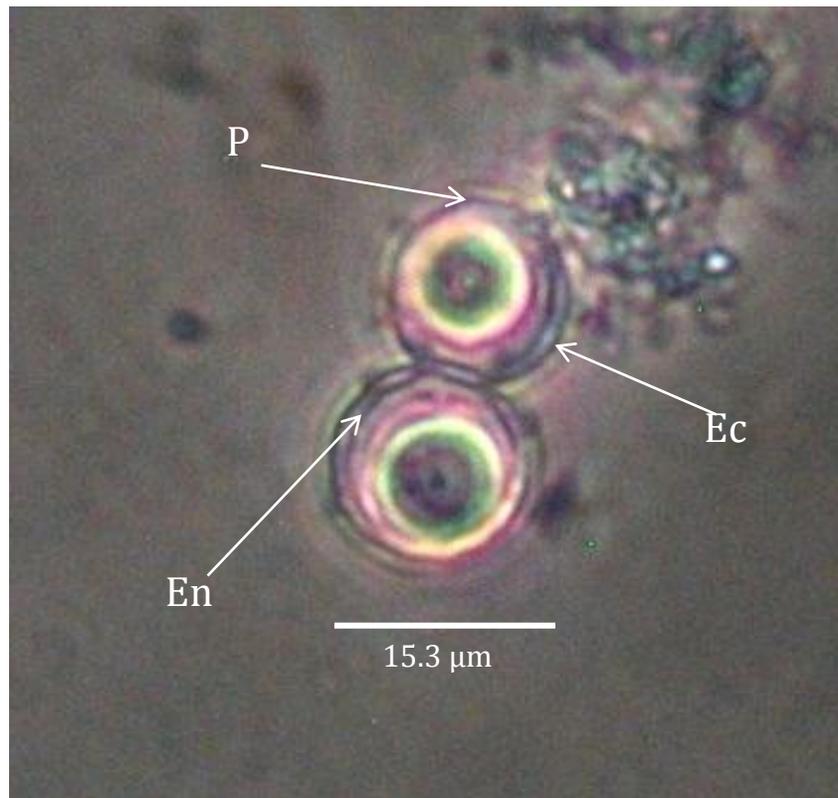


Figura 17. Quiste de *Acanthamoeba culbertsoni*. Ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), poro (**P**), núcleo (**N**). Fotografía tomada con microscopio de luz invertido en contraste de fases 40x.

Acanthamoeba griffini

Sawyer, 1971

Grupo II

Endoquiste variable, algunas veces esférico u ovoide, con o sin brazos cortos, algunas veces estrellado con brazos bien desarrollados, ectoquiste ondulado cercano al endoquiste excepto cuando es estrellado, el número de brazos o poros en el endoquiste es 6, con un diámetro de 14 μm .

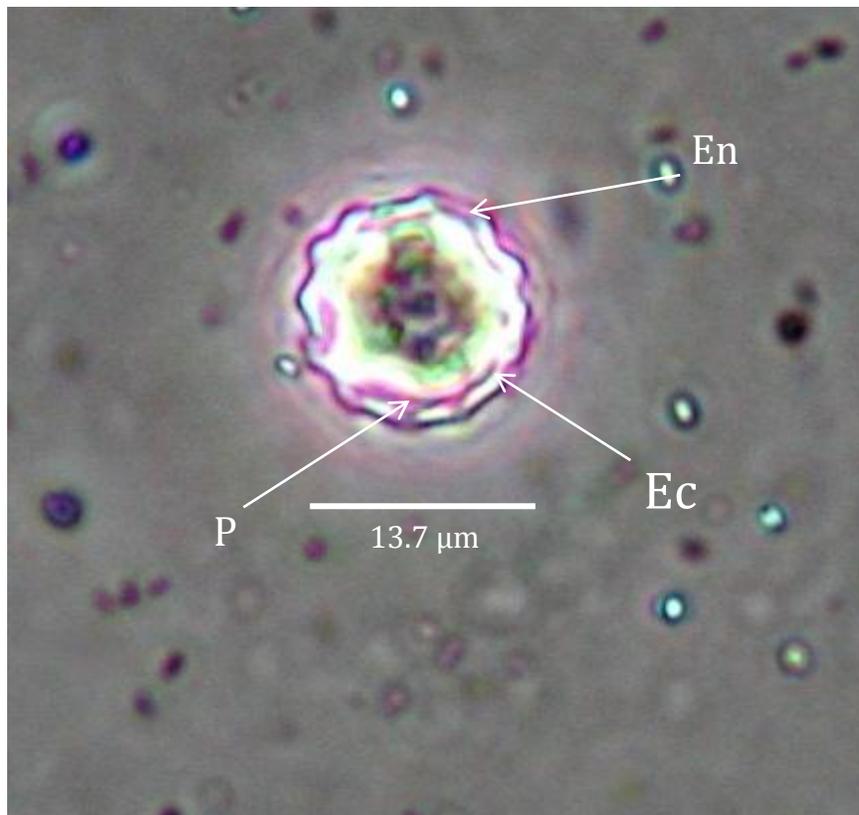


Figura 18. Quiste de *Acanthamoeba griffini*. Ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), poro (**P**), núcleo (**N**). Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40x.

Acanthamoeba palestinensis

Reich 1933

Grupo III

Ectoquiste esférico u ovoide, raramente con protuberancias cónicas, ectoquiste fino, más o menos ondulado, por lo general bastante de cerca del endoquiste, poros difíciles de distinguir, con un número promedio de 7.5 poros, con un diámetro de 17 a 18 μm .

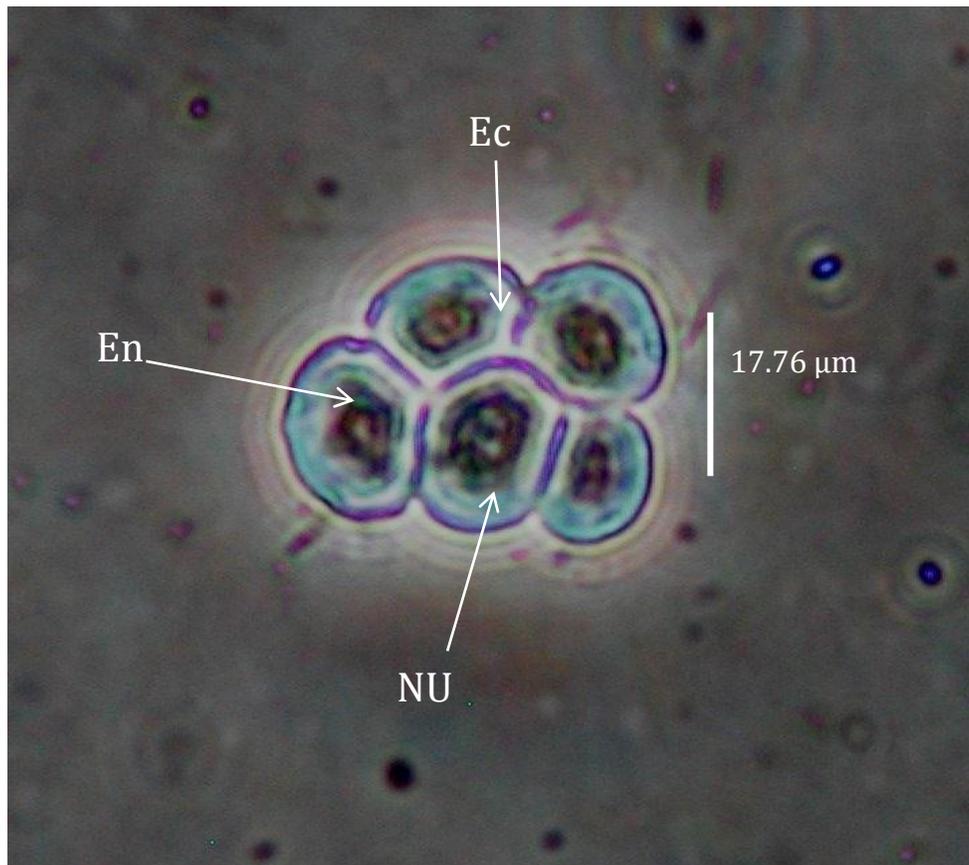


Figura 19. Quiste de *Acanthamoeba palestinensis*. Ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), poro (**P**), núcleo (**N**). Fotografía tomada en microscopio invertido de luz en contraste de fases 40x.

Acanthamoeba rhyodes

Singh, 1952; emend. Griffin, 1972

Grupo II

Algunos quistes pseudoreticulados, endoquistes a menudo con brazos cónicos o tubulares, una minoría estrellados o con forma de engranaje con un número promedio de 7 a 7.5 μm brazos y un diámetro promedio de 16 a 18 μm .

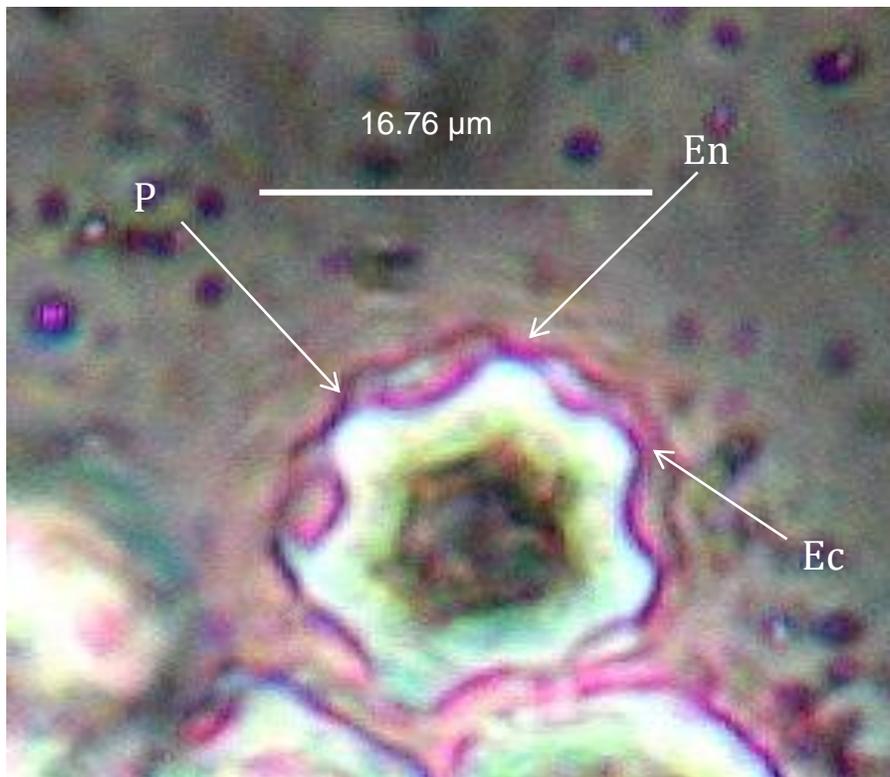


Figura 20. Quiste de *Acanthamoeba rhyodes*. Ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), poro (**P**), núcleo (**N**). Fotografía tomada en microscopio invertido de luz en contraste de fases 40x.

Acanthamoeba triangularis

(Pussard y Ponds, 1977)

Grupo II

Ectoquiste esférico u ovoide, endoquiste triangular muy raramente cuadrado, generalmente posee tres brazos, con un diámetro de aproximadamente 13 μm .

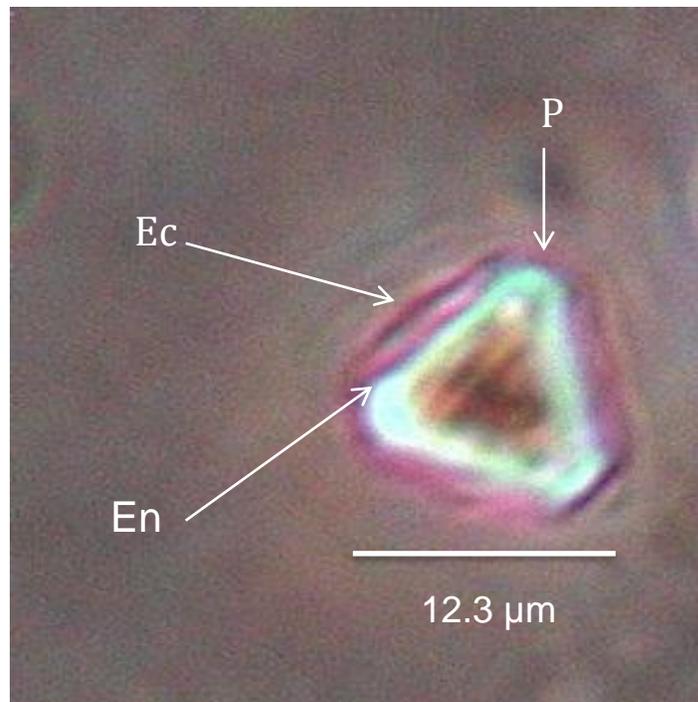


Figura 21. Quiste de *Acanthamoeba triangularis*. Ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), poro (**P**), núcleo (**N**). Fotografía tomada en microscopio de luz invertido en contraste de fases 40x.

Acanthamoeba sp.

Ectoquiste rugoso, ovoide y grueso, endoquiste muy junto al ectoquiste, con brazos bien definidos.

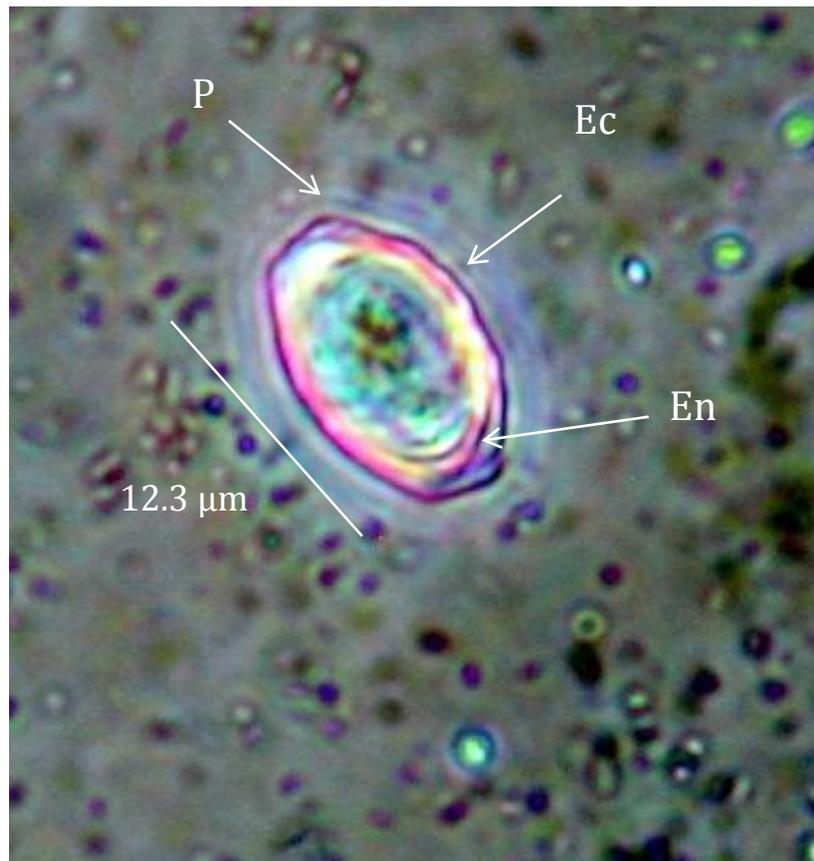


Figura 22. Quiste de *Acanthamoeba* sp . Ectoquiste (**Ec**), endoquiste (**En**), poro (**P**), núcleo (**N**). Fotografía tomada en microscopio invertido de luz en contraste de fases 40x.

Echinamoeba sp.

Page,1975

Amiba triangular, elongada, flabelada o con contorno irregular, longitud no superior a 15 μm , a menudo con un subpseudópodo poco fino que va de 1 a 1.5 μm de longitud, quiste esférico de paredes finas, nunca por encima de los 10 μm en diámetro.

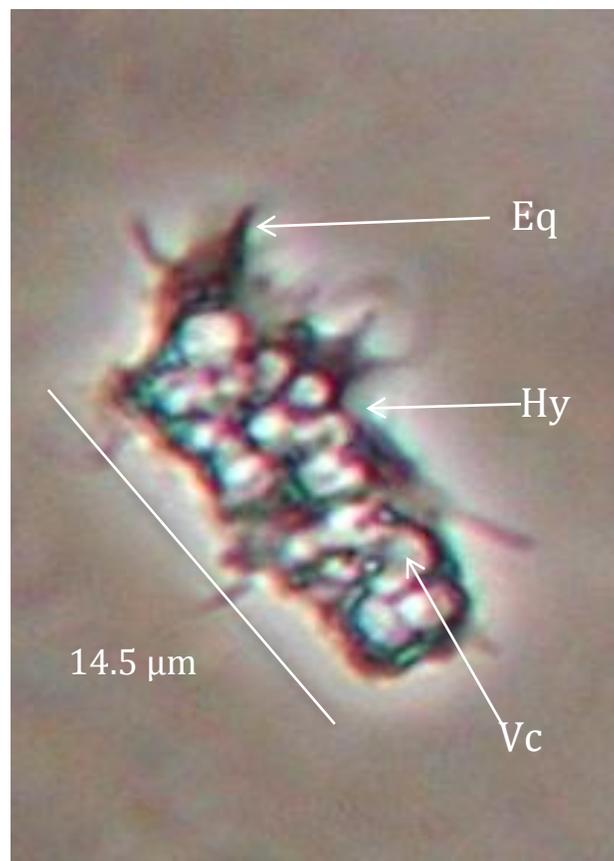


Figura 23. Trofozoíto de *Echinamoeba* sp. Equinopodio (**Eq**), hialoplasma (**Hy**), vacuola (**Vc**). Fotografía tomada en microscopio invertido de luz en contraste de fases 40x.

***Hartmannella* sp.**

Alexeieff, 1912; emend. Page 1974

Capa hialina casi siempre presente en locomoción continua, sin división nuclear en el quiste.

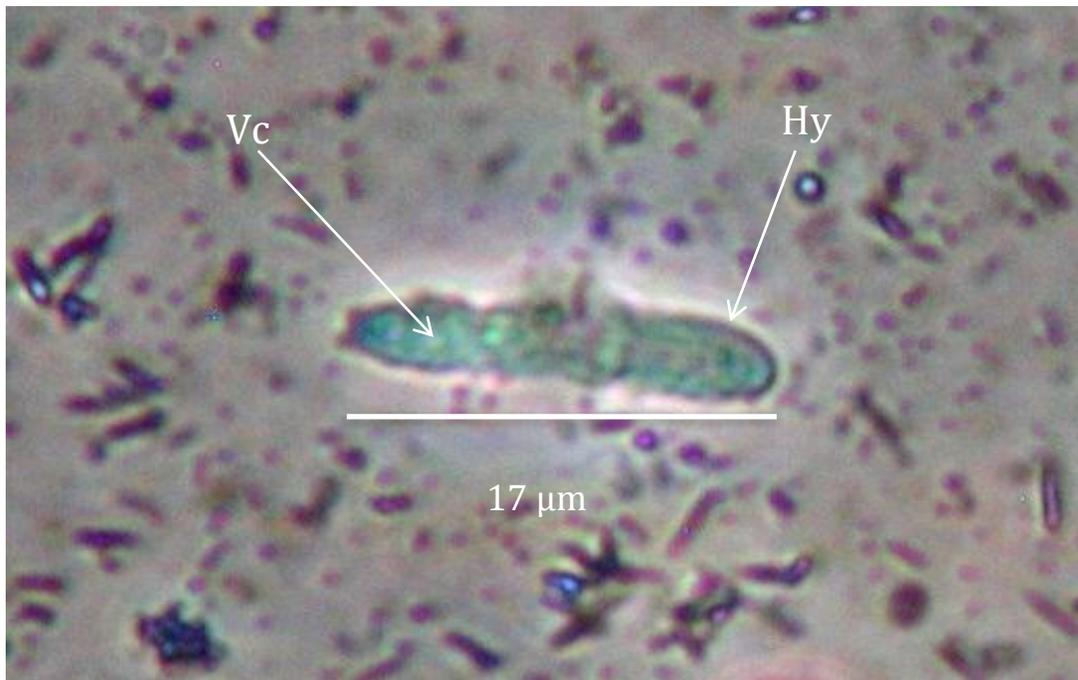


Figura 24. Trofozoíto de *Hartmannella* sp. Hialoplasma (Hy), vacuola (Vc). Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40x.

Naegleria fowleri

Carter, 1970

No aglutinado por concanavalina A, bordes de los poros del quiste no engrosados notablemente. No crece bien a 20 °C, poros en el borde del quiste no notables o ligeramente engrosadas.

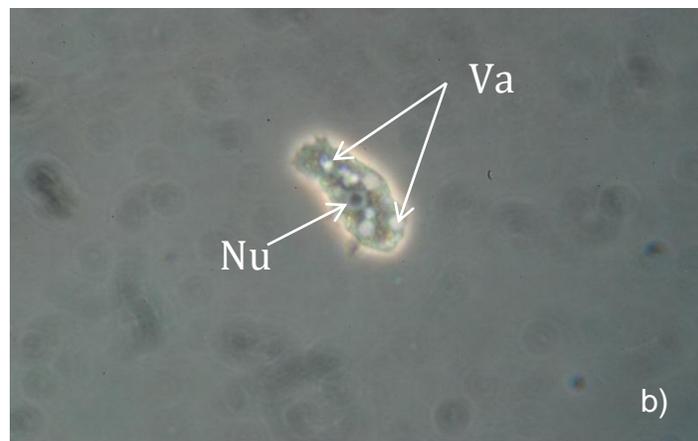
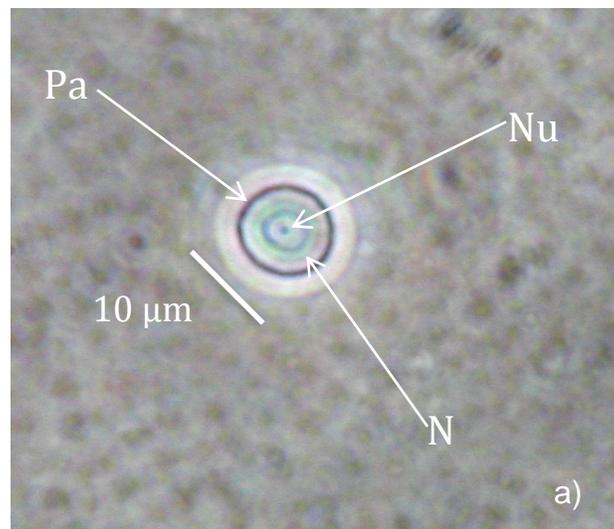


Figura 25. Quiste de *Naegleria fowleri* (a). Núcleo (N), nucleólo (Nu), pared (Pa). Trofozoíto *Naegleria fowleri* (b). Vacuola (Va), núcleo (N) . Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40x.

Naegleria gruberi

Schardinger, 1899

Poros del quiste con un borde notablemente engrosado, pared del quiste puede ser lisa, rugosa o angular.

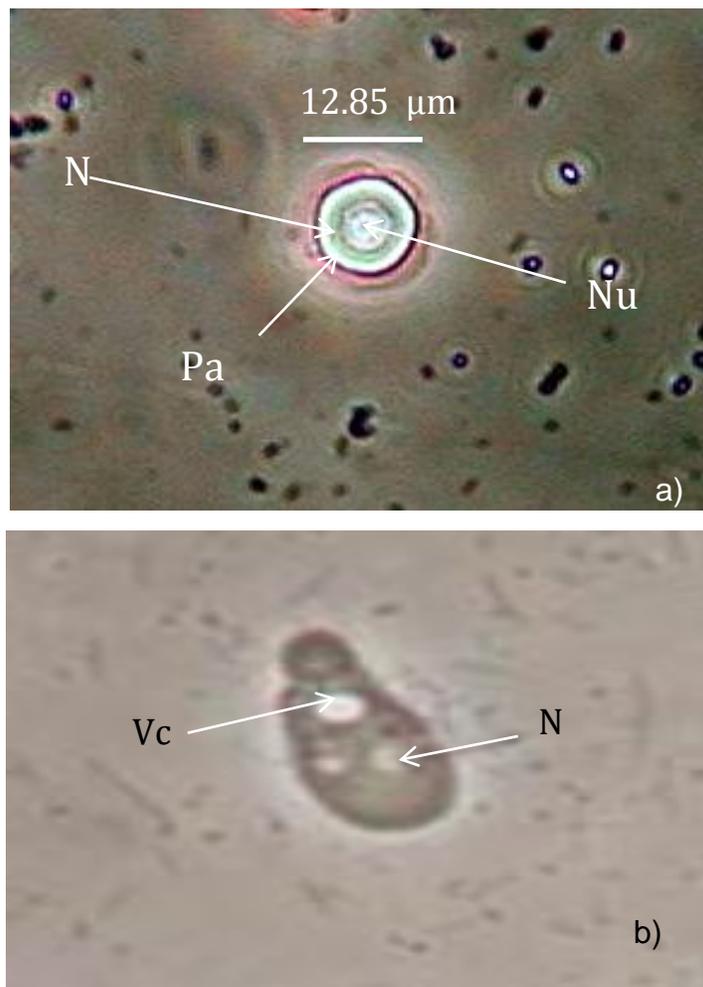


Figura 26. Quiste *Naegleria gruberi* (a) Núcleo (N), nucleólo (Nu), pared (Pa). Trofozoíto *Naegleria gruberi* (b) . Vacuola (Va), núcleo (N). Fotografía tomada en microscopio invertido de luz en contraste de fases 40x.

Rosculus ithacus

Hawes, 1963

Pequeña amiba con un cambio rápido de forma locomotiva, algunas veces espatulada, otras flabelada, zona hialina con borde un poco irregular su tamaño es usualmente de entre 5 a 7 μm . Quiste liso, oval o esférico.

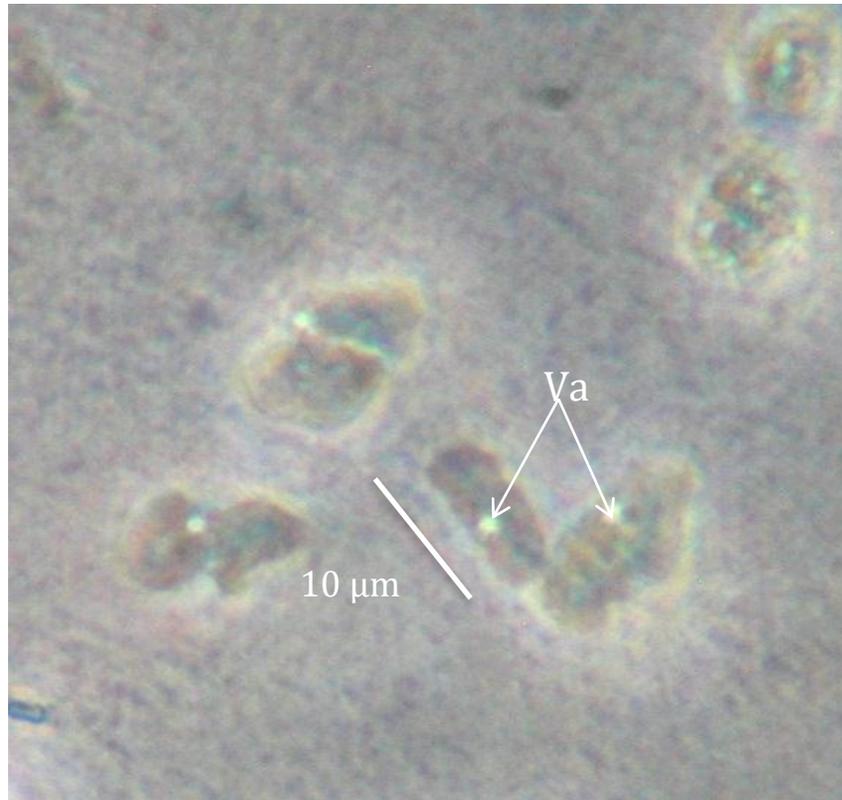


Figura 27. Trofozoíto de *Rosculus ithacus*. Vacuola (**Va**). Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40x.

Saccamoeba sp.

Frenzel, 1982; emend. Bovee, 1972

Perilla uroidal siempre presente finamente papilada o con vellosidades, cristales bipiramidales visibles en algunos. Cuenta con forma flotante, con pseudópodo largo y granular.

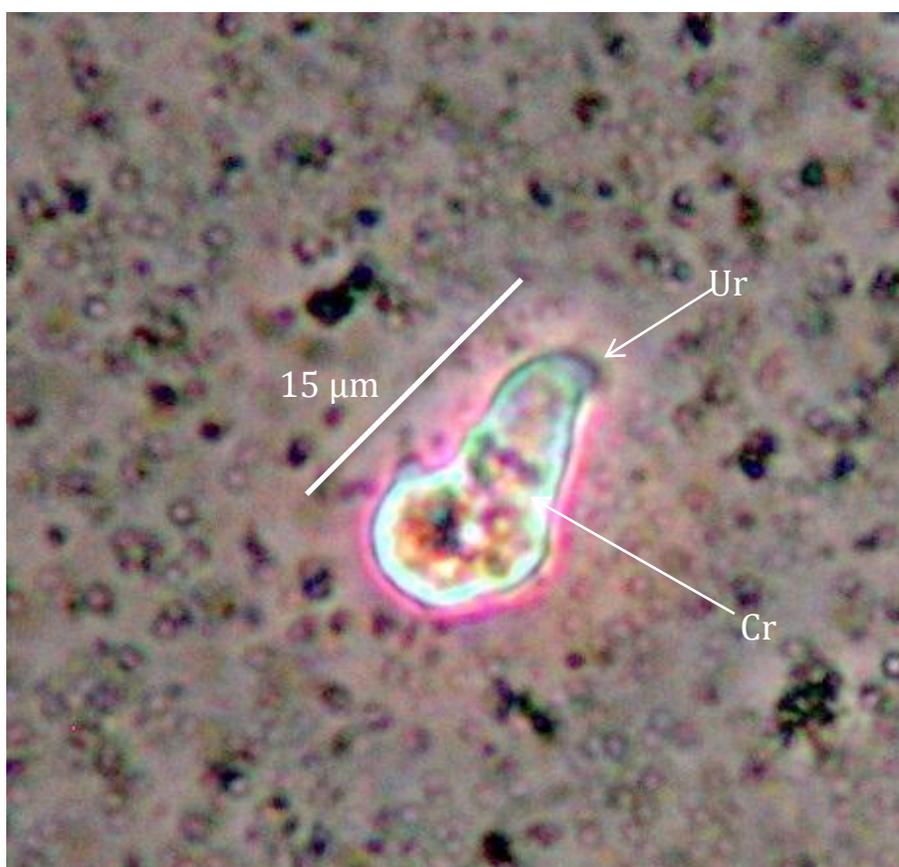


Figura 28. Trofozoíto de *Saccamoeba* sp. Uroide (Ur), cristales (Cr). Fotografía tomada en microscopio invertido de luz en contraste de fases 40x.

Vannella platypodia

Gläser, 1912

Forma de locomoción, algo más largo que ancho, a veces espatulado, prolongado posteriormente; su mayor dimensión 10-30 μm , núcleo 5 μm , se instala en su forma flotante en pocos minutos, se adhiere bien al vidrio, filamentos simples entre los glicostilos.

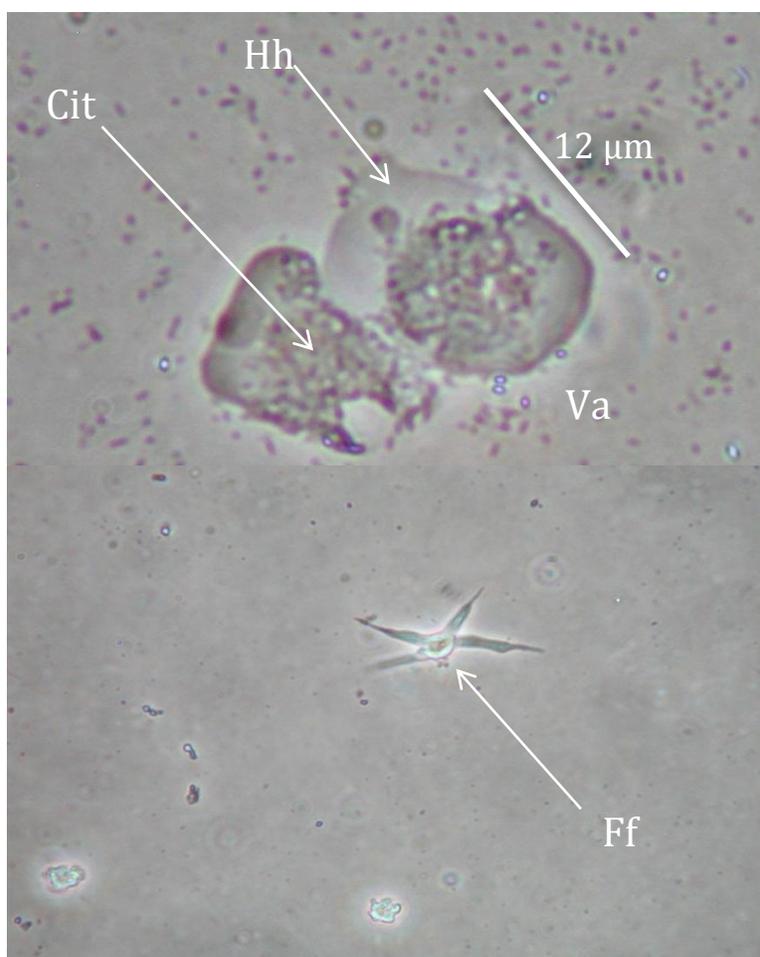


Figura 29. Trofozoíto de *Vannella platypodia*. Hialoplasma (**Hh**), vacuola (**Va**), citoplasma (**Cit**), forma flotante (**Ff**). Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40x.

Thecamoeba sp.

Fromentel, 1874

Aplanado, ovoide u oblongo, con una longitud 2.5 veces menor a la anchura. Siempre con pliegues o arrugas longitudinales en la superficie, glicocálix denso, 25-70 μm de grosor, amorfo. Hialoplasma no derivado. Normalmente unicucleado. Sin quiste conocido.

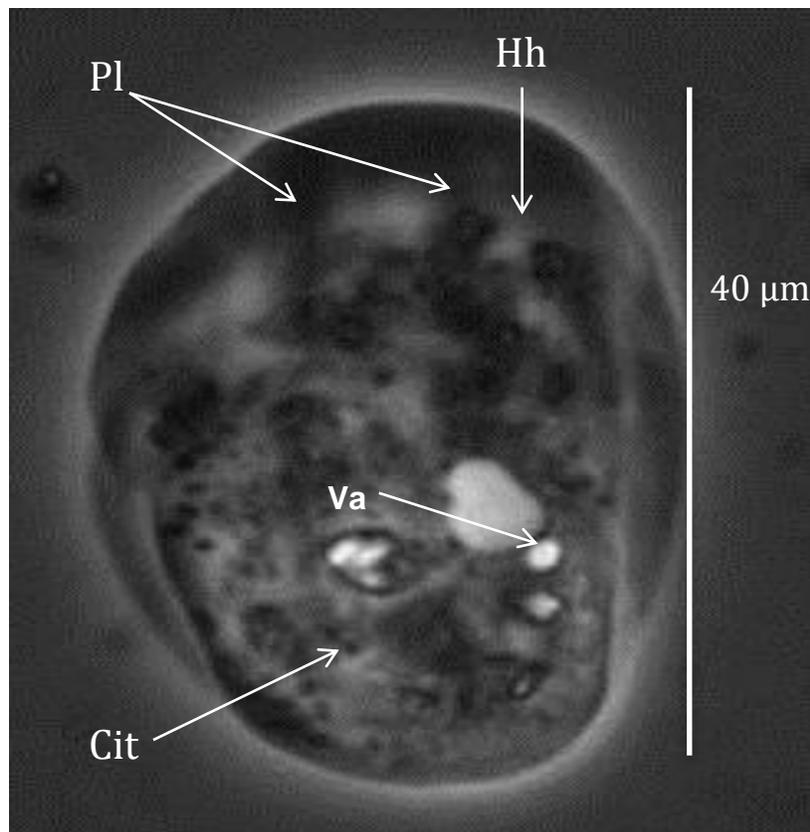


Figura 30. Trofozoíto de *Thecamoeba* sp. Hialoplasma (**Hh**), vacuola (**Va**), citoplasma (**Cit**), pliegues (**Pl**). Fotografía tomada en microscopio de luz invertido en contraste de fases 40x.

Vannella simplex

Wohlfarth-Bottermann, 1960

Mayor amplitud que longitud en su gran mayoría, dimensión de 25-80 μm ; núcleo 6-11 μm ; ocasionalmente 1 o 2 supernumerarios; a menudo con locomoción lenta, se adhiere pobremente al vidrio, algunos filamentos simples entre glicostilos.

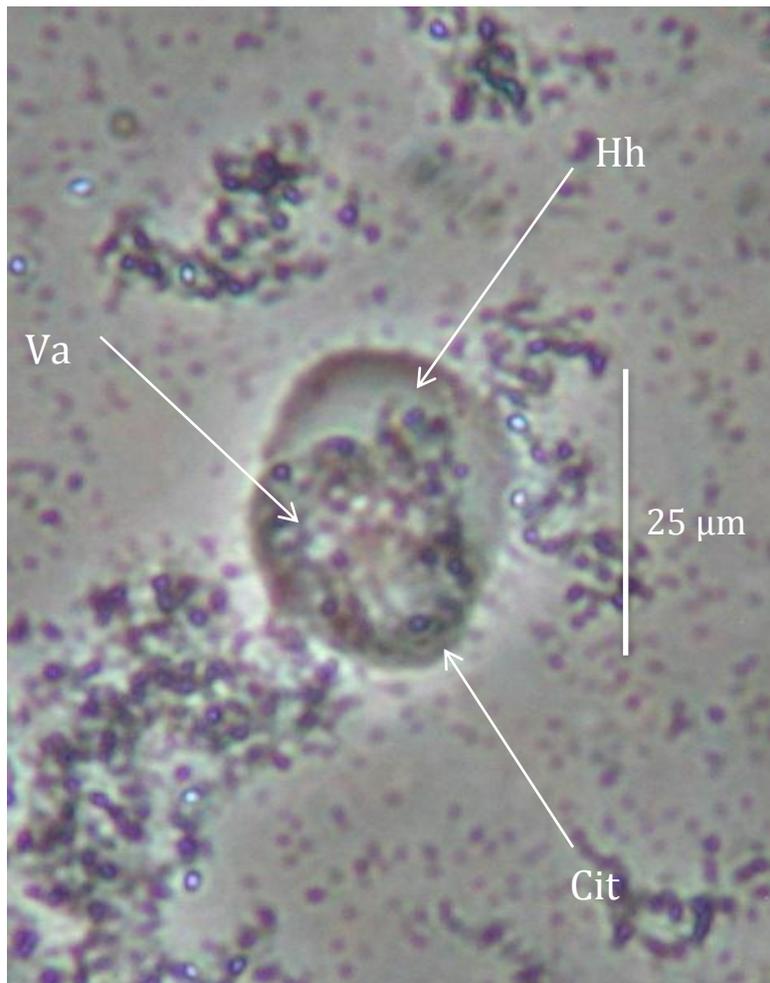


Figura 31. Trofozoíto de *Vannella simplex*. Hialoplasma (**Hy**), vacuola (**Va**), citoplasma (**Cit**). Fotografía tomada en microscopio invertido en contraste de fases 40x.

3. Parámetros Físicoquímicos

Se ha demostrado que *Acanthamoeba* y *Naegleria* son resistentes a un amplio rango de temperatura, pH, conductividad y oxígeno disuelto entre otros, por la fase quística, la cual le confiere una resistencia única, que hace posible que esté presente casi en todos los biotopos (Loret y Greub, 2010; Siddiqui y Khan, 2012). Todos los parámetros medidos se sitúan dentro del rango en el que las AVL pueden desarrollarse.

3.1 pH

En la figura 31 se puede observar los valores de pH durante los dos muestreos efectuados y en los cuatro cuerpos de agua, estos valores fluctuaron entre 6.17 a 8.43. Durante el primer muestreo el sitio 4 con un pH de 8.43 fue el valor más alto y el sitio 1 con un pH de 7.23 fue el valor más bajo, con una diferencia de 1.2 indicando alcalinidad, durante el segundo muestreo el sitio 2 con un pH 6.63 como valor más alto y el sitio 1 con un pH de 6.17 que indica acidez.

Las condiciones alcalinas de las muestras del mes de septiembre coinciden con la época de lluvia y el posible arrastre del suelo que por su color y textura se clasifica como suelo calizo el cual tiene un pH alcalino, ello está asociado a la presencia de carbonatos en la solución del suelo; la calcita es la forma más común de carbonatos en el suelo (Hernández *et al.*, 2003). Los valores obtenidos son permisibles según NOM-245-SSA1-2010 en cuanto a requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas.

Durante el segundo muestreo el pH del agua fue ácido debido a la presencia de dióxido de carbono, el cual al disolverse en agua forma ácido carbónico y debido a que el muestreo se realizó en época seca, no hubo influencia de los carbonatos de calcio del suelo (Manaham, 2007). Los valores obtenidos están dentro del ámbito de soporte de las amibas que es desde 4.6 hasta 9.5 (Kyle y Noblet, 1986).

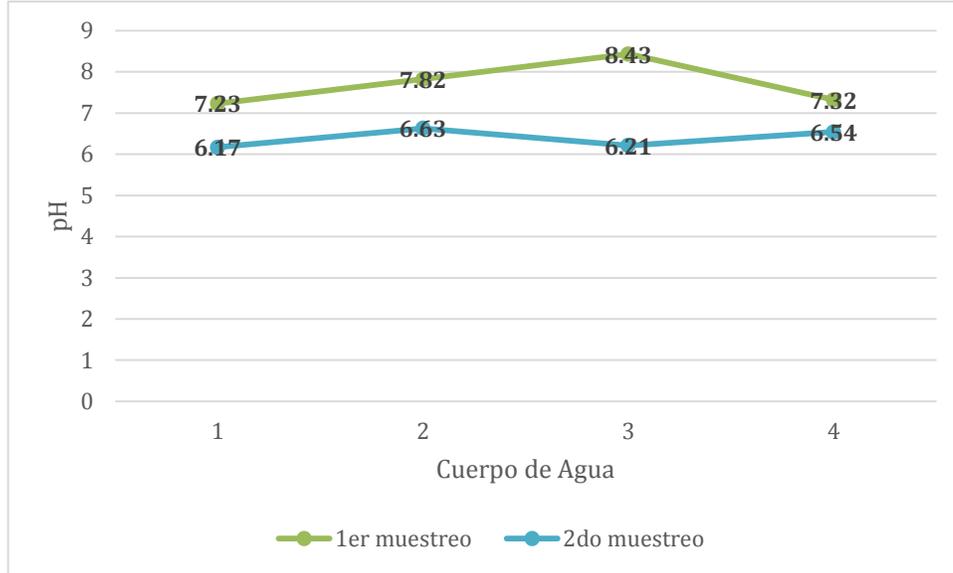


Figura 32. Valores de pH registrados durante los dos muestreos efectuados en “Hierve el Agua”, Oaxaca.

3.2 Temperatura del agua

Durante la investigación en el primer muestreo se observó un gradiente de temperaturas , como puede observarse en la Figura 32. En el sitio número uno que corresponde al ojo de agua se registró una temperatura de 24.9 °C y en el tercer cuerpo de agua una temperatura de 22.2 °C; durante este muestreo el cuarto cuerpo de agua no siguió este gradiente, esto podría deberse a su aislamiento; sin embargo durante el segundo muestreo esto no ocurrió del mismo modo, donde la mayor temperatura registrada fue en el primer sitio con 28.1 °C, seguida del tercer sitio con 24.6 °C y segundo sitio con 24.4 °C , la temperatura mínima de 24.2 °C se registró en el cuarto sitio de muestreo, aunque como puede observarse entre los sitios hubo una diferencia significativa. La relación de la temperatura y la presencia de AVL no está bien definida, cabe mencionar que los aislados de *Acanthamoeba* sp. crecieron a 37 °C por lo que podrían ser capaces de infectar humanos y debido a que la termotolerancia es una condición necesaria para la patogenicidad, sin embargo, no todas las amibas termotolerantes resultan patógenas, por lo tanto, no sería factor determinante para la patogenicidad.

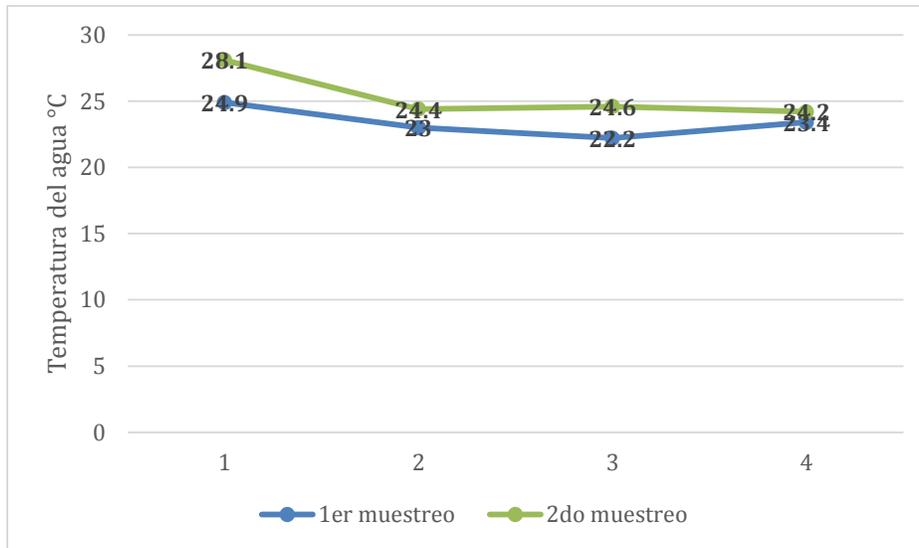


Figura 32. Valores de temperatura del agua registrados durante los dos muestreos efectuados en “Hierve el Agua”, Oaxaca.

3.3 Temperatura atmosférica

Durante el primer muestreo la temperatura varió de 23.7 a 20.2 °C y durante el segundo muestreo la temperatura se mantuvo en 25 °C (Fig. 33), durante el estudio no se demostró una influencia directa sobre la distribución y riqueza de las AVL.

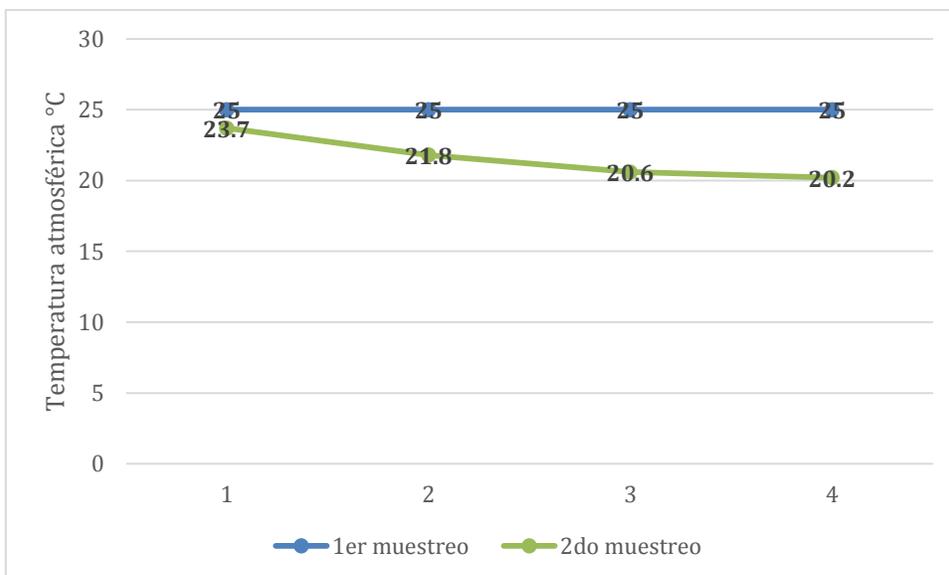


Figura 33. Valores de temperatura atmosférica registrados durante los dos muestreos efectuados en “Hierve el Agua”, Oaxaca.

3.4 Conductividad ($\mu\text{S}/\text{cm}$)

En la figura 34 se observan los valores de conductividad. Durante el primer muestreo los valores oscilaron entre 9.13 a 9.9 $\mu\text{S}/\text{cm}$ y durante el segundo muestreo entre 8.6 y 10.6 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Los valores no tuvieron diferencia significativa incluso en los diferentes muestreos y dado que las amibas de vida libre tiene una amplia tolerancia a esta parámetro, incluso la fase trófica (Rivera *et al.*, 1994; Rodriguez-Zaragoza, 1994), por lo que este parámetro no se considera un factor que tengan gran impacto en la riqueza y distribución de las especies amibianas.

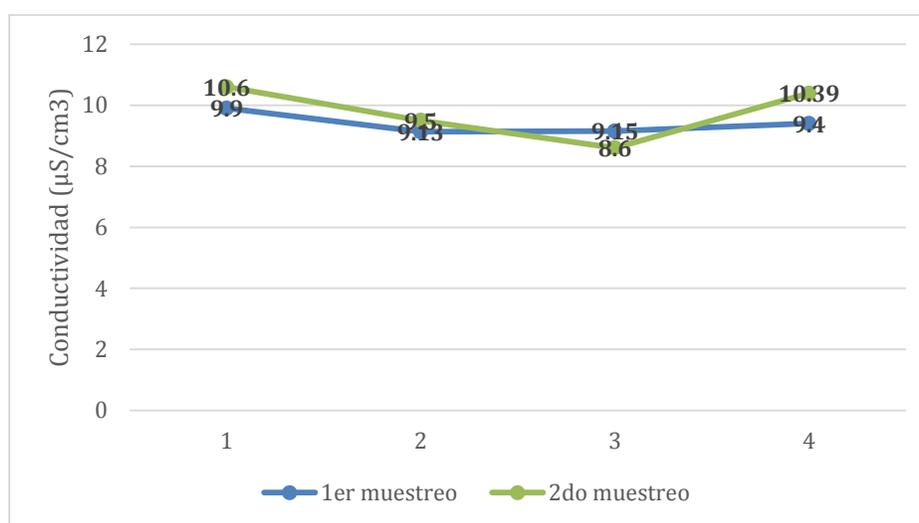


Figura 34. Valores de conductividad registrados durante los dos muestreos efectuados en “Hierve el Agua”, Oaxaca.

3.5 Coliformes totales

Del análisis de medición de coliformes fecales totales en cada sitio de muestreo se obtuvo un promedio de 1 NMP (número más probable) lo que indica que los cuerpos de agua tienen una buena calidad y la contaminación por materia fecal es casi nula y adecuada para el uso recreativo, según NOM-245-SSA1-2010.

4. Índice de Jaccard

Durante el primer muestreo el valor más alto (1) se obtuvo para las muestras 1d, 3aI y 4aII, la primera se refiere a la muestra mixta de agua, mientras que las dos últimas a biopelículas y para las muestras 2aII, 2b y 4d, que corresponden a biopelículas y a muestra mixta de agua respectivamente. Como puede observarse en ambas se involucran biopelículas y la muestra mixta de agua ya que, al ser cuerpos de agua con poca profundidad, el aire y el agua tienen un impacto en este, lo que puede llevar a que haya una interacción del agua superficial (biopelículas) y de la columna del agua provocando que todas las amibas se encuentren en todo el cuerpo de agua y por la tanto en cada muestra (Fig.35). Al no encontrarse una gran diferencia entre los parámetros fisicoquímicos en cada estación de muestreo, no se le puede atribuir que sea por estos que exista esta similitud.

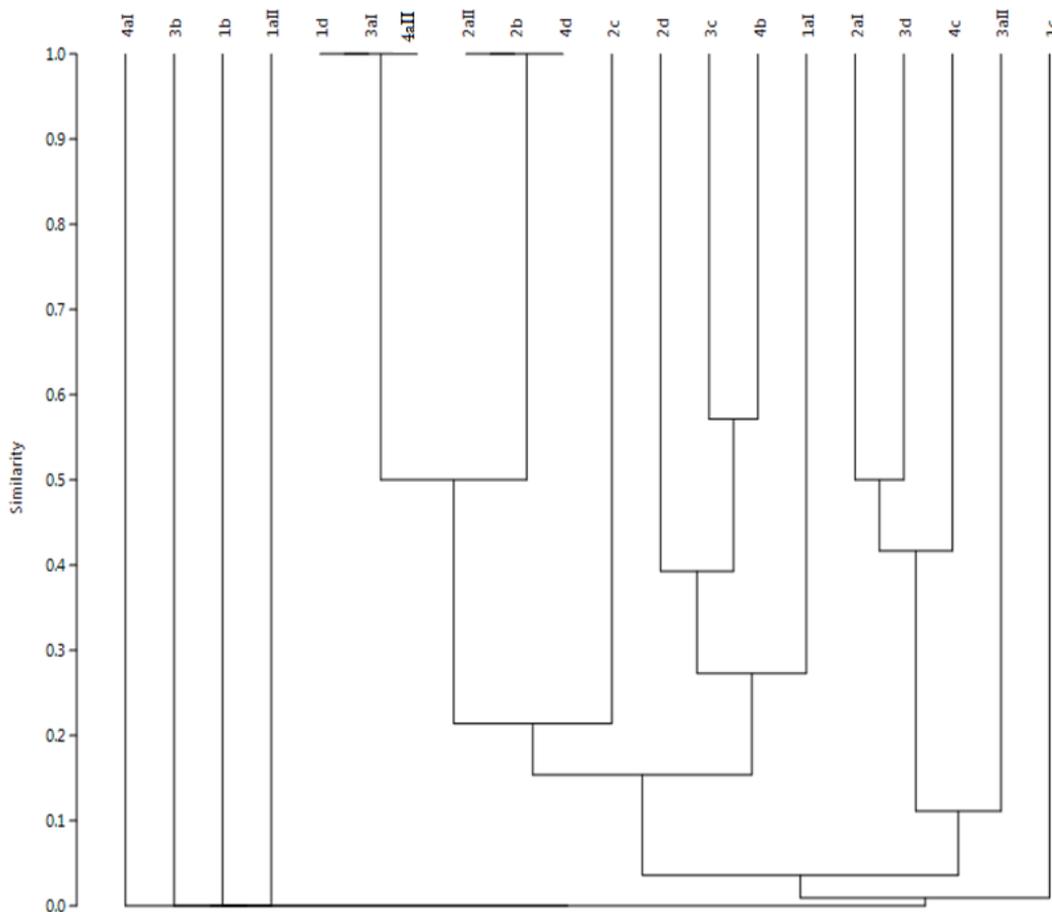


Figura 35. Similitud de la riqueza de especies entre cada muestra durante época de lluvia . Índice de Jaccard.

Durante el segundo muestreo (Fig.36) los valores de similitud fluctuaron en 0.1 y 0.7 entre las muestras, esto podría deberse a que el muestreo se efectuó durante época de sequía lo que llevó a que el agua estuviera confinada, acumulándose materia orgánica, condiciones que favorecen la formación de biopelículas en donde las AVL encuentran las condiciones óptimas para su desarrollo, además de que la falta de corriente provocaría una estabilidad entre cada bioma , pudiendo provocar a que no haya interacción entre estas y por lo tanto que no todas las especies amibianas se encuenten en todos las muestras.

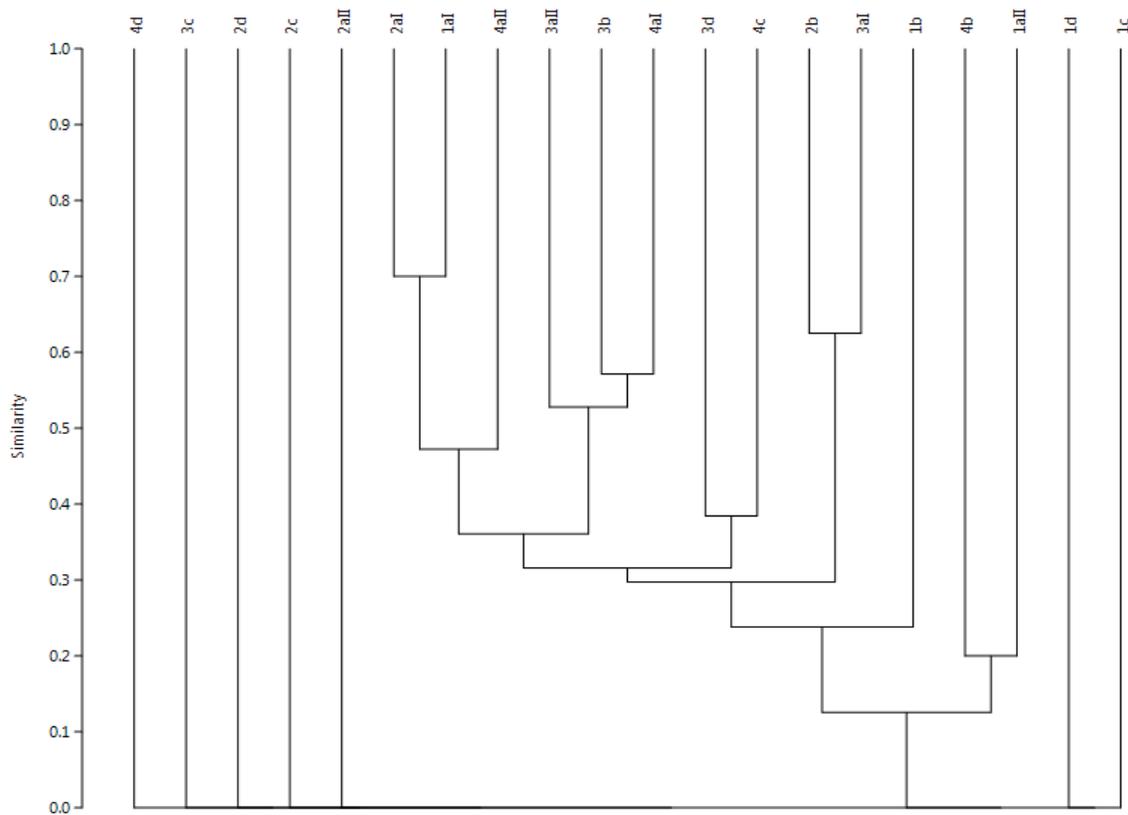


Figura 36. Similitud de la riqueza de especies entre cada muestra, durante época seca. Índice de Jaccard .

Para estimar si había una temporalidad marcada durante los muestreos se aplicó el índice de similitud de Jaccard, como puede observarse en la figura 37 hay tendencia a que sean las muestras de cada temporada las que se agrupan, sin embargo dentro de cada grupo se puede observar que en esas agrupaciones se encuentran algunas muestras del otro muestreo,

por lo que no se marcó durante los muestreos una diferencia entre la temporada seca y de lluvia en cuanto a la presencia de la amibas, esto podría deberse a que al ser cuerpos de agua que constantemente son alimentados por agua subterránea, no se ven totalmente afectados por el cambio entre temporadas, lo que se complementa también con la gran similitud entre los parámetros físicos y químicos medidos durante el estudio.

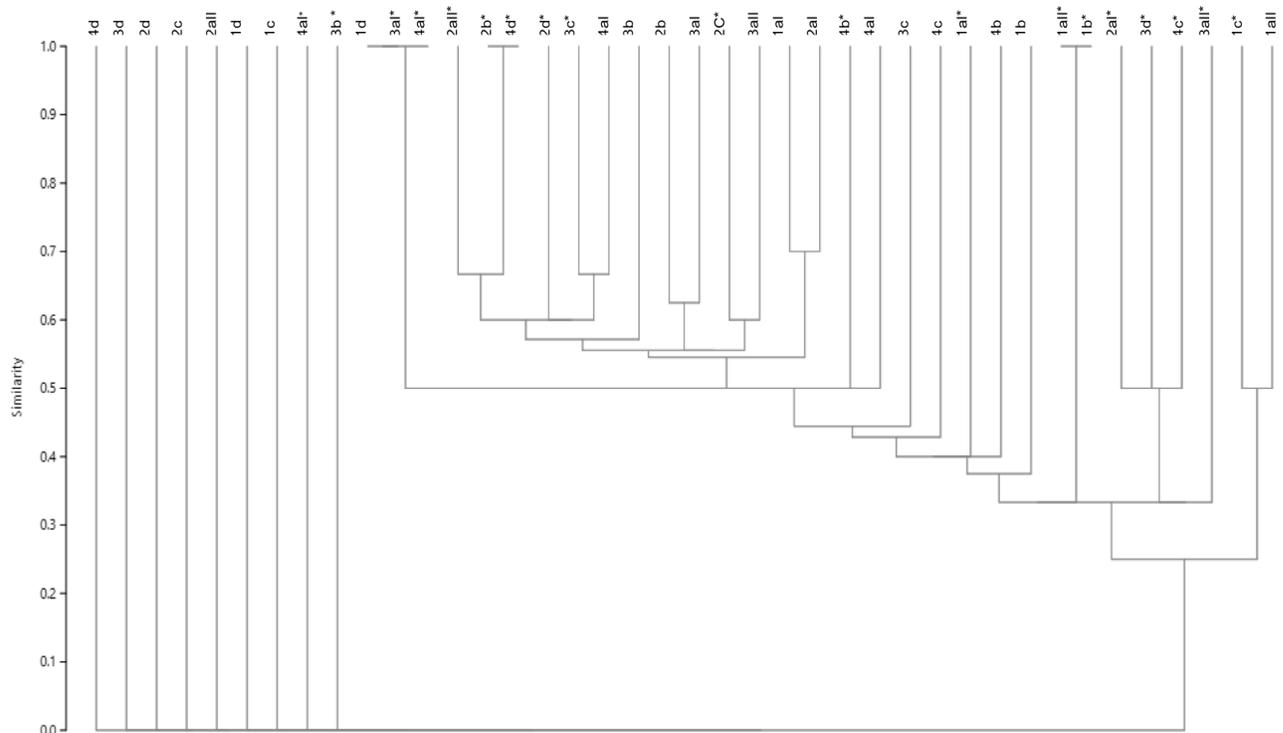


Figura 37. Similitud de la riqueza de especies entre cada muestreo (época de sequia y * época de lluvia) . Índice de Jaccard

5. México y la Meningoencefalitis amibiana primaria

La gran mayoría de los casos registrados de MEAP en Mexico se ubican en el norte del país a excepción del registrado en el estado de Hidalgo (Fig.38), esto puede deberse a que el sector Salud aún no cuenta con recursos suficientes, a que existen diferencias importantes entre entidades federativas en cuanto a la disponibilidad de hospitales, por ejemplo, en Baja California Sur y Campeche la disponibilidad es seis y cinco veces más alta respectivamente que la del Estado de México, además de la baja calidad del sector salud y el bajo índice de desarrollo humano en el sur del país, lo que podría ocasionar que no se tengan los

elementos necesarios para diagnosticar adecuadamente la enfermedad, aún teniendo datos sobre la existencia de las AVL al sur del país (Fig.39) (Dantés *et al.*,2011).

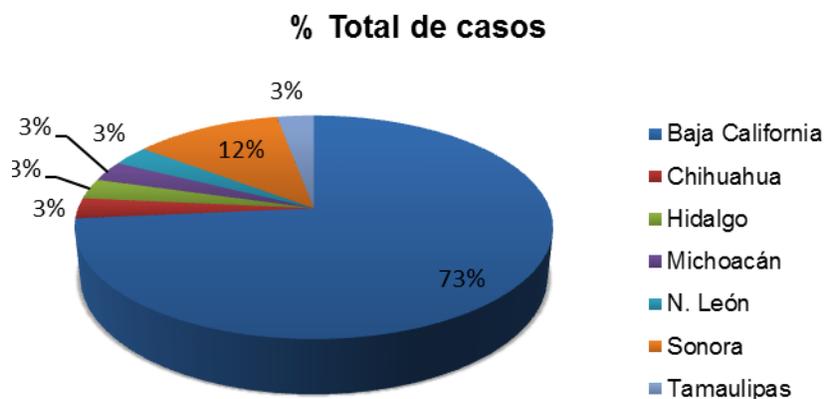


Figura 38. Porcentaje total de los casos registrados en Mexico de 1978-2014.



Figura 39. Mapa representativo de Indice de Desarrollo Humano en la República Mexicana

VIII. CONCLUSIONES

- Se reportan por primera vez la presencia de géneros amebianos patógenos en Oaxaca, en el balneario “Hierve el Agua”.
- Se aislaron e identificaron un total de 19 especies amebianas pertenecientes a nueve géneros, siendo los más representativos *Acanthamoeba* y *Naegleria* lo cual demuestra que los parámetros físicos y químicos registrados de las piscinas recreativas no es una limitante para el crecimiento de las AVL, pues estos ambientes son ideales para mantener poblaciones de amibas de manera adecuada.
- Se identificó morfológicamente a nueve especies de importancia medica: *N. fowleri*, *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffinii*, *A. palestinensis*, *A. polyphaga*, *A. rhyssodes* y *A. triangularis*; las cuales están reportadas ampliamente como especies patógenas para el humano, este registro muestra el posible riesgo que podría presentar nadar sin las debidas precauciones en este cuerpo de agua ya que en la actualidad estos espacios son considerados turísticos y eso aumenta la probabilidad de probables infecciones a los usuarios.
- No se observaron variaciones temporales y espaciales importantes de pH, temperatura y conductividad en el acuífero, lo que señala una estabilidad de las condiciones ambientales.
- El segundo muestreo (época de sequía, primavera) muestra una mayor riqueza específica en comparación al primer muestreo (época de lluvia, otoño), sin embargo, no se mostró una temporalidad marcada entre muestreos.
- Lo anterior realza la importancia en la detección de estos protozoos en balnearios de aguas termales con una alta densidad de visitantes y hacer cumplir la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010 requisito sanitario y de calidad del agua que deben

cumplir las aguas recreativas de contacto directo y que contempla en estas la ausencia de la amiba patógena *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba*.

- Sería urgente monitorear frecuentemente las condiciones de los diferentes balnearios termales y no termales para advertir a los usuarios de la presencia de amebas patógenas de vida libre que ponen en riesgo su salud y hacer cumplir la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas y que contempla como requisito en estas la ausencia de la amiba patógena *Naegleria fowleri*.
- La falta de registros o que sean subdiagnosticados los casos de meningoencefalitis amibiana primaria, encefalitis amibina granulomatosa, queratitis y acantamebiosis cutánea en el sur del país puede ser causa de la falta de recursos materiales en hospitales, la baja calidad del sector salud y el bajo índice de desarrollo humano.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Adl, S., Simpson, A., Lane, C., Lukeš. J., Bass, D., Bowser, S., Brown, M., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Le Gall, L., Lynn, D., McManus, H., Mitchell E., Mozley-Stanridge, S., Parfrey, L., Pawlowski, J., Rueckert, S., Shadwick, R., Schoch, C., Smirnov y A., Spiegel, F. 2005. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52(5): 399–451.
- APHA. 2005. Standard Methods for the examination of water and wastewaters, 21 th edition, American Public Health Association, Washington
- Arredondo-Figueroa, J. L. y Ponce-Palafox, J. T. 1998. Calidad del Agua en Acuicultura. Conceptos y Aplicaciones. AGT Editor. México. 221.
- Astorga, B., Lorenzo-Morales, J., Martín-Navarro, C., Alarcón, V., Moreno, J., González, A., Navarte, E., Piñero y J., Valladares, B. 2011. *Acanthamoeba* Belonging to T3, T4, and T11: Genotypes Isolated from Air-Conditioning Units in Santiago, Chile. *J. Eukaryot. Microbiol.* 58 (6): 542-4.
- Bigot, R., Bertaux, J., Frere, J. y Berjeaud, J. 2013. Intra-amoeba multiplication induces chemotaxis and biofilm colonization and formation for *legionella*. *PLoS ONE.* 8 (10): 1-10.
- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R., Calderón, A., Gallegos, E. y Hernández, D. 2000. Ocurrance of free-living amoebae in aquatic systems of Huasteca Potosina, México. *En: Munawar, M., Lawrence, S y Malley, D.(Eds). Aquatic Ecosystems of Mexico: Status and Scope.* Ecovision World Monograph Series. Backhuys Publishers. Holanda. 37- 44. pp.

- Bonilla, P., Ramírez, E., Ortiz, R y Eslava C. 2007. Ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos. Instituto Nacional de Ecología. Disponible en:
<http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap3.html#top>. Consultado el 23 mayo de 2015.
- Bonilla, P., Ramírez, G., Zamora, C., Ibarra, R., Ramírez, E., Hernández, M. 2010. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Exp. Parasitol.* 126:54–58.
- Booton, G., Joslin, E., Shoff, M., Tu, E., Kelly, D. y Fuerst, P. 2009. Genotypic Identification of *Acanthamoeba* sp. Isolates Associated with an Outbreak of *Acanthamoeba* keratitis (AK). *Cornea.* 28(6): 673–676.
- Caran, S. y Neely, A. 2006. Hydraulic Engineering in Prehistoric Mexico. *Sci. Amer.* 295: 78 – 85.
- Centers for Disease Control and Prevention. Sappinia. [en línea] Disponible Consultado el 17 julio 2014. En: www.cdc.gov/parasites/sappinia/.
- Chao, A., Chazdon, R., Colwell, R., y Shen, T. 2004. Un nuevo método estadístico para la evaluación de la similitud en la composición de especies con datos de incidencia y abundancia. *Ecology Letters* (2004), 8: 148-159.
- Chang' W., Wu, Y. y Ming, K. 2010. Evaluation of real-time PCR methods for quantification of *Acanthamoeba* in anthropogenic water and biofilms. *Jour. Appl. Microbiol.* 109: 799–807.
- CONAGUA. 2014. Disponible en: <http://smn.cna.gob.mx/>. Consultado Noviembre 2015.

- Culbertson, C. G., Smith, J y Minner, J. 1958. *Acanthamoeba* observations on animal pathogenicity. *Science*. 127: 1506
- D'Auria, A., Lin, J., Geiseler, J., Qvarnstrom, Y., Bandea, R., Roy, S., Sriram, R., Paddock, C., Zaki, S., Kim, G. y Visvesvara, G. 2012. Cutaneous acanthamoebiasis with CNS involvement post ransplantation: Implication for differential diagnosis of skin lesions in immunocompromised patients. *J. Neurol*. 3: 1-7
- Dantés, O., Sesma, S., Becerril, V., Knaul, F., Arreola, H., Frenk, J. 2011. Sistema de salud de México. *Sal. Públ. de Méx.* (53):220-232.
- Da Rocha, A. B., Tanowitz, B. H. y Marciano, C. F. 2009. Diagnosis of infections caused by pathogenic free-living amoebae. *Inter. Perspect. Infect.* 2009.
- De Jonkheere, J. F. 1979. Studies on pathogenic free-living amoebae in swimming pools. *Bull. Inst. Pasteur*. 77: 385-392.
- Diario Oficial de la Federación, 2012. NORMA Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas. Disponible en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5256066&fecha=25/06/2012
- Dirección General de Epidemiología. 2012. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Meningoencefalitis Amibianas Primaria (Amibas de Vida Libre). [en línea]. Consultado el 20 de febrero del 2015. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/16_2012_Manual_Meningoencefalitis_vFinal_7nov12.pdf

- Dirección General de Epidemiología. 2014. Disponible en: <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. Consultado el 27 de octubre 2015.
- Ettinger, M., Webb, S., Harris, S., McIninch, P., Garman, G. y Brown, B. 2003. Distribution of free-living amoebae in James River, Virginia, USA. *Parasitol. Res.* 89: 6-15.
- Fenchel, T. 1987. *Ecology of Protozoa: The Biology of Free Living Phagotrophic Protists*. Springer Verlag, Wisconsin. 197.
- Galarza, C., Gutiérrez, E., Uribe, M., Ramos, W., Ortega, A., Ávila, J., Hanco, J., Espinoza, Y., Espinoza, M., Ñavimcopa, M. y Gámez, D. 2006. Amibas de vida libre en lesiones cutáneas reporte de 4 casos. *Dermatol Peru* 16 (1):36-40.
- Gallegos, E. M. 1997. *Amibas 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, Universidad Nacional Autónoma de México. México.130.
- Garaycochea, M. C., Beltrán, M. y Morón, C. 2008. Patogenicidad de las amibas de vida libre aisladas de fuentes de agua en lima. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Pública.* 25 (2): 204-207.
- Gertiser, M., Visciarelli' E., Basabe, N., Perez, M J. y Costamagna, S. 2010. *Acanthamoeba* spp. en piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Bioquím. Clín. Latinoam.* 44 (4): 697-703
- Gobierno del Estado de Oaxaca. 2011. Consultado en: <http://www.Oaxaca.gob.mx>. Consultado 11 de abril de 2013.

- Greub, G y Raoult, D. 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(2): 413-433.
- Guisasola F. 2011. Queratitis por *Acanthamoeba*. Análisis de casos en el Hospital Oftalmológico Santa Lucia (2009-2010). *Arch. Ofal. B. Aires.* 82 (1): 25-29.
- Hernández, J. C., Orihuela, D. L., Pérez-Mohedano, S., Marijuan, L. y Furet N.R. 2003. Efecto de la modificación del pH sobre la lixiviación de cationes en columnas de suelos calizos. *Estudios de la zona no saturada del suelo.* 7:99-104pp.
- Hsu, B., Huang, C., Chen, J., Chen, N. y Huang, J. 2011. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionella* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Res.* 45: 5171-5183.
- Instituto de Geología, Universidad Nacional Autónoma de México. Disponible en http://www.geologia.unam.mx/igl/index.php?option=com_content&view=article&id=363:hierveelagua&catid=186:ventanas&Itemid=174 . Consultado el 13 de septiembre, 2012.
- Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Oaxaca, 2002. Disponible en http://www.e-local.gob.mx/wb2/ELOCAL/EMM_Oaxaca . Consultado el 20 de agosto, 2014.
- John, D. T. 1993 Opportunistically pathogenic free-living. *En: Kreir, J. P. y Baker, J. (eds.). Parasitic Protozoa.* Vol. 3. San Diego. Academic Press 143-246.

- John, D.T. y Howard, M. 1995. Seasonal distribution of pathogenic free-living amoebae in Oklahoma waters. *Parasitol. Res.* 81:193-201.
- Khan, N., Jarroll, E., Panjwani, N., Cao, Z. y Paget, T. 2000. Proteases as markers for differentiation of pathogenic and nonpathogenic species of *Acanthamoeba*. *J. Clin. Microbiol.* 38 (8): 2858–2861.
- Khan, N. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 564–595.
- Kokare, C, R., Chakraborty, S., Khopade, A, N. y Mahadik K. 2009. Biofilm: Importance and applications. *Indian J. if Biotech.* 8:159-168
- Kyle, D. E. y Noblet, G. P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoeba. I. Willard's Pond. *J. Protozool.* 33 (3): 422-434.
- Lares-Jiménez, L. y Lares-Villa, F. 2009. Aislamiento de amibas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Rev. Lat. de Rec. Nat.* 5 (2): 161-167.
- Lares, F., Ayala, M. y Verdugo, E. 2001. Amibas de vida libre aisladas de jacuzzis y piscinas de uso recreativo en Hermosillo, Sonora. *ITSON-DIEP.* 3 (10) 39-47.
- Ledde, D.R., Lovieno, A., Miller, D., Mandal, N., Díaz, M., Fell, J., Fini, M. E. Y Alfonso, E.C. 2009. Molecular identification of T4 and T5 genotypes in isolates from *Acanthamoeba* keratitis patients. *Jour. of cli. Microbiol.* 47(5): 1458-1467.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega, A., Foronda, P., Martínez, E. y Valladares, B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitol. Res.* 95: 273-277.

- Loret, F. J. y Greub, G. 2010. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 213:167-175.

- Malpica, V,. 2003. Departamento de Geología Regional, Instituto de Geología UNAM. Consultado en : <http://archive.is/geologia.igeolcu.unam.mx>

- Manahan, S. E. 2007. *Introducción a la Química Ambiental.* Ed Reverté. 7ªed. España. 760 p.

- Marcianol, F., Puffenbarger, R. y Cabral, G. 2000. The increasing importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Eukaryot. Microbiol.* 47 (1): 29-36

- Marciano, F. y Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16 (2) : 273–307

- Marciano, F. 2009. Free-living amoebae as agents of human infection. Free-living amoebae as agents of human infection. *JID* (199): 1104-1106.

- Marciano, F., Jamerson, M. y Kaneshiro, E. 2010. Free-living amoebae, *Legionella* and *Mycobacterium* in tap water supplied by a municipal drinking water utility in the USA. *J. Wat. Health.* 8(1): 71-82

- Matin, A., Siddiqui, R., Jayasekera, S., y Ahmed Khan, N. 2008. Increasing importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clin. Microbiol. Rev.* 21 (3):435–448.

- Medical Care Development International.2009. Disponible en: http://www.mcdinternational.org/trainings/malaria/english/DPDx5/HTML/ImageLibrary/A-F/FreeLivingAmebic/body_FreeLivingAmebic_il12.htm. Consultado el 16 abril del 2016.

- Muñoz V., Reyes H., Toche P., Cárcamo C. y Gottlieb, B. 2003. Aislamiento de amibas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitol. Latin.* 58:106-111.
- National Geographic. Viajes, Hierve el Agua, Oaxaca. [en línea].2013. Consultado el 10 de septiembre, 2013. Consultado en: www.ngenespanol.com/traveler/420423/viajes-hierve-agua.
- Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas. Consultado en: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5256066&fecha=25/06/2012
- Oddó, D. 2006. Infecciones por amibas de vida libre Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Rev. Chil. Infect.* 23 (3): 200-214
- Page, F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Londres. 122 p.
- Paltiel, M., Powell, E., Lynch, J., Baranowski, B. y Martins, C. 2004. Disseminated cutaneous acanthamebiasis: A case report and review of the literature. *Cutis.* 73:241-248.
- Past. (2013). University of Oslo: Øyvind Hammer, Natural History Museum, University of Oslo.
- Peralta, M. y Ayala, J., 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Sal. Uni. Barran.* 25 (2): 280-292.
- Pereira, A y Pérez, M. 2003. Amibas de vida libre. *OFFARM.* 22 (6):114-117.

- Pérez de Galindo, M.V., Galindo, M., Dorta, A., Guzmán, C., Wagner, C., Vethencourt, M., Nessi, A., Bermúdez, A. y Pérez de Suárez, E. 2012. Hallazgos de amibas de vida libre de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Una experiencia venezolana. *Vitae* 58:1-16
- Pérez-Irezábala, J., Martínez, I., Isasa, P. Y Barrón, J. 2005. Queratitis por *Acanthamoeba*. Programa de control externo de calidad SEIMC.
- Pernin, P. y Pélandakis, M. 2001. About some aspects of the ecology and biodiversity of the *Naegleria* amoebae. *En: IX International Meeting on the Biology and Pathogenicity. John Libbey Eurotext*. París, Francia. p. 81-85.
- Pussard., M. y Pons, R. 1977 Morphologie de la paroi kstique et taxonomies du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistol.* 13: 557-598.
- Qvarnstrom, Y., da Silva, A., Schuster, F., Gelman, B. y Visvesvara, G. 2009. Molecular Confirmation of *Sappinia pedata* as a Causative Agent of Amoebic Encephalitis. *JID* 199:1139 – 42.
- Ramírez, E., Robles, E., Sainz, M., Ayala, R. y Campoy, E. 2009. Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 25 (4): 247-255
- Riestra, J., Riestra, R., Gonzáles, A., Moreno, P., Martínez, J., Visvesvara, G., Careaga, F., Oropeza de Alba, J., y Cornejo, S. 1997. Granulomatous amebic encephalitis due to *Balamuthia mandrillaris* (leptomyxiidae): report of four cases from México. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56(6): 603-607.
- Rivera, F., Paz, E., y López-Ochoterena, E. 1978. Transformación ameboflagelar espontánea e inducida en especies del género *Naegleria*, Alexeieff (1912), emend Calkins (1913), recolectadas en piscinas, grifos y reservorios naturales de agua dulce de la Ciudad de México. *Arch. Mex. de Anat.* 15:9-19.

- Rivera, F., Ortega, A., López, E y Paz, M. 1979. A quantitative morphological and ecological study of protozoa polluting tap waters in Mexico City. *Trans. Amer. Micr. Soc.* 98:465-469.
- Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Zaldívar, B., Ramírez, P. y Durán, A. 1993. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ. Res.* 62: 43-52.
- Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Hernández, D. y Rivera, V. 1994. Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in México City and its suburbs. *Water, Air, Soil Pollut.* 74: 65-87.
- Rodriguez-Zaragoza, S. 1994. Ecology of free-living amoebae. *Critic. Rev. Microbiol.* 20 (3): 225-241.
- Rondanelli, E. G. 1987. *Infectious Diseases. 1. Amphizoic Amoeba Human Pathology.* Piccin Nuova Libreria. Padua, Italia. 279 pp.
- Seas, C. y Bravo, F. 2006. Encefalitis amibianas granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad fatal reconocida cada vez más frecuentemente en América Latina. *Rev. Chil. Infect.* 23 (3): 197-199
- Siddiqui, R. y Khan, N. A. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors.* 5 (6): 365-372
- Sleigh, M. 1989. *Protozoa and other Protists.* Routledge, Chapman, Hall, New York. 320pp.

- Sminorv, A. y Thar, R. 2003. Spatial distribution of Gymnamoebae (Rhizopoda, Lobosea) in brackish-water sediments at the scale of centimeters and milimeters. *Protist.* 154: 359-369
- Sykora, J., Keleti, G., y Martínez, J. 1983. Ocurrence and pathogenic of *Naegleria fowleri* in artificially heated waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 45 (3): 974-979.
- Tapia, J. 2012. Amibas de vida libre. En: Tay J. (Ed.). *Microbiología y Parasitología Médica*. Editorial, México D.F. Cuarta edición. Cap 83. 749-760 p.
- Thomas, V., McDonnell, G., Denyer, S. P y Maillard, J. 2009. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Micro. Rev.* 34:231-259.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. y Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. Les amibes libres pathogenes: revue epidemiologique et clinique. *Path. Biol.* 60: 399–405
- Uribarren B, T. *Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia*. 2014. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.consultado el 25 marzo 2013. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html>.
- Uribe, O., Becerra, M., Alvarado, I., Méndez, P., Ontiveros, P., Sánchez, S., Chávez, L., Ceballos, J., Martínez, J., Visvesvara, G. y Olvera-Rabiela, J. 2001. Granulomatous amebic encephalitis by *Balamuthia mandrillaris*. *Pat. Rev. Lat.* 39:141-148.

- Vélez, M., Zapata, A., Ortiz, D., Trujillo, M., Restrepo, A. y Garcés, C. 2013. Reporte de caso y revisión de la literatura de caso de paciente con meningoencefalitis por amibas de vida libre. *Infect.* 17(3):153–159.
- Visvesvara, G. S., Moura, H. y Frederick, L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50: 1–26.
- Visvesvara, G., Schuster, F. y Martinez, J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N. G., N. sp., agent of amebic meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol.* 40: 504-514.
- Warhurst, D. 1985. Pathogenic free-living amoebae. *Parasitol. To.* 1: 24-28.
- Xhuan, Y:H., Chung, B.S., Hong, Y.C., Kong, H.H., Hahn, T.W. y Chung, D. 2008. Keratitis by *Acanthamoeba triangularis*: Report of cases and characterization of isolates. *Kor. Jour. Parasitol.* 46 (3):157-164.
- Zúñiga, C. I. y Caro, J. 2011. *Balamuthia mandrillaris*: una amiba de vida libre altamente letal. *Rev. Enf. Infec. Ped.* 96:134-135.

X. ANEXO

Cuadro 6. Presencia ausencia de especies ambianas durante el primer muestreo en cada poza

Sitio de muestreo	Cuerpo 1					Cuerpo 2					Cuerpo 3					Cuerpo 4				
	1aI	1aII	1b	1c	1d	2aI	2aII	2b	2c	2d	3aI	3aII	3b	3c	3d	4aI	4aII	4b	4c	4d
<i>A. astronyxis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>A. castellanii</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1
<i>A. culbertsoni</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
<i>A. griffini</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. palestinensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>A. polyphaga</i>	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1
<i>A. rhyodes</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. triangularis</i>	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Acanthamoeba</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0
<i>Echinamoeba</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hartmannella</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>N. fowleri</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>N. gruberi</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0
<i>Rosculus ithacus</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Saccamoeba</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Thecamoeba</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vannella. platypodia</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>V. simplex</i>	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vahlkampfia</i> sp.	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0

Cuadro 7. Presencia ausencia de especies amibianas durante el segundo muestreo en cada poza.

Sitio de muestreo	Cuerpo 1					Cuerpo 2					Cuerpo 3					Cuerpo 4				
	1aI	1aII	1b	1c	1d	2aI	2aII	2b	2c	2d	3aI	3aII	3b	3c	3d	4aI	4aII	4b	4c	4d
<i>A. astronyxis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0
<i>A. castellanii</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>A. culbertsoni</i>	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
<i>A. griffini</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>A. palestinensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>A. polyphaga</i>	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0
<i>A. rhyodes</i>	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>A. triangularis</i>	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0
<i>Acanthamoeba sp.1</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0
<i>Echinamoeba</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Hartmannella</i>	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>N. fowleri</i>	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
<i>N. gruberi</i>	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0
<i>Rosculus ithacus</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
<i>Saccamoeba</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
<i>Thecamoeba</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>V. platypodia</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>V. simplex</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Vahlkamphia sp.</i>	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0

Medio NNE (Agar no nutritivo)

Reactivos:

- NaCl.....0.12g
- MgSO₄.7H₂O.....0.004g
- Na₂HPO₄.....0.146g
- CaCl₂.2H₂O.....0.004g
- KH₂PO₄.....0.136g
- Bactoagar.....15g
- Agua destilada.....1000ml

Procedimiento:

- Mezclar en seco todos los componentes, agregar primero 500ml y agitar hasta homogenizar la solución, posteriormente aforar a 1L.
- Calentar hasta ebullición hasta disolver el agar
- Esterilizar a 121 ° C durante 15 min
- Verter en caja Petri (15 a 20 ml)
- Al solidificar el agar, se coloca 4 gotas de un cultivo puro de *Enterobacter aerogenes* inactivado por calor, se distribuye homogéneamente con un asa de vidrio estéril.
- Dejar reposar 1 hora aproximadamente
- Guardar en el refrigerador de manera invertida