



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA**

**CARRERA DE BIOLOGÍA**

**“AMIBAS DE VIDA LIBRE EN LAS GRUTAS DE  
TOLANTONGO, HIDALGO, MÉXICO”**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**Mauricio Dominguez Gómez**

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra**



**Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla de Baz, Estado de México, 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud a todas las personas que han formado parte de mi vida durante el tiempo en que este proyecto de investigación se llevó a cabo.

Primeramente, mi profundo agradecimiento a la Dra. Elvia Manuela Gallegos Neyra, tutora de este proyecto, que desde el momento en que la conocí, me abrió las puertas de su laboratorio, confió en mis capacidades y me guio, no solamente en la elaboración de este trabajo, sino en mi desarrollo personal, brindándome su amistad, cariño y tiempo.

A los doctores Alfonso y Rosario, una pareja modelo, que han compartido conmigo su conocimiento y tiempo, además de haberme enseñado campos de la biología de los que desconocía y a los cuales me interesa dedicarme de ahora en adelante. A la maestra Dolores por haberme brindado su tiempo, conocimiento y amabilidad para el correcto desarrollo de este trabajo. Al biólogo Daniel, que me brindo su tiempo durante el desarrollo de este proyecto y su amistad a lo largo de la carrera, le estaré infinitamente agradecido por todo el apoyo y cariño brindados hacia mí.

A mis padres, quienes me educaron y me han formado a lo largo del tiempo, que han confiado en mí y me han guiado por el camino correcto, además, me han enseñado que la familia nunca te dejara solo. A mis hermanos que me han apoyado durante toda mi vida y me han enseñado el sentido de protección. A mi familia en general por ser tan unida y cariñosa, única en el mundo.

A Monse, una de las personas más importantes en mi vida, mi cómplice, mi confidente, mi inspiración, con tu forma de ser has influido positivamente en mí, siempre me haces mejorar en todos los sentidos, te quiero con todo mi corazón.

A mis amigos Héctor, Sandi, Alexis, Carlos, Denise, Viri y Mariana que me han dado su amistad incondicional y hemos compartido muchas aventuras a lo largo de la carrera, los llevare siempre conmigo.

A mis amigos del laboratorio Víctor, Tokki, Armi, Paty, Ivonne y Cris, con los que compartí muchos momentos durante el desarrollo de esta investigación y con los que estoy profundamente agradecido por escucharme, siempre tendrán un amigo en mí.

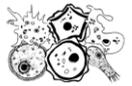


## CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
1. Amibas de vida libre.....	2
1.1. Morfología de las amibas de vida libre.....	2
1.2. Taxonomía de amibas de vida libre.....	4
1.3. Ecología de las amibas de vida libre.....	5
2. Amibas de vida libre potencialmente patógenas.....	7
2.1. Género <i>Acanthamoeba</i> .....	7
2.2. Ciclo de vida de las especies de <i>Acanthamoeba</i> .....	8
2.2. <i>Naegleria fowleri</i> .....	9
2.4. Ciclo de vida de <i>Naegleria fowleri</i> .....	10
2.5. <i>Balamuthia mandrillaris</i> .....	11
2.6. <i>Vermamoeba vermiformis</i> .....	12
2.7. <i>Sappinia pedata</i> .....	12
3. Importancia médica.....	13
3.1. Enfermedades producidas por amibas de vida libre.....	13
3.2. Meningoencefalitis amibiana primaria.....	13
3.3. Encefalitis amibiana granulomatosa.....	14
3.4. Queratitis amibiana.....	14
3.5. Acantamebiosis cutánea.....	15
III. ANTECEDENTES.....	16
1. Estudios sobre amibas de vida libre en el mundo.....	16
2. Estudios sobre amibas de vida libre en México.....	17
IV. JUSTIFICACIÓN.....	20
V. OBJETIVOS.....	21
1. Objetivo general.....	21
1.1. Objetivos particulares.....	21
VI. ÁREA DE ESTUDIO.....	22
1. Descripción general del sitio de muestreo.....	23
2. Zonas de muestreo.....	24
2.1. Zona 1 (cascada).....	24



2.2. Zona 2 (gruta principal) .....	24
2.3. Zona 3 (túnel) .....	25
2.4. Zonas 4, 5 y 6 (río Tolantongo).....	25
2.5. Zona 7 (alberca mayor).....	25
2.6. Zona 8 (alberca secundaria) .....	25
2.7. Zonas 9, 10, 11, 12, 13 y 14 (pozas) .....	26
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
1. Trabajo en campo .....	27
1.1. Recolecta y transporte de las muestras de agua, sedimento y biopelícula	27
1.2. Registro de parámetros fisicoquímicos del agua <i>in situ</i> .....	27
2. Trabajo en laboratorio .....	28
2.1. Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre.....	28
2.2. Identificación morfológica de las amibas aisladas .....	28
2.3. Prueba de termotolerancia.....	29
2.4. Pruebas de patogenicidad .....	29
2.5. Análisis estadístico .....	30
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
1. Descripción y registro fotográfico de las especies aisladas de amibas de vida libre .....	33
2. Comparación de la diversidad de amibas de vida libre por temporadas .....	49
3. Frecuencia de amibas de vida libre en los diferentes biotopos muestreados ...	50
4. Pruebas de termotolerancia .....	51
5. Pruebas de patogenicidad.....	54
5.1. Pruebas de osmolaridad .....	54
6. Parámetros fisicoquímicos del agua.....	56
6.1. Temperatura .....	57
6.2. pH .....	58
6.3. Conductividad .....	59
7. Análisis estadístico.....	60
7.1. Análisis de cluster.....	60
7.2. Escalamiento multidimensional no métrico .....	61
IX. CONCLUSIONES .....	63
X. RECOMENDACIONES .....	64



XI. LITERATURA CITADA.....	65
XII. ANEXOS .....	73
Anexo I. Medios de cultivo para AVL.....	74
Anexo II. ANOSIM entre las dos temporadas muestreadas (época de lluvia y de sequías) .....	77

### Contenido de figuras

Figura 1. Esquema general de los componentes morfológicos generales del trofozoíto de una amiba de vida libre .....	3
Figura 2. Esquema general de los componentes morfológicos generales de un quiste de una amiba de vida libre.....	4
Figura 3. Clasificación taxonómica de amibas de vida libre potencialmente patógenas .....	5
Figura 4. Clasificación de los quistes de <i>Acanthamoeba</i> en base a características morfológicas. ....	8
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i> sp.....	9
Figura 6. Estadios de <i>Naegleria fowleri</i> .....	10
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Naegleria</i> sp.....	11
Figura 8. Mapa de ubicación del municipio del Cardonal, Hidalgo en la República Mexicana. ....	22
Figura 9. Imágenes del balneario las Grutas de Tolantongo en el estado de Hidalgo.. ..	23
Figura 10. Distribución de las zonas de muestreo en las Grutas de Tolantongo, Hidalgo. ....	24
Figura 11. Total de especies de amibas de vida libre encontradas durante las dos épocas del año. ....	33
Figura 12. <i>Acanthamoeba astronyxis</i> . Fotografía de la fase quística. ....	34
Figura 13. <i>Acanthamoeba castellanii</i> . Fotografía de la fase quística. ....	35
Figura 14. <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> . Fotografía del trofozoíto. ....	36
Figura 15. <i>Acanthamoeba griffini</i> . Fotografía de la fase quística.....	37
Figura 16. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> . Fotografía de la fase quística.....	38
Figura 17. <i>Acanthamoeba rhyssodes</i> . Fotografía de la fase quística.....	39
Figura 18. <i>Acanthamoeba triangularis</i> . Fotografía de la fase quística.....	40
Figura 19. <i>Naegleria</i> sp. Fotografía de la fase quística .....	41
Figura 20. <i>Naegleria gruberi</i> . Fotografía de la fase quística.....	42
Figura 21. <i>Korotnevella stella</i> . Fotografía del trofozoíto .....	43
Figura 22. <i>Rosculus ithacus</i> . Fotografía del trofozoíto y del quiste .....	44
Figura 23. <i>Saccamoeba limax</i> . Fotografía del trofozoíto .....	45
Figura 24. <i>Vannella mira</i> . Fotografía del trofozoíto. ....	46
Figura 25. <i>Vannella platypodia</i> . Fotografía del trofozoíto .....	47
Figura 26. <i>Vannella simplex</i> . Fotografía del trofozoíto .....	48

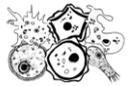


Figura 27. Comparación de riqueza específica de AVL por temporadas del año en el balneario.....	50
Figura 28. Comparación de la presencia de AVL por biotopo.en el balneario.....	51
Figura 29. Valores de temperatura medidos entre las dos temporadas muestreadas en las distintas zonas de muestreo del balneario. ....	57
Figura 30. Valores de pH obtenido entre las dos temporadas muestreadas en las distintas zonas de muestreo en el balneario. ....	58
Figura 31. Valores de conductividad obtenido entre las dos temporadas muestreadas en las distintas zonas de muestreo del balneario. ....	59
Figura 32. Dendograma de agrupamiento para la época de sequía en las diferentes zonas muestreadas. ....	60
Figura 33. Dendograma de agrupamiento para la época de sequía en las diferentes zonas muestreadas.....	61
Figura 34. Escalamiento multidimensional no métrico. ....	62

#### Contenido de cuadros

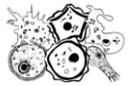
Cuadro 1. Especies de AVLPP obtenidas durante la temporada de lluvias sometidas a pruebas de termotolerancia.....	58
Cuadro 2. Especies de AVLPP obtenidas durante la temporada de sequias sometidas a pruebas de termotolerancia.....	59
Cuadro 3. Especies de AVLPP obtenidas durante la temporada de lluvias sometidas a pruebas de patogenicidad.....	60
Cuadro 4. Especies de AVLPP obtenidas durante la temporada de sequias sometidas a pruebas de patogenicidad. ....	61



## I. RESUMEN

Las amibas de vida libre (AVL), son protozoos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en ambientes terrestres como en acuáticos. Algunas se encuentran asociadas a diferentes enfermedades como: Queratitis amibiana (QA) y encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) causadas por algunas especies de *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, o más recientemente por *Sappinia pedata*. Y meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) causada por *Naegleria fowleri*. En el presente trabajo se analizaron 84 muestras de agua, sedimento y biopelícula provenientes de 14 zonas muestreadas en el balneario natural las Grutas de Tolantongo, Hidalgo, obteniendo un gran número de muestras positivas para amibas de vida libre de las cuales se identificaron seis géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Korotnnevelia*, *Rosculus*, *Saccamoeba* y *Vannella*. Se identificaron amibas pertenecientes a dos géneros con potencial patógeno: *Acanthamoeba* y *Naegleria*, observando una mayor riqueza específica en el primer muestreo realizado en la temporada de lluvias y obteniendo como biotopo predominante al agua en ambas temporadas (época de lluvias y época de sequía). Se realizaron pruebas de osmotolerancia a las cepas reportadas con potencial patógeno, como resultado se obtuvo que la mayoría de las cepas aisladas resultaron resistentes al medio NNE con concentración 0.5 M de D-manitol y solo tres cepas resultaron positivas en la concentración de 1M de D-manitol.

En conclusión, la presencia de AVL con potencial patógeno en el balneario las Grutas de Tolantongo, puede representar un riesgo para la salud pública de los usuarios de las instalaciones, sumado a esto, los pocos registros que se tienen de las enfermedades causadas por estas amibas y el mal diagnóstico por parte de las autoridades médicas resaltan una señal de alerta dentro de las instalaciones



## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Amibas de vida libre

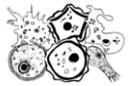
El nombre de "amiba" se deriva de la antigua palabra griega ἀμοιβή, que significa "cambio", que hace referencia al aspecto cambiante de este microorganismo cuando se mueve. Las amibas se desplazan por medio de pseudópodos y alimentan por medio de la corriente citoplasmática. Este método único de locomoción se denomina movimiento ameboide (Fernández, 2015).

Las amibas de vida libre (AVL), son protozoos que se encuentran en ambientes acuáticos como: piscinas, lagunas y estanques, así como en suelo y biopelículas (Muñoz *et al.*, 2003). Se han encontrado en temperaturas entre 10 y 55 °C, y se ha reportado que temperaturas por encima de los 32 °C favorecen la proliferación de algunas especies que pueden ser patógenas, por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales (Gallegos, 1997).

Dentro de este grupo, existen algunas especies con capacidad para vivir como organismos de vida libre y como endoparásitos, a las cuales se les conoce como organismos anfitriónicos (Peralta y Ayala, 2009). La mayoría no están bien adaptadas al parasitismo, pues terminan con la vida del hospedero que invaden, no dependen de un hospedero o vector para su transmisión y no se transmiten de humano a humano (Mendoza, 2014).

#### 1.1 Morfología de las amibas de vida libre

Las amibas de vida libre son cosmopolitas y pertenecen al reino protozoa, son organismos unicelulares, su cuerpo está formado por una membrana plasmática rodeada por hialinoplasma, presenta un núcleo, una vacuola alimenticia, una vacuola contráctil, pseudópodos; los cuales son proyecciones citoplasmáticas que sirven tanto para su locomoción como para su alimentación, y uroide, estos últimos son de gran importancia para su identificación morfológica. Las amibas son organismos capaces de



sobrevivir a cambios graduales en el ambiente (Hickman *et al.*, 2001; Smirnov y Brown, 2004). Presentan dos formas en su ciclo de vida; la primera es un trofozoíto; en esta fase la amiba es móvil, prolifera y se alimenta de una amplia variedad de microorganismos, principalmente bacterias y levaduras. (Esquivel, 2018) (Fig. 1).

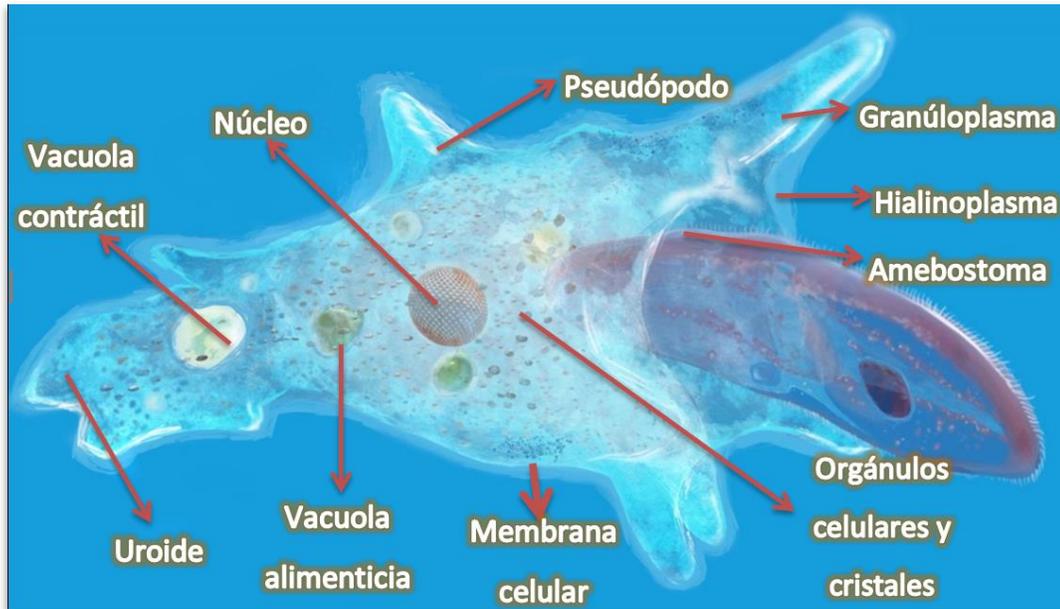


Figura 1. Esquema general de los componentes morfológicos generales del trofozoíto de una amiba de vida libre (Mendoza, 2014).

La segunda forma se denomina quiste, es una estructura de resistencia, la cual está compuesta de dos capas: el endoquiste y exoquiste. En este estadio los trofozoítos, disminuyen su metabolismo y adoptan una forma redonda, permaneciendo viables durante mucho tiempo, presentan una gran resistencia a la desecación, a temperaturas extremas, a diversos agentes antimicrobianos y desinfectantes. (Ramírez *et al.*, 2009; Coulon *et al.*, 2010) (Fig. 2).

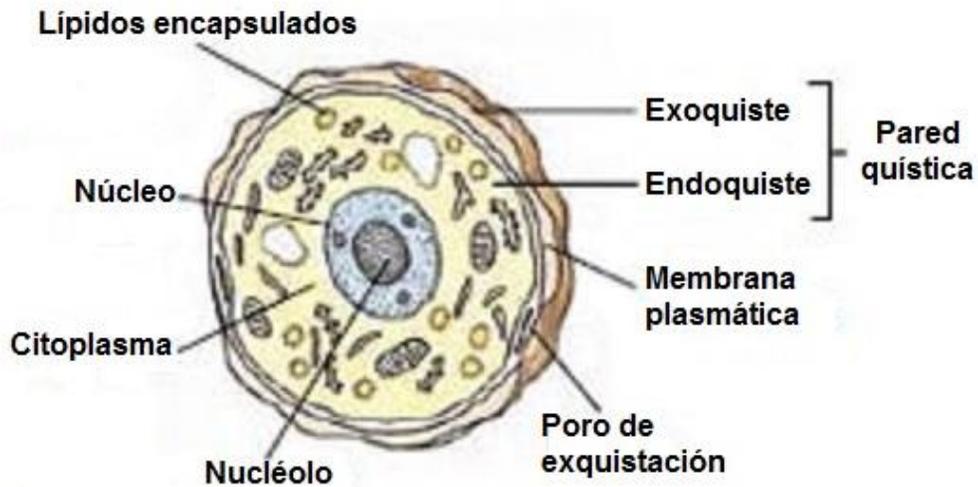
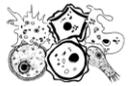


Figura 2. Esquema general donde se muestran los componentes morfológicos de un quiste de una amiba de vida libre (Mendoza, 2014).

## 1.2. Taxonomía de amibas de vida libre

Actualmente, la Sociedad Internacional de Protistología utiliza una clasificación taxonómica basada en enfoques morfológicos modernos, las vías bioquímicas y filogenia molecular. De acuerdo con el nuevo esquema propuesto por Adl y cols. en 2012, los eucariontes han sido clasificados dentro de los grupos Amorphea, Diaphoretickes e Incertae sedis Eukaryota, estos se dividen en cinco “clusters” o “súper grupos” llamados: Amoebozoa, Opisthokonta, Archaeplastida, Excavata y el más recientemente agregado, SAR. En cuanto a las AVL según la nomenclatura actual han sido clasificadas dentro de dos súper grupos: Amoebozoa y Excavata (Adl *et al.*, 2012) (Fig. 3).

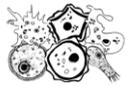
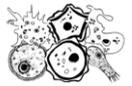


Figura 3. Clasificación taxonómica de AVLPP según Adl y cols. en 2012.

### 1.3. Ecología de las amibas de vida libre

Las amibas de vida libre son organismos que constituyen parte esencial de las cadenas tróficas, del flujo energético en los cuerpos de agua y en el reciclado de nutrientes. Son organismos heterótrofos y tienen la capacidad de alimentarse tanto de forma osmótrofa (materia orgánica disuelta), como holozóica (bacterias, materia particulada y otros organismos) por fagocitosis, de esta forma reducen la población bacteriana y la materia orgánica particulada en suspensión (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005; Coulon *et al.*, 2010; Siddiqui y Khan, 2012).

Las AVL presentan en general una distribución cosmopolita y son ubicuas en la naturaleza (Martínez, 1985) debido a esto es común encontrarla en formaciones cársticas (formada cuando el agua disuelve las rocas calizas a lo largo de las fracturas, formando canales de drenaje y conductos subterráneos) por ejemplo, en las Grutas de

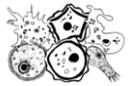


Tolantongo. Desde el punto de vista ecológico, estas formaciones tienen un papel muy importante en el ciclo hidrológico (Sigala, 2011), así que, dentro de estos ecosistemas podemos caracterizar diferentes biotopos como son: agua, biopelícula, suelo y vegetación (Montes, 2012).

Los mecanismos de dispersión por los cuales se da la entrada y la colonización de los protozoos a Grutas en general tienen lugar por la intermediación de las aguas que penetran o se infiltran en las capas subterráneas y originan los ríos, riachuelos y aguas subterráneas. De esta manera, penetran a las formaciones en cualquiera de sus estadios, lo que permite explicar la existencia en las Grutas de una comunidad rica y diversa de los protozoos, asimismo, no queda excluido su ingreso por las entradas de esta a través de las corrientes de aire con polvo e inclusive en las Grutas acondicionadas y visitadas por el hombre, este mismo puede servir como medio para la entrada de estos a la cueva (Fernández, 2015).

Las amibas de vida libre junto con los flagelados y ciliados, tienen dos importantes funciones ecológicas, influyen en la estructura de la comunidad microbiana y mejoran el reciclaje de nutrientes. Ambas actividades están asociadas con el hecho de que las amibas se alimentan de bacterias, de manera que regulan la población bacteriana reduciéndola hasta en un 60 % (Siddiqui y Khan, 2012).

Las AVL tienen, así mismo, la capacidad de establecer y estimular la producción de biopelículas mediante la adhesión a las superficies y la secreción de sustancias metabólicas tales como polisacáridos y proteínas (Khan *et al.*, 2006), 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 proporciona un ambiente rico para su replicación (Bigot *et al.*, 2013).



## 2. Amibas de vida libre potencialmente patógenas

Existen cinco géneros de amibas de vida libre potencialmente patógenas (AVLPP) asociadas a enfermedades en humanos que afectan directamente el sistema nervioso central (SNC), piel, ojos, etc. estos son: *Acanthamoeba* spp, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Vermamoeba vermiformis*, y *Sappinia pedata* (Lares-Jiménez *et al.*, 2009).

### 2.1. Género *Acanthamoeba*.

En general, son las amibas más frecuentemente aisladas en ambientes húmedos, y por ello son consideradas uno de los protozoos más ubicuos y por lo tanto está en permanente contacto con el ser humano y los animales. Su ciclo se compone de dos fases: trofozoíto y quiste. El trofozoíto mide entre 15 a 35  $\mu\text{m}$ , su movilización es a través de pseudópodos filamentosos (acantópodos) (Castrillón y Orozco, 2013). El quiste mide entre 15 a 28  $\mu\text{m}$ , se encuentra compuesto por celulosa (Schuster y Visvesvara *et al.*, 2004)., contiene una doble pared (el endoquiste y el exoquiste), generalmente de forma estrellada, la cual se forma cuando las condiciones del ambiente no son adecuadas, como respuesta a la desecación, al efecto de medios físicos o químicos de desinfección (Aksozek *et al.*, 2012).

Hasta el momento hay descritas 24 especies de *Acanthamoeba*. Se dividen en tres grupos principales (Fig. 4), dependiendo de la morfología del quiste (Pussard y Pons, 1977; Page 1988). De estas, solo 12 especies han sido reportadas como potencialmente patógenas: *Acanthamoeba astronyxis*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba griffini*, *Acanthamoeba hatchetti*, *Acanthamoeba lenticulata*, *Acanthamoeba lugdunensis*, *Acanthamoeba palestinensis*, *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba quina*, *Acanthamoeba rhyssodes* y *Acanthamoeba triangularis*.

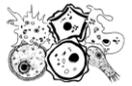


Figura 4. Clasificación de los quistes de *Acanthamoeba* spp. con base en sus características morfológicas (Mendoza, 2012).

## 2.2. Ciclo de vida de las especies de *Acanthamoeba*.

El trofozoíto de *Acanthamoeba* spp. es la forma infectante. Este puede ingresar al organismo a través de diferentes lugares como la vía respiratoria alta y baja, la córnea y vía cutánea por exposición directa a suelo, agua contaminada, o lentes de contacto (el quiste puede resistir hasta 14 días en soluciones desinfectantes) posteriormente el trofozoíto puede viajar por líquido cefalorraquídeo hasta el cerebro generando así encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) aunque también puede instalarse en la córnea generando queratitis amibiana (QA) o en piel generando acantamebiosis cutánea (AC) (Fig. 5) (Bradbury *et al.*, 2014).

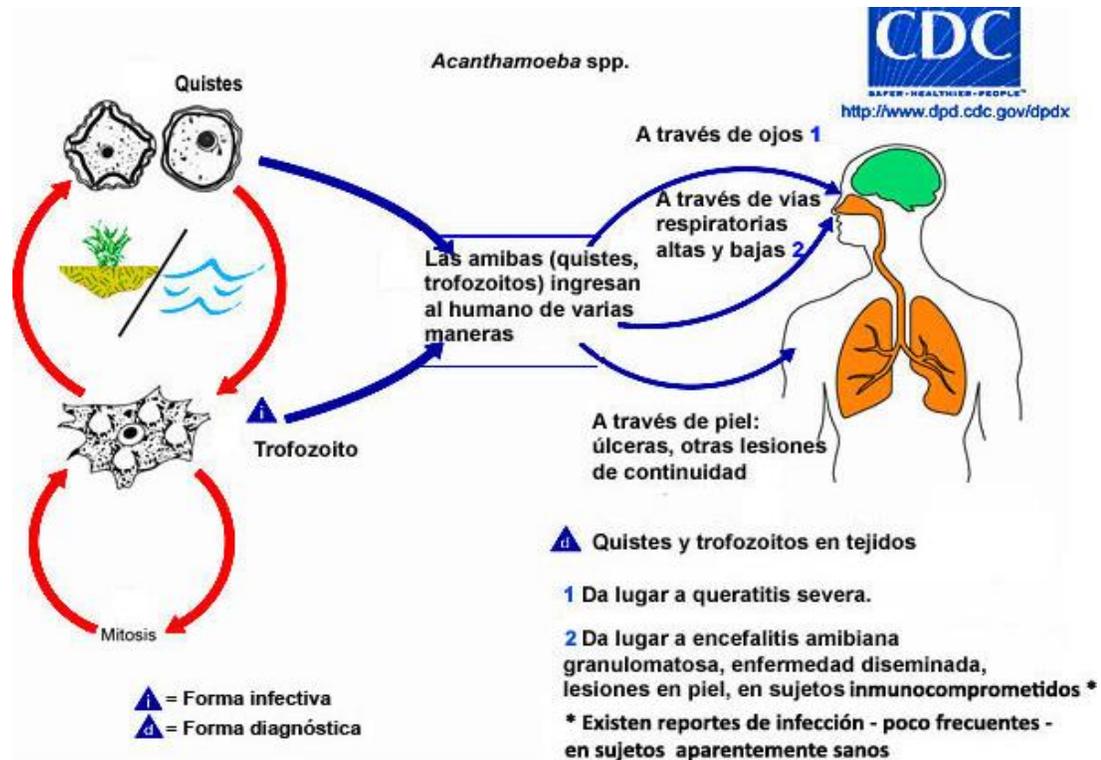


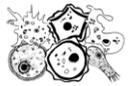
Figura 5. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* sp. (CDC, 2018).

## 2.2. *Naegleria fowleri*

Es la amiba que posee la mayor virulencia y letalidad a corto plazo de todas las AVL que infectan al hombre. Dentro de este género se describieron alrededor de 47 especies, y dentro de estas, sólo una, *Naegleria fowleri*, ha demostrado ser patógena para el humano (De Jonckheere, 2004; 2011).

*Naegleria fowleri* es una AVL que se encuentra comúnmente en ambientes de agua dulce, es el agente etiológico de la meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), una enfermedad mortal del sistema nervioso central (Taméz, 2019).

El ciclo de vida se compone de tres estadios: trofozoíto, forma flagelada y quiste (Fig. 6). La fase trófica mide aproximadamente de 15 a 25 µm. El citoplasma es finamente granular y contiene múltiples mitocondrias, lisosomas y vacuolas. La forma flagelada suele ser biflagelada, aunque en ocasiones puede contener más de diez flagelos y constituye una etapa en que la amiba no se alimenta, solo le sirve para desplazarse a un mejor ambiente. El quiste es esférico, mide de 8 a 12 µm, contiene un núcleo central



y un nucleolo central, aunque puede ser variable entre especies (*N. fowleri*, *N. jadini*, *N. gruberi*). Cuando las condiciones ambientales se tornan de nuevo favorables, el desenquistamiento se produce relativamente pronto (Chávez-Munguía *et al.*, 2009).



Figura 6. Estadios de *Naegleria fowleri*: a) trofozoíto b) flagelado y c) quiste (John, 1993).

#### 2.4. Ciclo de vida de *Naegleria fowleri*

La vía de infección de *Naegleria fowleri* más común es a través del neuroepitelio olfatorio, por lo que la infección se lleva a cabo de forma más frecuente en aquellos individuos que nadan en aguas con estas amibas: lagos, piscinas, embalses, corrientes termales, manantiales. *N. fowleri* se ha mostrado resistente al agua poco clorada y de allí el riesgo de infección en las piscinas. Estas amibas en algunos casos penetran a través de la lámina cribosa del etmoides, para alcanzar el cerebro y las meninges causando graves cuadros de necrosis e inflamación, llevando a una MEAP que puede ocasionar la muerte (Fig. 7) (Taméz, 2019).

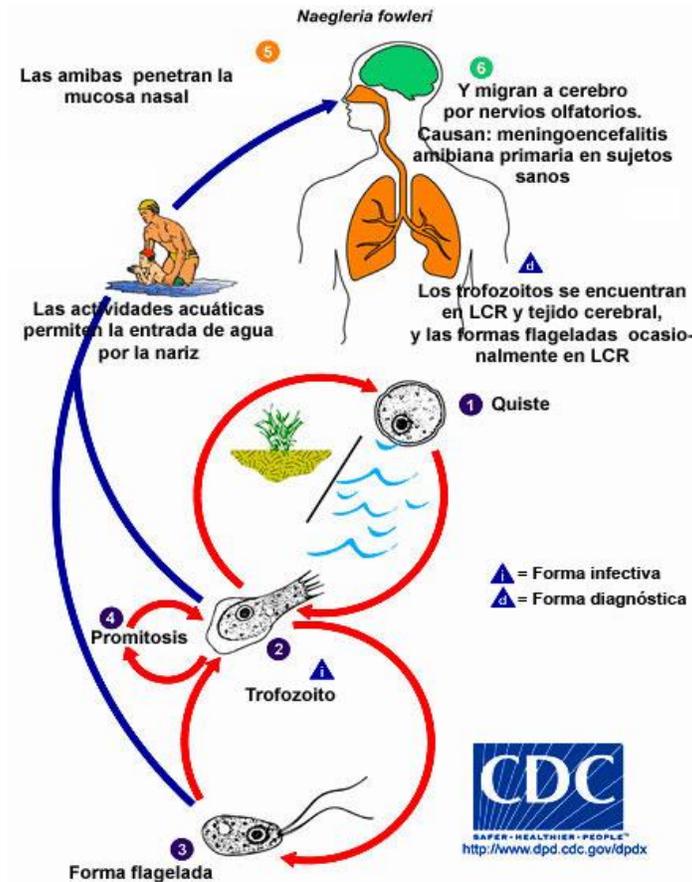
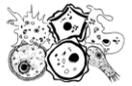


Figura 7. Ciclo de vida de *Naegleria* sp. (CDC, 2018).

## 2.5. *Balamuthia mandrillaris*

Esta amiba fue aislada originalmente del tejido cerebral de un babuino (*Papio sphinx*) que murió en el zoológico de San Diego (Marciano *et al.*, 2000). Hasta la fecha, se han descrito más de 100 casos de meningoencefalitis amibiana granulomatosa causada por este organismo (Zúñiga y Caro, 2011). Aunque *Balamuthia* ha sido descrita como una amiba de vida libre, sólo hay dos informes de su aislamiento en el ambiente; la distribución precisa, nicho, o fuente de alimento preferido de estas amibas no se conoce. Existen diversas hipótesis, la primera de ellas indica 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 segundo, que sean organismos de lento crecimiento (Matin *et al.*, 2008).

El aspecto y tamaño de los trofozoítos y quistes de *B. mandrillaris* es semejante al de *Acanthamoeba* spp. Sin embargo, los trofozoítos, que miden de 15 a 60 µm, tienen un



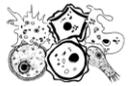
peculiar retículo endoplasmático acintado, y se desplazan lentamente mediante amplias proyecciones aplanadas, llamadas lamelipodios, los cuales lo diferencian de las prolongaciones espinosas del género *Acanthamoeba*. Los quistes miden de 15 a 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y tienen una triple pared (Alvarez, 2015).

## **2.6. *Vermamoeba vermiformis***

Es la primera amiba conocida como parásita del hombre. Existen escasos datos referidos a su morfología, discretamente similar a las anteriores. El género *Vermamoeba* fue incluido en la lista de patógenos humanos en 1994 por Weekers y cols. Solo existe un caso publicado en Nigeria donde produjo meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP). Posteriormente se han documentado casos de queratitis en portadores de lentes de contacto, por *Vermamoeba* en coinfección con *Acanthamoeba* (De Jonckheere, 1998) o *Vahlkampfia* (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005) o también con *Pseudomonas* sp., bacteria descrita como causante de queratitis (Dini *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2013). En el año 2013 en Irán, se identificó un primer caso de queratitis por *Vermamoeba vermiformis*, aislándose e identificando morfológicamente y por medio de PCR (Abedkhozasteh *et al.*, 2013). Existen, no obstante, discrepancias sobre la patogenicidad de este género. No existe certeza de dicha patogenicidad ya que no está documentado ningún experimento “*in vivo*” donde este género produzca infección en el animal de experimentación (De Jonckheere y Brown, 1998), y sigue sin demostrarse en la actualidad.

## **2.7. *Sappinia pedata***

La amiba *Sappinia pedata* está ampliamente distribuida en el ambiente, ha sido aislado de hojarasca, heces de alces, bisontes y ganado, así como del recto de lagartos. *Sappinia pedata* 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 inmunocompetente, el cual sobrevivió a la infección (Trabelsi *et al.*, 2012). En un principio, basándose en el criterio morfológico y de inmunofluorescencia, la infección fue atribuida a *Sappinia diploidea* (Marciano, 2000), 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 *Sappinia pedata* (Trabelsi *et al.*, 2012).

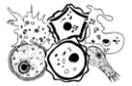
### **3. Importancia médica de las amibas de vida libre**

#### **3.1. Enfermedades producidas por amibas de vida libre**

La capacidad de las AVL para causar enfermedades en humanos ha sido reconocida desde hace más de 40 años, cuando Fowler y cols. (1965) reportaron los primeros cuatro casos de meningoencefalitis producidas por estos microorganismos. Sin embargo, son identificadas cada vez con mayor frecuencia, no sólo como causantes de enfermedades en pacientes inmunodeprimidos, sino también en hospedadores sanos, por lo que podrían considerarse entre las llamadas enfermedades emergentes, lo que aumenta mucho su interés.

#### **3.2. Meningoencefalitis amibiana primaria**

El agente causal de la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) es *Naegleria fowleri*; afecta principalmente a niños inmunocompetentes y adultos jóvenes, la mayoría de los casos han tenido como antecedente común natación en época calurosa. (Visvesvara *et al.*, 2007) ocasionando la muerte en un lapso de 3 a 7 días después de haber adquirido la infección. 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 una meningitis de tipo hemorrágico, el cuadro clínico tiene un inicio súbito, con curso rápido y fulminante, caracterizado por cefalea frontal y bitemporal intensa, fiebre (de 38 a más de 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 o 72 horas (o hasta una semana después) del inicio del cuadro, principalmente por paro



cardiorrespiratorio y edema pulmonar (Dirección General de Epidemiología, 2012; Fernandez, 2015; Siddiqui, 2016).

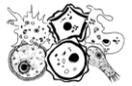
### **3.3. Encefalitis amibiana granulomatosa**

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) es una infección del sistema nervioso central producida por *Acanthamoeba* spp. o *Balamuthia mandrillaris*. Se caracteriza por un curso clínico insidioso y prolongado, pero igualmente fatal. Esta infección, se produce principalmente, en personas inmunosuprimidas (Visvesvara *et al.*, 2007; Fernandez, 2015).

La vía de entrada e invasión de *Acanthamoeba* spp. y *Balamuthia mandrillaris* al sistema nervioso central (SNC) es hematógena, con el foco primario en la piel o en el tracto respiratorio, por inhalación de aire, aerosoles y polvo 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 encéfalo; se puede presentar hemiparesia, cambios en la personalidad, somnolencia, convulsiones, cefalea de tipo insidioso, fiebre esporádica, y rigidez de la nuca en la mayoría de los casos; náusea, vómito y 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; Uribarren, 2014; Taméz, 2018).

### **3.4. Queratitis amibiana**

La queratitis amibiana (QA) corresponde a un proceso inflamatorio crónico activo producido por *Acanthamoeba* spp. que afecta la córnea y a veces la conjuntiva, 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, micobacteriana o viral, lo que provoca que el diagnóstico correcto y



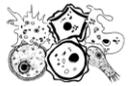
el comienzo del tratamiento se retrasen semanas o meses (Booton *et al.*, 2004). La enfermedad se ha asociado en el 80 % de los casos a uso de lentes de contacto (limpieza y/o almacenamiento inadecuados) por sujetos sanos, a su empleo durante deportes acuáticos y a traumatismos corneales (Uribarren, 2014). Hallazgos recientes implican al genotipo T4, principalmente *A. castellanii* en 94 % de los casos como agente etiológico de la queratitis de origen amibiano (Booton *et al.*, 2005).

### **3.5. Acantamebiosis cutánea**

Las infecciones de la piel producidas por amibas son raramente bien diagnosticadas. Están relacionadas con el estado inmunológico por lo cual es más común encontrarla en personas inmunocomprometidas, aunque se han reportado casos en personas inmunocompetentes en Perú (Galarza *et al.*, 2006).

La acantamebiosis cutánea se caracteriza por la presencia de nódulos eritematosos duros o úlceras en la piel. Las manifestaciones tempranas de la acantamebiosis cutánea incluyen la presencia de pápulo-nódulos que drenan material purulento y que luego se convierten en úlceras que no sanan (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

Las úlceras, proveen una ruta de entrada al torrente sanguíneo, seguido por una diseminación hematológica a diferentes tejidos, el cual puede traer consigo consecuencias fatales (Khan, 2006).



### III. ANTECEDENTES

Durante las dos últimas décadas, el estudio de las AVL en especial las patógenas, ha comenzado a ser tema de interés debido a su importancia médica y ecológica. Ya que hoy en día son bien conocidas como patógenos causantes de infecciones serias y mortales y que además tienen un rol importante en los ecosistemas y actúan como reservorios de algunos microorganismos (Schuster y Visvesvara, 2004; Khan, 2006).

#### 1. Estudios sobre amibas de vida libre en el mundo

Muñoz y cols. en 2003, analizaron en Santiago de Chile un total de ocho piscinas públicas de las cuales cinco resultaron positivas para AVL, el género de amiba patógena que se encontró en mayor número fue *Naegleria* spp. con cinco cepas encontradas en las ocho piscinas muestreadas, mientras que *Acanthamoeba* spp. fue reportada con tres cepas en las ocho piscinas.

Lorenzo-Morales y cols. en 2005, aislaron e identificaron diferentes especies de *Acanthamoeba* en fuentes de agua potable de Tenerife, España. Donde demostraron el potencial patógeno de estas por medio de pruebas de osmolaridad y termotolerancia.

Init y cols. en 2010, detectaron la presencia de AVL en 14 piscinas en Malasia, donde aislaron diferentes especies de *Acanthamoeba* y *Naegleria*, ambas mostraron un mayor crecimiento (80.4 %) a temperatura ambiente (25-28 °C) y menor (70 %) a 37 °C.

Retana-Moreira en 2014, reportó la presencia de *Acanthamoeba* spp. y *Balamuthia mandrillaris* en duchas de Costa Rica siendo el primer reporte de América Latina en el cual se reporta la presencia de *B. mandrillaris*.

Latifi y cols. en 2016, demostraron la presencia de *Balamuthia mandrillaris*, *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria* spp. en aguas termales de la provincia de Mazandrara al norte de Irán. Encontrando una mayor presencia de estas AVL en aguas con pH bajo y temperaturas entre los 32 y 42 °C. Este es el primer registro de *B. mandrillaris* en aguas termales de uso recreativo.



Ahmad Karamati y cols. en 2016, aislaron y caracterizaron molecularmente diferentes genotipos de *Acanthamoeba* spp. en suelos de diferentes áreas públicas y recreativas en Irán, donde el 41.6 % de las muestras resultaron positivas.

Javanmard y cols. en 2017, realizaron el aislamiento e identificación de AVL en 80 muestras de agua municipal, termal y recreativas de Irán, de las cuales 16 fueron positivas para AVL y de estas diez muestras con AVL potencialmente patógenas. Este estudio confirma una mayor presencia de AVL potencialmente patógenas en sitios con alta actividad humana lo que incrementa el riesgo de infección.

## 2. Estudios sobre amibas de vida libre en México

Rivera y cols. en 1993, estudiaron la presencia de AVL en piscinas 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 en 1997, realizó un estudio sobre amibas de vida libre con potencial patógeno en la Huasteca Potosina en el Estado de San Luis Potosí, en donde encontró seis 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 la materia orgánica.

Urbina en 2006 determinó el efecto de la temperatura en la distribución y diversidad de amibas de vida libre presentes en el balneario de agua termal “El Geiser” en Hidalgo, México. Como resultados se obtuvo que la mayoría de aislados de amibas de vida libre se distribuyó en el rango comprendido entre 33 a 40 °C y determinando que las especies que se distribuyeron por encima de ese rango (*Acanthamoeba* spp. y *Naegleria fowleri*) están reportadas con potencial patógeno

Ramírez y cols. en 2009, determinaron la calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México. En donde aislaron 22 especies pertenecientes a 16 géneros de AVL.



Lares-Jiménez y cols. 2009, realizaron el aislamiento de AVL en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora, en donde identificaron morfofisiológicamente 11 géneros de AVL en aguas superficiales de la región.

Bonilla y cols. en 2009 realizaron el aislamiento de *Acanthamoeba* spp. en el agua doméstica en casas de usuarios de lentes de contacto en el área metropolitana de la Ciudad de México en donde obtuvieron 45 aislados de *Acanthamoeba* spp.

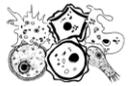
Moreno en 2012 determinó la presencia de amibas de vida libre termotolerantes en biopelículas del balneario de aguas termales “El Geiser” en Hidalgo, México. En este estudio se determinó la presencia de diez géneros de AVL

Gallegos y cols. en el 2014, hicieron una revisión de más de 104 publicaciones de AVL y reportaron que del total de los estados de la República Mexicana, únicamente el 73 % cuenta con registros de especies amibianas y nueve estados permanecen sin estudiar.

Mendoza en 2014, realizó el aislamiento e identificación de *Acanthamoeba* spp. patógena en agua potable de la zona metropolitana del Valle de México. Donde aisló ocho especies del género *Acanthamoeba* reportadas como potencialmente patógenas y demuestra la mala calidad del agua de la zona metropolitana del Valle de México.

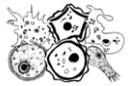
Bonilla y cols. en 2014, determinaron la ocurrencia de amibas de vida libre en arroyos de la cuenca de México en donde obtuvieron 129 aislados de AVL representadas en 18 géneros.

Álvarez en 2015 llevó a cabo la detección de amibas patógenas de vida libre en el balneario natural “Hierve el Agua” en el municipio de San Lorenzo Albarradas, estado de Oaxaca en donde aisló un total de 19 especies pertenecientes a nueve géneros, de los cuales ocho especies son reportadas como potencialmente patógenas para el ser humano. A pesar de las investigaciones realizadas por diversos investigadores, el conocimiento sobre la distribución de estos protistas no es muy clara.



Esquivel en 2017 realizó un “Estudio de Amibas Potencialmente Patógenas en Biotopos de Tres Sistemas de Cenotes en el Estado de Yucatán”, encontrando ocho especies de amibas potencialmente patógenas, entre las especies más abundantes se encontraron *A. polyphga* y *A. culbertsoni*.

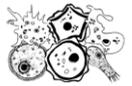
Taméz en 2019 determinó la riqueza específica de amibas de vida libre potencialmente patógenas en Laguna Larga, Michoacán, obteniendo como resultados la presencia de 7 especies de amibas de vida libre potencialmente patógenas identificadas por medio de características morfológicas



#### IV. JUSTIFICACIÓN

Los casos de meningoencefalitis amibiana primaria, encefalitis granulomatosa y queratitis amibiana ocasionados por amibas de vida libre, son frecuentes, además, en México los agentes causales de estas enfermedades son casi desconocidos. Actualmente no existe ninguna información acerca de reportes de estas enfermedades por AVL para el estado de Hidalgo 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 las infecciones provocadas por AVL podrían estar mal diagnosticadas reportando a los pacientes con alguna otra patología.

Las AVLPP presentan resistencia a diversas condiciones ambientales como las presentes en las aguas termales que son utilizados con fines medicinales y recreativos, por lo que el presente estudio pretendió determinar la presencia de amibas con potencial patógeno en cuerpos de agua termales como los del balneario las Grutas de Tolantongo, Hidalgo en donde hasta el momento no se cuenta con registros en el área, siendo así el primer estudio de AVLPP, lo cual permitirá emitir recomendaciones a los usuarios de la presencia y exposición a estas amibas de vida libre y una posible infección por estos protozoos.



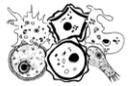
## V. OBJETIVOS

### 1. Objetivo general

- Realizar un registro de amibas de vida libre con potencial patógeno en el balneario las Grutas de Tolantongo, Hidalgo, México.

### 1.1. Objetivos particulares

- Aislar y cultivar AVL de los distintos biotopos muestreados (agua, sedimento y biopelícula)
- Identificar morfológicamente con claves taxonómicas las especies de AVL presentes en las dos temporadas muestreadas (temporada de lluvia y de secas)
- Ubicar taxonómicamente las especies de AVL presentes en las dos temporadas muestreadas (temporada de lluvia y de secas)
- Ubicar los sitios de muestreo con mayor frecuencia de AVL
- Realizar pruebas de termotolerancia
- Realizar pruebas de patogenicidad (osmolaridad)
- Relacionar estadísticamente los factores físicos y químicos del agua (temperatura, conductividad y pH) que puedan influir para su presencia o ausencia en dos temporadas (temporada de lluvias y sequia)
- Emitir recomendaciones preventivas para los usuarios del balneario

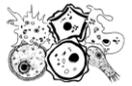


## VI. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio se encuentra al noroeste del estado de Hidalgo, entre los paralelos 20°37' N y 99°07' O, aproximadamente a 120 kilómetros de la capital (Fig. 8), abarca los municipios de Cardonal, Thauhuitepa, Eloxochitlan y parte de Nicolás Flores, y una altitud de 1,282 msnm. Presenta una extensión territorial de 5,200 hectáreas, sin embargo, solo 40 ha están abiertas al público. Este atractivo turístico queda comprendido dentro de la provincia fisiográfica de la Sierra Madre Oriental. Presenta dos tipos de clima predominante; semiárido templado con lluvias en verano y templado subhúmedo, con lluvias en invierno, con una temperatura anual de 16°C y una precipitación pluvial media de 430 milímetros. La vegetación que predomina es bosque de pino-encino y matorral xerófilo. Los tipos de suelo que caracterizan este sitio son castañozems, feozems, litosol, regosol, rendzina y vertisoles ricos en carbonatos y bicarbonatos. Cuenta con 287 cuerpos de agua, los más importantes son el río Pánuco, cuenca río Moctezuma con tres corrientes de agua, río Chicavasco, río Quetzalapa y río Carrizal (Ramírez-Acevedo, 2009; INEGI, 2018) (Fig. 8).



Figura 8. Mapa de ubicación del municipio del Cardonal, Hidalgo en la República Mexicana (INEGI, 2018).

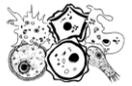


## 1. Descripción general del sitio de muestreo

El balneario las Grutas de Tolantongo (Fig. 9) se encuentra conformado por dos Grutas principales: la primera y más grande de la cual sale el caudal del río de aguas termales ( $> 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) y la segunda denominada como el "túnel" por encima de ella y en la misma pared del cañón. La gruta más grande es clasificada como una cueva cárstica. El río es de agradable temperatura ( $25\text{-}32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), coloreado por las sales minerales que recoge a su paso por la montaña. El agua proviene de una compleja serie de canales dentro de la montaña que calienta el agua a alrededor de los  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Gran parte de esta agua mora en nichos en el lado rocoso de la barranca, que tiene un efecto de enfriamiento estos son conocidos comúnmente como “pozas” (Ramírez-Acevedo, 2009).



Figura 9. Imágenes del balneario las Grutas de Tolantongo en el estado de Hidalgo. Gruta principal (A), río Tolantongo (B), pozas (C) y cascada (D).



## 2. Zonas de muestreo

Debido a la extensión del área de muestreo, se dividió en 14 zonas de muestreo (Fig. 10) que se describen a continuación.



Figura 10. Distribución de las zonas de muestreo en las Grutas de Tolantongo, Hidalgo.

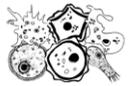
### 2.1. Zona 1 (cascada)

Esta zona es mejor conocida como “La cascada”, la corriente de agua proviene del río Pánuco, debido a esto no es considerada agua termal sin embargo al recoger sales y minerales enriquecen el contenido de sales y minerales del balneario (INEGI, 2018).

La caída de agua desemboca en el río Tolantongo donde se mezclan con las aguas termales del balneario.

### 2.2. Zona 2 (gruta principal)

Comprende la gruta principal, en esta se encuentra el yacimiento de agua termal que alimenta a todo el balneario, su formación se debe a un derrumbe y esta se caracteriza por un sustrato rico en carbonatos y bicarbonatos los cuales se distribuyen a lo largo del balneario. Dentro de la cueva habitan murciélagos que contribuyen indirectamente a la formación de biopelículas en esta zona.



### **2.3. Zona 3 (túnel)**

Es conocida como el túnel, comprende una pequeña gruta que se formó por un derrumbe posterior. Se encuentra situado a unos metros por arriba de la gruta principal y desemboca en el afluente del río Tolantongo. El sustrato predominante es rico en carbonatos y bicarbonatos como en la gruta principal.

### **2.4. Zonas 4, 5 y 6 (río Tolantongo)**

Esta zona se conoce como el río, la corriente de agua se forma por la mezcla del agua termal con el agua proveniente de la cascada. Este sistema sirve para alimentar las piscinas y pozas del balneario. Recorre todo el ejido desembocando en el río Amajac y a un costado del río se encuentra la zona de acampar.

Por la extensión del río, este se dividió en tres zonas de muestreo; el nacimiento del río, en la zona con más afluencia de personas y el final de la zona permitida de acceso turístico.

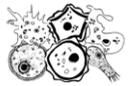
### **2.5. Zona 7 (alberca mayor)**

Esta se encuentra constituida por la piscina de mayor tamaño con un tobogán, es alimentada por las aguas termales nacientes de la zona 2.

Para darle mantenimiento y limpieza a esta zona, el flujo del agua es interrumpido por la tarde-noche y una vez concluido se procede a su llenado.

### **2.6. Zona 8 (alberca secundaria)**

Esta zona es la piscina con más usuarios debido a que cuenta con diferentes profundidades que van desde un chapoteadero hasta la zona de clavados. Igual que la zona 5 el flujo del agua es interrumpido para su mantenimiento.



## **2.7. Zonas 9, 10, 11, 12, 13 y 14 (pozas)**

Están constituidas por pozas artificiales con corriente de agua termal las cuales se encuentran divididas en dos secciones. Están diseñadas para mantener todo el tiempo el flujo de agua constante y se encuentran a diferente altura una de otra.

Del total de pozas fueron seleccionadas 6 diferentes dentro de las dos secciones que se encuentran en el balneario. Estas fueron elegidas por la afluencia de turistas en cada una, a la altura que se encontraban y la distancia entre ellas.



## VII. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. Trabajo en campo

Se realizaron dos muestreos en el periodo de agosto del 2017 (época de lluvias) a enero del 2018 (época de sequía), en las Grutas de Tolantongo, Hidalgo. Las 14 zonas de muestreo se señalaron en el apartado anterior.

#### 1.1. Recolecta y transporte de las muestras de agua, sedimento y biopelícula

La recolecta de muestras de agua se realizó según lo indicado en la NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las piscinas modificado a los cuerpos de agua muestreados”. Recolectando las muestras en envases de plástico de boca ancha con un volumen de 1,000 ml y en tubos de polipropileno de 100 ml, previamente esterilizados. Se tomaron un total de 56 muestras de agua a 10 cm de profundidad con un volumen de 750 ml y dejando el espacio restante para el intercambio gaseoso de los organismos, y 29 muestras de sedimento y de biopelícula muestreada en las partes más concurridas de los 12 cuerpos acuáticos.

Posteriormente el total de muestras fueron transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Investigación en Patógenos Emergentes de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) de la FES-Iztacala UNAM, para su posterior análisis.

#### 1.2. Registro de parámetros fisicoquímicos del agua *in situ*

Se realizó la medición de los siguientes parámetros fisicoquímicos del agua siguiendo la NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las piscinas”, siguiendo el método de medición correspondientes a cada uno de los parámetros fisicoquímicos medidos: temperatura del agua (°C), pH y conductividad (mS/cm). Los parámetros de temperatura, pH y conductividad fueron medidos con un medidor electrónico HANNA modelo HI 98129.



## 2. Trabajo en laboratorio

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

Las muestras de agua se procesaron acorde al método descrito por De Jonckheere (1984) modificado por Gallegos (1997) para aislar AVL, se tomó un volumen de 50 ml de agua y se concentró por centrifugación a 2,500 rpm durante diez minutos. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se sembró sobre placas con medio de agar no nutritivo (NNE) (Anexo 1A), placas de agar no nutritivo (NNE) con solución Prescott-James (Anexo 1B) y placas de seis pozos con solución Prescott-James (Anexo 1C), todas adicionadas con una gota de *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor (65-70 °C durante 30 min.). La capa bacteriana sirve de fuente proteica para que las amibas se desarrollen. Las placas sembradas con medio sólido se incubaron a 37 °C, en posición invertida, dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación. Las placas sembradas con los medios semi-sólido y líquido fueron incubadas a temperatura ambiente para conocer la diversidad de AVL en los distintos puntos muestreados.

Dependiendo del crecimiento amibiano posterior a la incubación entre las 24 y 72 horas siguientes, se realizaron observaciones a las placas con un microscopio invertido (Nikon Eclipse TS100). Detectando el crecimiento de amibas en las placas, se marcó la zona de mayor abundancia y que compartían un morfotipo similar, posteriormente se cortó un trozo de agar (aproximadamente de 5 mm<sup>2</sup>) en condiciones de esterilidad, para resembrar en una placa nueva (incubando a 37 °C).

### 2.2. Identificación morfológica de las amibas aisladas

Una vez detectado el crecimiento amibiano (trofozoíto y quiste) en las placas con los diferentes medios utilizados se prosiguió a su identificación morfológica. En condición estéril, se vertió 1ml de solución Prescott-James sobre la placa y se realizó un barrido con un asa de vidrio, concentrando la suspensión acuosa con amibas, de esta forma se tomó una gota de esta suspensión y se colocó en un portaobjetos para su posterior observación en el microscopio invertido de contraste de fases a 10, 20 y 40X (Nikon Eclipse TS100). Para la identificación morfológica se observaron las características



tanto del trofozoíto como del quiste para compararlas con las características morfológicas que vienen en las claves taxonómicas de Pussard y Pons, 1977; Page, 1988 y Siemensma, 2019. Se procedió a tomar un registro fotográfico con la cámara (Nikon coolpix 990).

### **2.3. Prueba de termotolerancia**

A partir de los cultivos purificados, se depositaron en el centro de la placa de agar NNE y *Enterobacter aerogenes* previamente inactivada por calor,  $1 \times 10^3$  células de la amiba a ensayar. Posteriormente, dichas placas fueron incubadas a 30, 37, y 42 °C, observando el crecimiento del inóculo de trofozoítos y quistes, a las 24, 48 y 72 horas siguientes (Siddiqui y Khan *et al.*, 2012).

Las observaciones fueron cualitativas, controlando el aumento del diámetro del halo del inóculo y cuantificando aproximadamente el crecimiento tanto de trofozoítos como de quistes registrándolo como: (+/-), interpretando el crecimiento positivo como (+) y el nulo como (-). Una vez comprobado lo sucedido tanto con los trofozoítos como con los quistes a 42 °C, se volvió a cultivar a 30 °C, como temperatura más favorable, para comprobar si los quistes eran viables o no. Si eran capaces de desenquistarse y se observaban trofozoítos, indicaba que el quiste realmente permanece viable. Por el contrario, si transcurridos 15 días no se obtenía presencia de trofozoítos y por lo tanto crecimiento, se consideró que los quistes eran inviables y que por lo tanto no habían conseguido resistir temperaturas elevadas (Fernández, 2015).

### **2.4. Prueba de patogenicidad**

Para el estudio de patogenicidad de AVL *in vivo*, se seleccionaron aquellas cepas que demostraron mayor capacidad de adaptación al aumento de la temperatura en las pruebas de termotolerancia. De esta forma se quería demostrar la capacidad patógena de las AVL que se encuentran en el agua de los diferentes puntos muestreados



#### 2.4.1. Pruebas de osmotolerancia

Para comprobar la osmotolerancia de las cepas de AVLPP se prepararon placas en medio NNE con D-manitol, en concentraciones de 0.5 y 1M con una suspensión de *E. aerogenes* inactivadas por calor (Siddiqui y Khan *et al.*, 2012).

A partir de cultivos en placa de las amibas, se procedió a su lavado por arrastre con solución Prescott-James (1 ml) y asa estéril, recogiendo el lavado en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugando por 10 min. a 2,500 rpm (centrífuga Boeco U-32). Una vez descartado el sobrenadante, se realizó un recuento celular para determinar el número de células de cada muestra, utilizando para ello una cámara de Neubauer, en la que se introdujeron 10 µl de la suspensión de cada cepa de *Acanthamoeba* y un cuenta células.

El cálculo se realizó de la siguiente forma:  $V1 = (C2) (V2) / (C1)$

Donde V1 corresponde a los µl que hay que depositar de cada cepa en la placa para obtener un inóculo de  $1 \times 10^3$  células. Dicha cantidad se inoculó en el centro de cada placa, marcando el halo inicial, y se incubó a 30 °C observándose cada 24, 48 y 72 h. Posteriormente, se midió el diámetro de crecimiento en los tiempos indicados, utilizando un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse TS100) y considerándose crecimiento positivo si el diámetro era superior al marcado inicialmente a tiempo cero, normalmente de unos 5 mm (Fernández, 2015).

#### 2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el software Past versión 3.23 (2015). Se realizó un análisis de clúster por medio del índice de Jaccard. El propósito de los análisis de clúster es determinar la similitud de especies encontradas en las dos épocas muestreadas en las diferentes estaciones de muestreo.

Posteriormente se realizó un escalamiento multidimensional no métrico por medio del índice de Jaccard, para observar la relación de los factores fisicoquímicas de los sitios con la presencia/ausencia de AVL (Hammer *et al.*, 2001).



## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

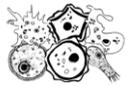
De las 84 muestras recolectadas en el balneario se identificaron 15 especies pertenecientes a seis géneros. Durante la temporada de sequía se identificaron un total de 12 especies pertenecientes a seis géneros, los cuales son:

- *Acanthamoeba* con cinco especies: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* y *A. triangularis*
- *Naegleria* con dos especies: *N. gruberi* y *Naegleria* sp.
- *Vannella* con dos especies: *V. mira* y *V. platypodia*
- *Korotnevella* con una especie: *K. stella*
- *Rosculus* con una especie: *R. ithacus*
- *Saccamoeba* con una especie: *S. limax*

En la temporada de lluvia se identificaron un total de 13 especies pertenecientes a cuatro géneros:

- *Acanthamoeba* con siete especies: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. griffini*, *A. rhyodes* y *A. triangularis*
- *Naegleria* con dos especies: *N. gruberi* y *Naegleria* sp.
- *Vannella* con tres especies: *V. mira*, *V. platypodia* y *V. simplex*
- *Rosculus* con una especie: *R. ithacus*

De las 15 especies identificadas durante los dos muestreos solamente siete especies han sido reportadas con potencial patógeno: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. griffini*, *A. rhyodes*, *A. triangularis*. En este estudio se identificó morfológicamente una especie de *Naegleria* que posiblemente pueda ser *N. fowleri*, esta última no fue tomada en cuenta con potencial patógeno debido a que solo se realizó la caracterización morfológica y para aseverar su presencia es necesario de pruebas de flagelación y moleculares (Romero, 2014). Cabe señalar que en el balneario se cuenta con horarios y protocolos establecidos para la realización del mantenimiento y limpieza de las piscinas, sin embargo, no se cumple con lo establecido con la NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del



agua que deben cumplir las piscinas”, en la cual se estipula la ausencia total de AVL, sin embargo, en esta misma norma indica que quedan exentas de desinfección las piscinas construidas por encauce de una corriente superficial, debido a que es casi imposible realizar una cloración ya que puede afectar a las poblaciones de los diversos organismos presentes en el sitio, los cuales favorecen un correcto funcionamiento del ecosistema. Por otro lado, no existe una norma que limite la presencia de AVLPP en cuerpos de agua naturales como la cascada, las Grutas y el río, así como cuerpos de agua artificiales como las pozas presentes en las Grutas de Tolantongo, que son un riesgo para la salud de los usuarios. Esto puede deberse a la dificultad de desinfección de este tipo de cuerpos de agua con una pendiente prolongada que desencadena en el flujo de agua constante provocado por la corriente que se genera.

En cuanto a la frecuencia de AVL encontrada durante las dos épocas muestreadas (Fig. 11) se puede observar que las especies predominantes en el estudio fueron las reportadas con potencial patógeno, esto puede ser debido a que estas amibas han sido reportadas como organismos eurioicos por lo cual puede resistir a variaciones ambientales más amplias (Férrandez, 2015), además de que tanto *Acanthamoeba* como *Naegleria* tienen una fase quística en la 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 (Warhust, 1985). Por otro lado, las especies que no están reportadas con potencial patógeno solo se encontraron en los medios cultivados a temperatura ambiente debido a que la temperatura soportada por estas es menor por lo cual son considerados organismos estenotermos (Robinson *et al.*, 1992).

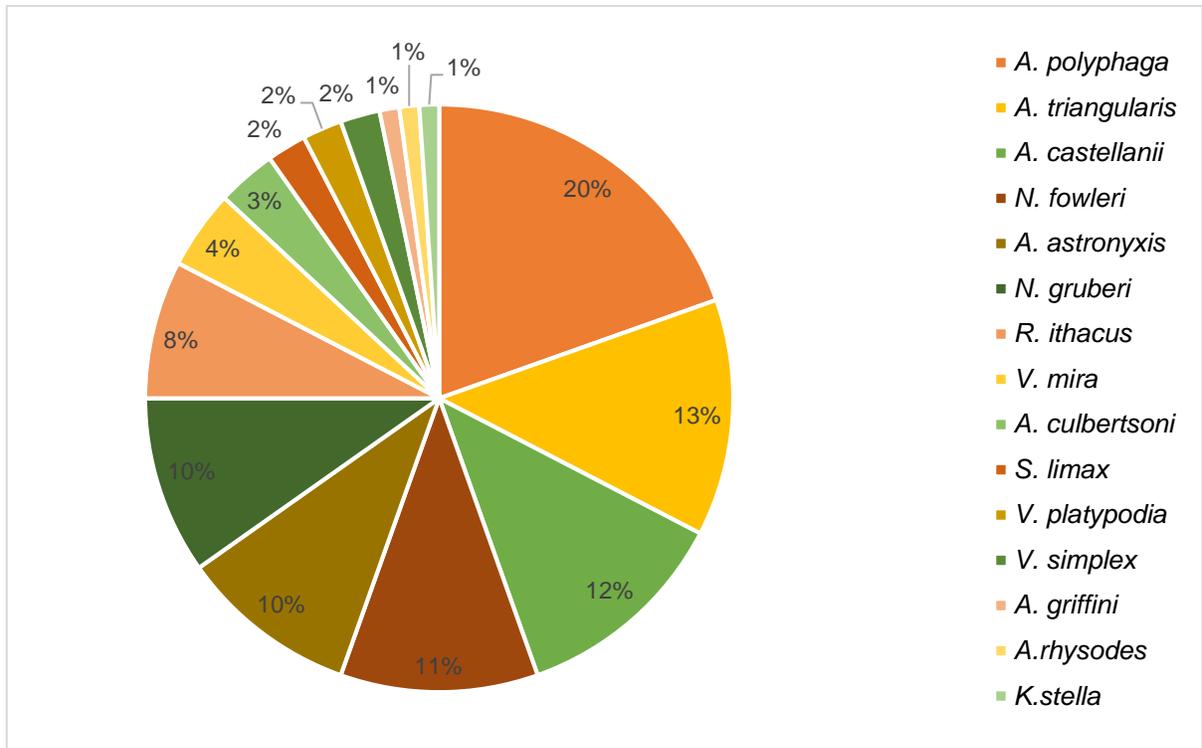
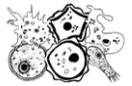
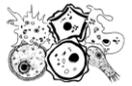


Figura 11. Total de especies de amibas de vida libre encontradas durante las dos épocas del año.

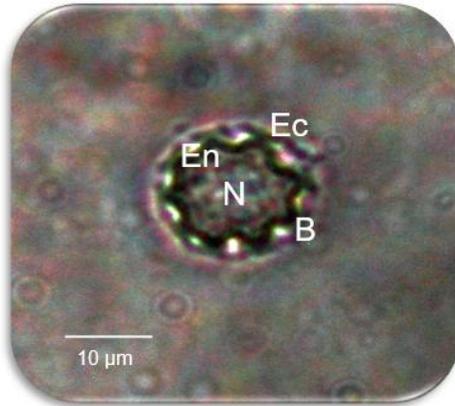
### 1. Descripción y registro fotográfico de las especies aisladas de amibas de vida libre

En cada una de las especies de AVL aisladas se incluye una fotografía de quiste y/o trofozoíto, una breve descripción basada en la morfología del quiste y/o trofozoíto acorde a las claves taxonómicas utilizadas para su identificación (Pussard y Pons, 1977; Page, 1988; Siemensma, 2019), así como la clasificación taxonómica de cada una (Adl *et al.*, 2012).



*Acanthamoeba astronyxis*

(Ray y Hayes, 1954) Pussard y Pons, 1977



**Descripción:**

Endociste rugoso, todos o la mayoría de los brazos están en contacto con el ectociste en el mismo plano. Tiene entre 7 y 9 brazos, en ocasiones puede tener mas.

**Diámetro del quiste:** 19.22- 22 μm

**Clasificación taxonómica**

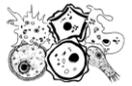
Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● **Longamoebia** Cavalier-Smith y Smirnov en Smirnov *et al.*, 2011

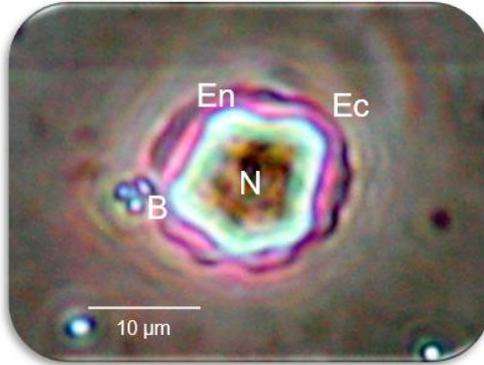
●●● **Centramoebida** Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

Figura 12. *Acanthamoeba astronyxis*. Fotografía de la fase quística, se puede observar el endociste (En), ectociste (Ec), núcleo (N) y brazo (B). Reportada como AVLPP. Puede producir EAG (Khan, 2006). Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012



*Acanthamoeba castellanii*

(Douglas, 1930) Volkonski, 1931



**Descripción:**

Ectoquiste reticulado, grueso y muy rugoso. endoquiste mas o menos esférico conectado al ectoquiste por pequeños brazos cónicos

**Diámetro del quiste:** 14 -16  $\mu\text{m}$

**Clasificación taxonómica**

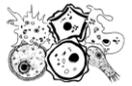
Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● **Longamoebia** Cavalier-Smith y Smirnov, 2011

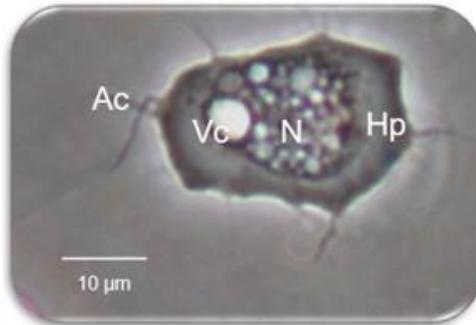
●●● **Centramoebida** Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

Figura 13. *Acanthamoeba castellanii*. Fotografía de la fase quística, se puede observar el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), núcleo (N) y brazo (B). Reportada como AVLPP. Puede producir EAG y/o queratitis amibiana (Siddiqui y Khan, 2012). Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012



*Acanthamoeba culbertsoni*

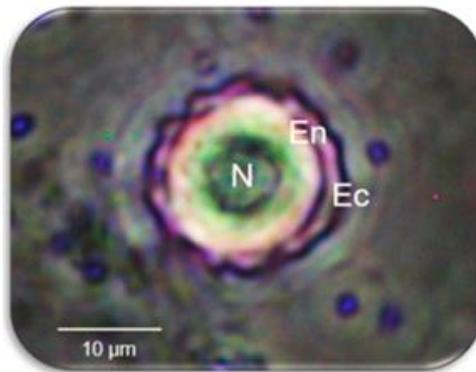
(Singh y Das, 1970) Griffin, 1972



**Descripción:**

Pseudópodos delgados y afilados (acanthopodos). Citoplasma con pequeños glóbulos lipídicos y una vacuola contráctil. Núcleo esférico central. Con hialoplasma

**Longitud del trofozoíto:** 12 - 40 μm



**Descripción:**

Endoquiste usualmente regular y redondeado, ocasionalmente ligeramente poligonal, ectoquiste delgado ondulado

**Diámetro del quiste:** 15- 28 μm

**Clasificación taxonómica**

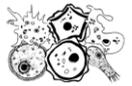
Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● **Longamoebia** Cavalier-Smith y Smirnov, 2011

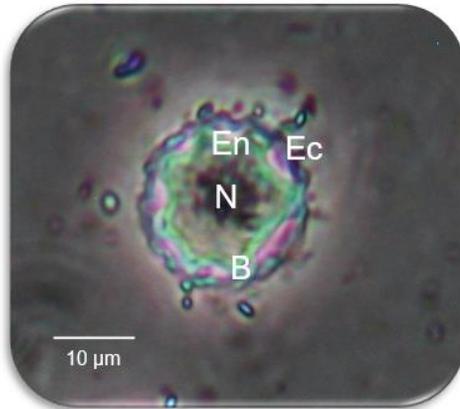
●●● **Centramoebida** Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

Figura 14. *Acanthamoeba culbertsoni*. Fotografía del trofozoíto, se puede observar el acantopodo (Ac), vacuola contráctil (Vc), núcleo (N), hialoplasma (Hp). Fotografía de la fase quística, se puede observar el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), núcleo (N) y brazo (B). Reportada como AVLPP. Puede producir EAG y/o queratitis amibiana (Siddiqui y Khan, 2012). Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012



*Acanthamoeba griffini*

(Sawyer, 1971)



**Descripción:**

Endociste rugoso, todos o la mayoría de los brazos están en contacto con el ectociste en el mismo plano. Tiene entre 7 y 9 brazos, en ocasiones puede tener mas.

**Diámetro del quiste:** 19.22- 22 μm

**Clasificación taxonómica**

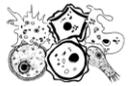
Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● **Longamoebia** Cavalier-Smith y Smirnov, 2011

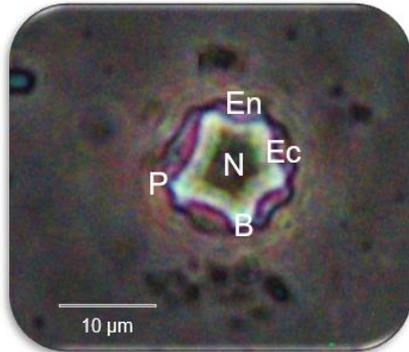
●●● **Centramoebida** Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

Figura 15. *Acanthamoeba griffini*. Fotografía de la fase quística, se puede observar el endociste (En), ectociste (Ec), núcleo (N) y brazo (B). Reportada como AVLPP. Puede producir EAG y/o queratitis amibiana (Siddiqui y Khan, 2012). Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012



*Acanthamoeba polyphaga*

(Pushkarew, 1913) Volkonski, 1931



**Descripción:**

Endociste irregular, prácticamente nunca estrellado, ectociste delgado y separado del endociste, de forma esférica y en ocasiones ovoide. Numero de brazos de 4 a 6.

**Diámetro del quiste:** aprox. 14 μm

**Clasificación taxonómica**

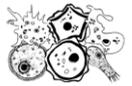
Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● **Longamoebia** Cavalier-Smith y Smirnov, 2011

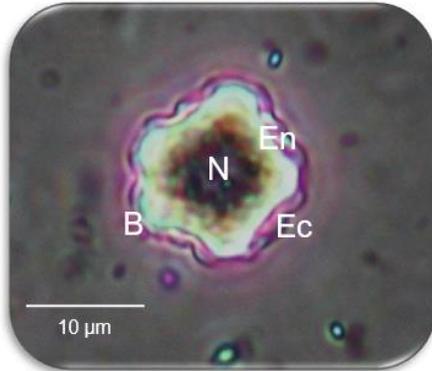
●●● **Centramoebida** Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

Figura 16. *Acanthamoeba polyphaga*. Fotografía de la fase quística, se puede observar el endociste (En), ectociste (Ec), núcleo (N) poro de excistacion (P) y brazo (B). Reportada como AVLPP. Puede producir EAG y/o queratitis amibiana (Siddiqui y Khan, 2012). Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012



*Acanthamoeba rhyssodes*

(Singh, 1952) Griffin, 1972



**Descripción:**

Algunos quistes pseudoreticulados, endoquistes a menudo con brazo cónicos o tubulares, una minoría estrellados o con forma de engranaje con un número promedio de entre 5 - 7 brazos

**Diámetro del quiste:** 16 - 18 μm

**Clasificación taxonómica**

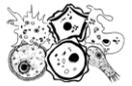
Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● **Longamoebia** Cavalier-Smith y Smirnov, 2011

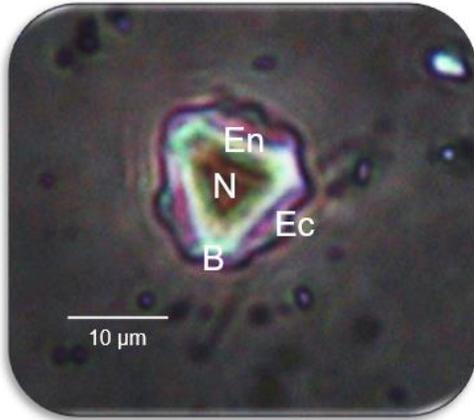
●●● **Centramoebida** Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

Figura 17. *Acanthamoeba rhyssodes*. Fotografía de la fase quística, se puede observar el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), núcleo (N) y brazo (B). Reportada como AVLPP. Puede producir EAG y/o queratitis amibiana (Siddiqui y Khan, 2012). Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012



*Acanthamoeba triangularis*

(Pussard y Ponds, 1977)



**Descripción:**

Ectoquiste esférico u ovoide, endoquiste triangular muy raramente cuadrado, generalmente posee tres brazos.

**Diámetro del quiste:** aprox. 13 μm

**Clasificación taxonómica**

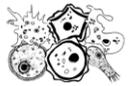
Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004

●● **Longamoebia** Cavalier-Smith y Smirnov, 2011

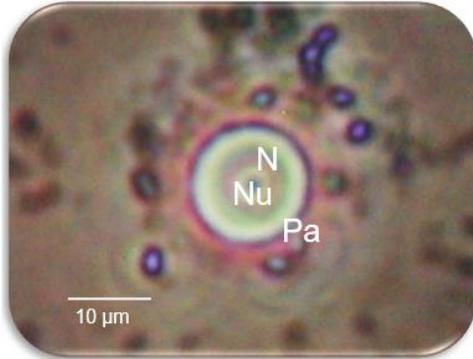
●●● **Centramoebida** Rogerson y Patterson, 2002, emend. Cavalier-Smith, 2004

Figura 18. *Acanthamoeba triangularis*. Fotografía de la fase quística, se puede observar el endoquiste (En), ectoquiste (Ec), núcleo (N) y brazo (B). Reportada como AVLPP. Puede producir EAG y/o queratitis amibiana (Siddiqui y Khan, 2012). Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012



*Naegleria* sp.

(Carter, 1970)



**Descripción:**

Quiste totalmente liso, forma circular, núcleo y nucleolo centrados como “tiro al blanco”, poros en el borde del quiste no notables o ligeramente engrosadas. Crece a una temperatura de 30- 45 °C

**Diámetro del quiste:** 7 – 15 μm

**Clasificación taxonómica**

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

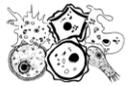
● **Discoba** Simpson en Hampl *et al.*, 2009

●● **Discicristata** Cavalier-Smith, 1998

●●● **Heterolobosea** Page y Blanton, 1985

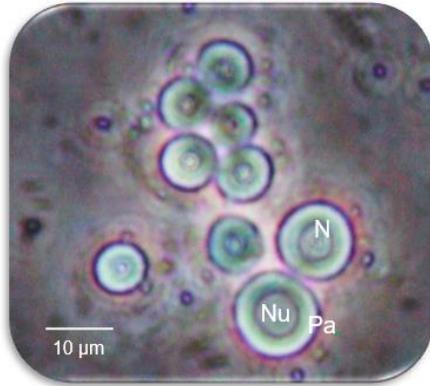
●●●● **Tetramitia** Cavalier-Smith, 1993, emend. Cavalier-Smith en Cavalier- Smith y Nikolaev, 2008

Figura 19. *Naegleria* sp. Fotografía de la fase quística, se puede observar la pared del ectoquiste (Pa), nucleolo (Nu) y el núcleo (N). Reportada como AVLPP. Puede producir MEAP (Dirección General de Epidemiología, 2012). Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012



*Naegleria gruberi*

(Schardinger, 1899)



**Descripción:**

Quiste liso, rugoso o angular. Poro del quiste notablemente engrosado. Posee mucílago. Crece a una temperatura de entre 20 y 30 °C

**Diámetro del quiste:** 10 - 16 μm

**Clasificación taxonómica**

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

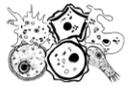
● **Discoba** Simpson en Hampl *et al.*, 2009

●● **Discicristata** Cavalier-Smith, 1998

●●● **Heterolobosea** Page y Blanton, 1985

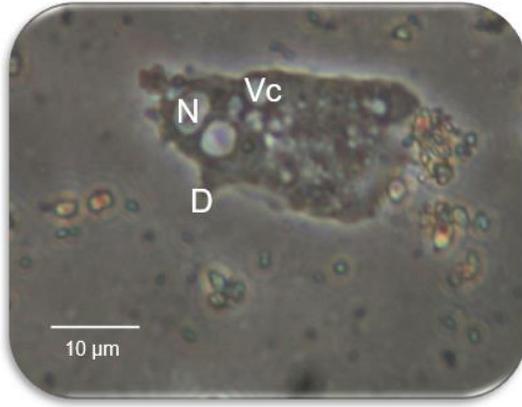
●●●● **Tetramitia** Cavalier-Smith, 1993, emend. Cavalier-Smith en Cavalier-Smith y Nikolaev, 2008

Figura 20. *Naegleria gruberi*. Fotografía de la fase quística, se puede observar la pared del ectoquiste (Pa), nucléolo (Nu) y el núcleo (N). No reportada como patógena en humanos. Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012



*Korotnevella stella*

(Schaeffer, 1926) Goodkov, 1988



**Descripción:**

Forma de locomoción variable, con numerosos dactilopodios, uroide no diferenciado. Núcleo esférico casi circular y con vacuola contráctil.

**Longitud del trofozoíto:** 31- 60  $\mu\text{m}$

**Clasificación taxonómica**

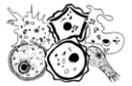
Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith, *et al.*, 2004, *sensu* Smirnov *et al.*, 2011

●● **Flabellinia** Smirnov *et al.*, 2005

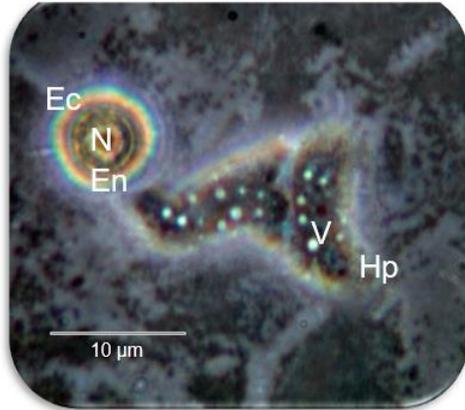
●●● **Dactylopodida** Smirnov *et al.*, 2005

Figura 21. *Korotnevella stella*. Fotografía del trofozoito, se puede observar la vacuola contráctil (Vc), el dactilopodio (D) y el núcleo (N). No reportada como patógena en humanos. Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012.



*Rosculus ithacus*

(Hawes, 1963)



**Descripción:**

Quiste liso, oval o esférico  
Pequeña amiba con un cambio rápido de forma locomotiva, algunas veces espatulada, otras flabelada, hialoplasma con borde un poco irregular

**Longitud del trofozoíto:** 5-17 μm

**Clasificación taxonómica**

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

● **Heterolobosea** Page and Blanton, 1985

●● ***Incertae sedis***

Figura 22. *Rosculus ithacus*. Fotografía del trofozoíto y del quiste, se puede observar la vacuola contráctil (V), hialoplasma (Hp), ectoquiste (Ec), núcleo (N) y endoquiste (En). No reportada como patógena en humanos.

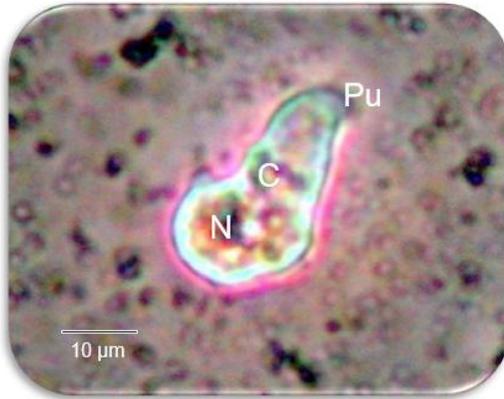
Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X.

Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012.



*Saccamoeba limax*

(Frenzel, 1982; emend. Bovee, 1972)



**Descripción:**

Trofozoíto alargado y esbelto. Perilla uroidal siempre presente, bulbo veloso común. Cristales bipiramidales, rara vez mas de 30.

**Longitud del trofozoíto:** 35 – 85  $\mu\text{m}$

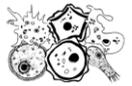
**Clasificación taxonómica**

Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith 1998

● **Tubulinea** Smirnov *et al.*, 2005

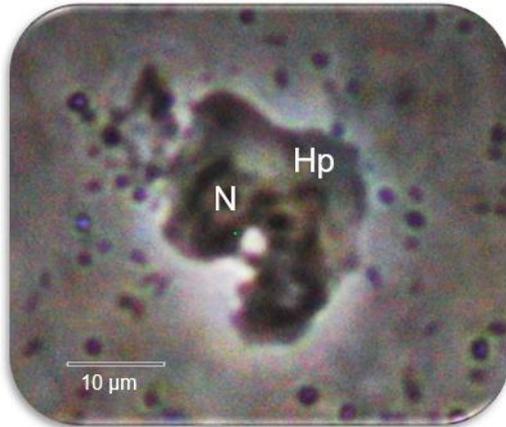
●● **Euamoebida** Lepsi, 1960, sensu Smirnov *et al.*, 2011

Figura 23. *Saccamoeba limax*. Fotografía del trofozoíto, se puede observar la perilla uroidal (Pu), cristales bipiramidales (C) y núcleo (N). No reportada como patógena en humanos. Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012.



*Vannella mira*

(Schaeffer, 1926) emend. Smirnov, 2002



**Descripción:**

Trofozoíto en forma de abanico, semicircular o rara vez espatulada, pliegues o lóbulos prominentes en el hialoplasma, núcleo único.

**Longitud del trofozoíto:** 15–35  $\mu\text{m}$

**Clasificación taxonómica**

Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004, sensu Smirnov *et al.*, 2011

●● **Flabellinia** Smirnov *et al.*, 2005

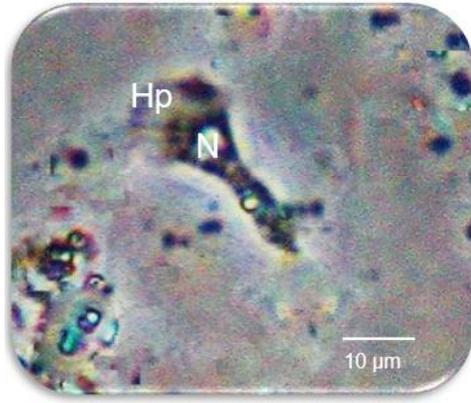
●●● **Vannellida** Smirnov *et al.*, 2005

Figura 24. *Vannella mira*. Fotografía del trofozoíto, se puede observar el hialoplasma (Hp) y núcleo (N). No reportada como patógena en humanos. Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012.



*Vannella platypodia*

Gläser, 1912



**Descripción:**

Trofozoíto más largo que ancho, en forma de espátula, hialoplasma generalmente en mayor proporción.

**Diámetro del trofozoíto:** 10–30 μm

**Clasificación taxonómica**

Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004, sensu Smirnov *et al.*, 2011

●● **Flabellinia** Smirnov *et al.*, 2005

●●● **Vannellida** Smirnov *et al.*, 2005

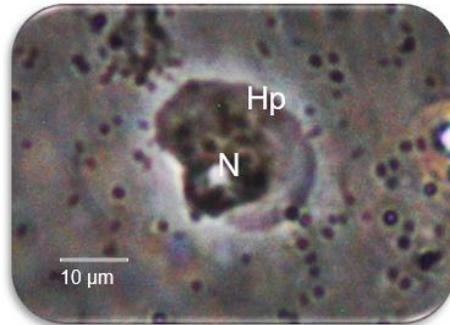
Figura 25. *Vannella platypodia*. Fotografía del trofozoíto, se puede observar el hialoplasma (Hp) y núcleo (N). No reportada como patógena en humanos.

Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X. Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012.



## *Vannella simplex*

Wohlfarth-Bottermann, 1960



### **Descripción:**

Forma de locomoción semicircular o en forma de abanico, a menudo con un tallo. El hialoplasma ocupa aproximadamente la mitad de la célula.

**Diámetro del trofozoíto:** 25–80  $\mu\text{m}$

### **Clasificación taxonómica**

Supergrupo: **Amoebozoa** Lühe, 1913, emend. Cavalier-Smith, 1998

● **Discosea** Cavalier-Smith *et al.*, 2004, sensu Smirnov *et al.*, 2011

●● **Flabellinia** Smirnov *et al.*, 2005

●●● **Vannellida** Smirnov *et al.*, 2005

Figura 26. *Vannella simplex*. Fotografía del trofozoíto, se puede observar el hialoplasma (Hp) y núcleo (N). No reportada como patógena en humanos.

Fotografía tomada con microscopio de contraste de fases 40X.

Clasificación taxonómica según Adl *et al.*, 2012.



## 2. Comparación de la diversidad de amibas de vida libre por temporadas

La mayor riqueza específica correspondió al primer muestreo realizado en la época de lluvias (Fig. 27), esto puede ser debido a que la lluvia afecta en gran medida a los organismos acuáticos en cuanto al cambio del flujo de agua presente en las diferentes épocas del año. Durante la época de lluvia los niveles de agua aumentan y por consiguiente la corriente de agua es más fuerte, misma que arrastra una gran cantidad de organismos vivos por lo cual la diversidad y abundancia de estos incrementa. Al cesar las lluvias, el nivel del agua se estabiliza, por lo cual el agua tiende a tener un flujo más constante y bajo, lo cual desencadena en una menor distribución de los organismos acuáticos (Sígala, 2008) Sin embargo, en el anexo 2 se puede observar que no se encontraron diferencias estadísticas en la riqueza de especies entre las dos épocas muestreadas, esto se puede deber a que la diferencia en el número de especies reportadas es muy poca para considerar que la riqueza de especies de una época a otra se modifica.

Se aislaron los géneros *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Vannella* y *Rosculus* en ambas temporadas de muestreo, lo anterior no concuerda con lo reportado por Támez en 2019 que indica que los géneros aislados con mayor frecuencia en cuerpos de agua naturales son: *Naegleria*, *Paratetramitus*, *Vahlkampfia* y *Vermamoeba*, sin embargo, la prevalencia de tres de los cuatro géneros aislados en ambas temporadas muestreadas (*Naegleria*, *Vannella* y *Rosculus*) puede reflejar la capacidad de habitar la columna de agua cuando el trofozoíto cambia a ameboflagelado o forma flotante (Bonilla, 2014). Fernández en 2015 reportó que *Vannella* es un género común en las corrientes de ríos y sugirió que la forma plana de este género es una adaptación para resistir la alta velocidad de la corriente. En cuanto a la presencia del género *Acanthamoeba* se ha informado que es el género de AVL más común en el medio ambiente (Page, 1988) y se asocia a menudo con agua termal y rica en bacterias, esto puede ser una explicación de su prevalencia (Bonilla *et al.*, 2009).

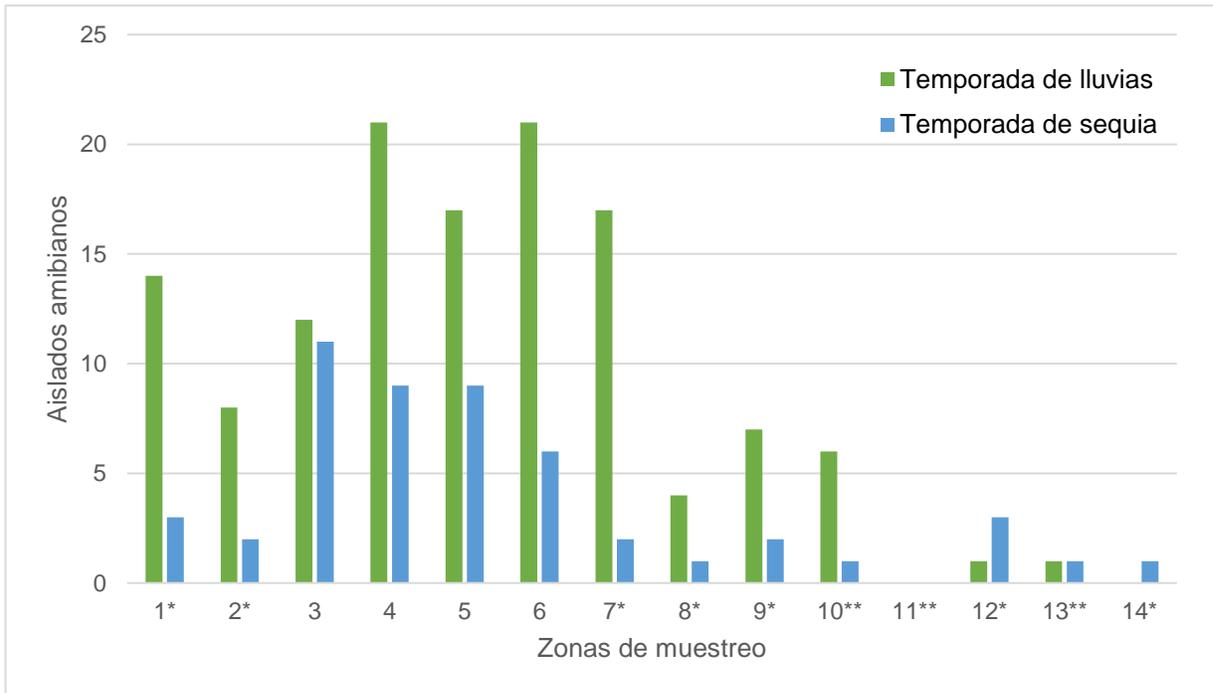
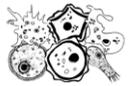


Figura 27. Comparación de la riqueza específica de AVL por temporada del año en el balneario.

### 3. Frecuencia de amibas de vida libre en los diferentes biotopos muestreados

En cuanto a la presencia de AVL en los biotopos muestreados, en la figura 28 se observa que el agua fue el biotopo con una mayor frecuencia de AVL, ya que este es considerado como el sustrato “universal” para su desarrollo (Sígala, 2008). Taméz en 2019 indica que los procesos de resuspensión permiten que las amibas se desplacen dentro de la columna de agua permitiéndoles así llegar a la interfase agua-aire donde disponen de mejores condiciones para su desarrollo y proliferación. Dichos procesos pueden ser provocados por la actividad de los bañistas en la zona, además, de que la corriente de agua sirve como un distribuidor de nutrientes a lo largo del balneario. Por otro lado, no en todas las zonas muestreadas se encontraron los tres biotopos, la ausencia de biopelícula es debida al flujo constante de agua, el cual no permite la disponibilidad de un sustrato favorable para el desarrollo de biopelículas.



En cuanto al sedimento, no se encontró en los cuerpos de agua artificiales como las piscinas y las pozas; en el túnel el sedimento encontrado era compacto, por lo cual no pudo colectarse.

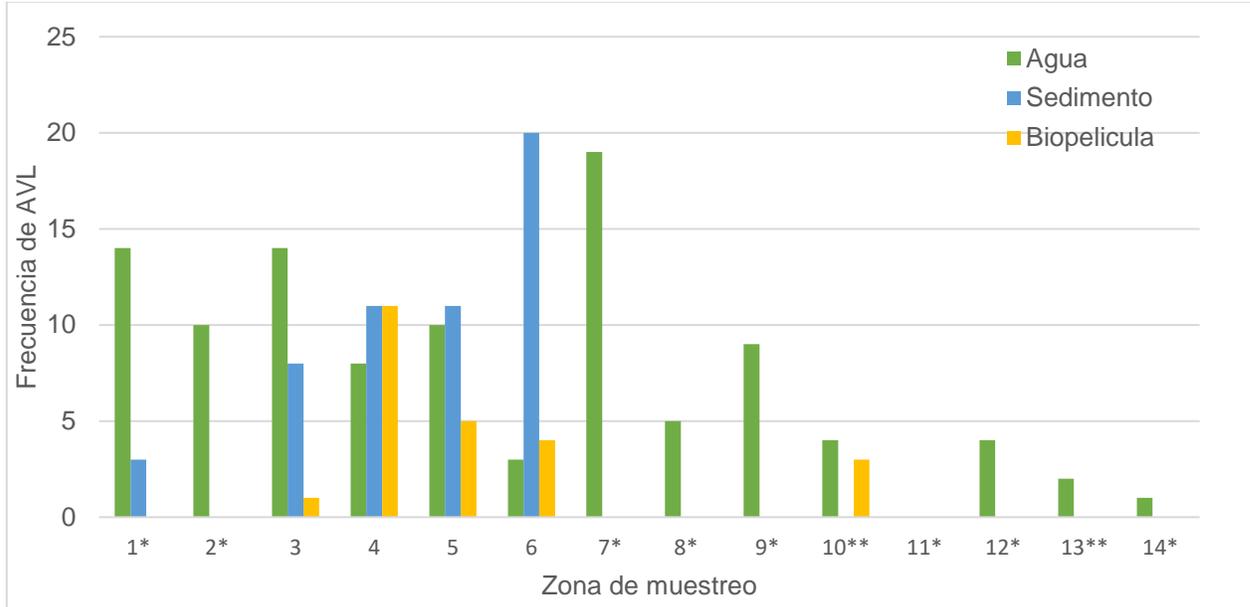
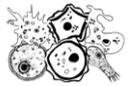


Figura 28. Comparación de la presencia de AVL por biotopo. Se realizó muestreo de agua (\*). Se realizó muestreo de agua y biopelícula (\*\*).

#### 4. Pruebas de termotolerancia

En los cuadros 1 y 2 se observa que los 24 aislados amibianos utilizados para la prueba resultaron positivos a las tres diferentes temperaturas sometidas, debido a que se encuentran dentro del rango soportado por *Acanthamoeba* sp. con potencial patógeno, el cual se encuentra reportado entre los 4 y 42 °C para *Acanthamoeba* spp. de los grupos II y III (Robinson *et al.*, 1992). Estos resultados coinciden con los reportados por Gianinazzi y cols. en 2009, cuyas cepas demostraron un alta termotolerancia, creciendo a temperaturas entre los 30 y los 42 °C o el de Lorenzo-Morales y cols. en 2005, señala que el 100 % de las cepas de *Acanthamoeba* crecieron entre los 42 y 45 °C, sin embargo, difieren de los resultados presentados por Fernández en 2015, en donde el crecimiento fue nulo a 42 °C en el 100% de las cepas de *Acanthamoeba* sp, sin embargo el crecimiento a 37 °C fue positivo en el total de las muestras, comprobando así su capacidad termofílica, por lo que posiblemente sean capaces de infectar humanos y otros mamíferos, pero a pesar de que la termotolerancia resulta una

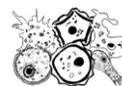


condición necesaria, no es suficiente para determinar su capacidad patógena. (Mendoza, 2014).

Cuadro 1. Especies de AVLPP obtenidas durante la temporada de lluvias sometidas a pruebas de termotolerancia.

Temporada de lluvias	Control			37 °C			42 °C		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Aislado									
<i>A. astronyxis</i> Zona 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. astronyxis</i> Zona 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. astronyxis</i> Zona 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. astronyxis</i> Zona 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. triangularis</i> Zona 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. astronyxis</i> Zona 11	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 13	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Crecimiento de AVL positiva (+)



Cuadro 2. Especies de AVLPP obtenidas durante la temporada de sequía sometidas a pruebas de termotolerancia.

Temporada de sequía	Control			37 °C			42 °C		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Aislado									
<i>A. polyphaga</i> Zona 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Zona 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. triangularis</i> Zona 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Zona 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Zona 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. rhyodes</i> Zona 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Zona 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Zona 8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 13	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Zona 13	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Crecimiento de AVL positiva (+)



## 5. Pruebas de patogenicidad

Para las pruebas de patogenicidad fueron seleccionados 24 aislados amibianos de *Acanthamoeba* de los dos muestreos realizados, tomando en cuenta la tolerancia a la temperatura de los cultivos aislados y purificados, debido a que Gianinazzi y cols., 2009, afirmaron que si un cultivo de AVL no crece a 37°C no puede tener potencial patógeno, Utilizando el crecimiento de AVL en D-manitol como indicador de potencial patógeno de las cepas aisladas.

### 5.1. Pruebas de osmolaridad

En el cuadro 3 se observa que el crecimiento positivo en manitol 0.5 M fue en nueve de los 12 aislados amibianos, teniendo un crecimiento moderado pero mayor al tamaño del inóculo inicial, sin embargo, en cuanto al crecimiento en manitol 1M fue nulo en todos los aislados amibianos.

Cuadro 3. Especies de AVLPP obtenidas durante la temporada de lluvias sometidas a prueba de osmolaridad.

Temporada de lluvias Aislado	Control			Manitol 0.5 M			Manitol 1 M		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>A. astronyxis</i> Zona 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Zona 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Zona 1	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. astronyxis</i> Zona 2	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Zona 3	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. astronyxis</i> Zona 3	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Zona 4	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. astronyxis</i> Zona 4	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. triangularis</i> Zona 5	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Zona 6	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>A. astronyxis</i> Zona 11	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Zona 13	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Crecimiento de AVL positiva (+) y negativa (-)



En el cuadro 4 se observa que diez de los 12 aislados amibianos resultaron positivos para el crecimiento en manitol 0.5 M, teniendo un crecimiento constante y en algunos casos abundante, en cuanto al crecimiento en manitol 1M se reporta que tres especies resultaron con un crecimiento moderado, rebasando mínimamente el tamaño del inóculo y tomándose como positivos, sin embargo se notó que el poco crecimiento del inóculo se pudo deber a que la proliferación de los trofozoítos fue moderada y se encontraban en mayor medida en su forma quística lo cual indica que las condiciones no son propicias para su proliferación.

Cuadro 4. Especies de AVLPP obtenidas durante la temporada de sequía sometidas a pruebas de osmolaridad.

Temporada de sequia Aislado	Control			0.5 M manitol			1 M manitol		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>A. polyphaga</i> Zona 1	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>A. castellanii</i> Zona 3	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. triangularis</i> Zona 3	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Zona 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Zona 4	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. castellanii</i> Zona 5	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. rhyodes</i> Zona 7	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. castellanii</i> Zona 7	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Zona 7	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. castellanii</i> Zona 8	+	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>A. polyphaga</i> Zona 13	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. castellanii</i> zona 13	+	+	+	-	-	+	-	-	-

Crecimiento de AVL positiva (+) y negativa (-)



La osmotolerancia fue utilizada en este estudio como prueba de patogenicidad debido a que indica la capacidad de las cepas a la adaptación (Khan y Tereen, 2003) a las condiciones de osmolaridad presentes en tejidos del hospedero. Por ejemplo, en algunas cepas de *Acanthamoeba* que tiene relación con la capacidad patógena multifactorial que favorece la citotoxicidad en células de tejido humano, principalmente en el sistema nervioso central (Fernández, 2015), aunque existen otros factores como la capacidad de las amibas de producir proteasas, que favorecen la adhesión a las células del epitelio corneal y algunos estudios relacionan estos condicionantes fisiológicos con la virulencia de las cepas ambientales y clínicas (Gianinazzi *et al.*, 2010).

La realización de estas pruebas funciona como indicadores del potencial patógeno de las cepas aisladas, a pesar de ello, no resultan concluyentes para demostrar la patogenicidad, para esto se necesita una ampliación del estudio por medio pruebas en modelos *in vivo* asegurando así la patogenicidad

## **6. Parámetros fisicoquímicos del agua**

En cada cuerpo de agua muestreado se hizo un registro de los valores de los parámetros fisicoquímicos del agua y se observó una gran similitud entre estos. Estos parámetros se registraron con el fin de conocer las condiciones ambientales presentes en el balneario, aunque pudieron ser compararlos entre temporadas, para así observar si influían en el crecimiento amibiano.



## 6.1. Temperatura

La temperatura del agua en la temporada de lluvias osciló entre 27 y 34°C y en temporada de sequía entre los 22 y los 35 °C (Fig. 29), si bien, se demuestran las altas temperaturas presentes en el balneario, estas parecen estar dentro de las temperaturas ideales para el desarrollo de las AVL como lo menciona Marciano Cabral en 2000 donde afirma que el rango soportado por las AVL en general va de los 20 a los 35 °C, siendo 30 °C la temperatura ideal para su crecimiento, por otro lado, Gianinazzi y cols. en 2009, mencionan que el crecimiento de las AVLPP se puede dar en intervalos de entre 13 y 45 °C.

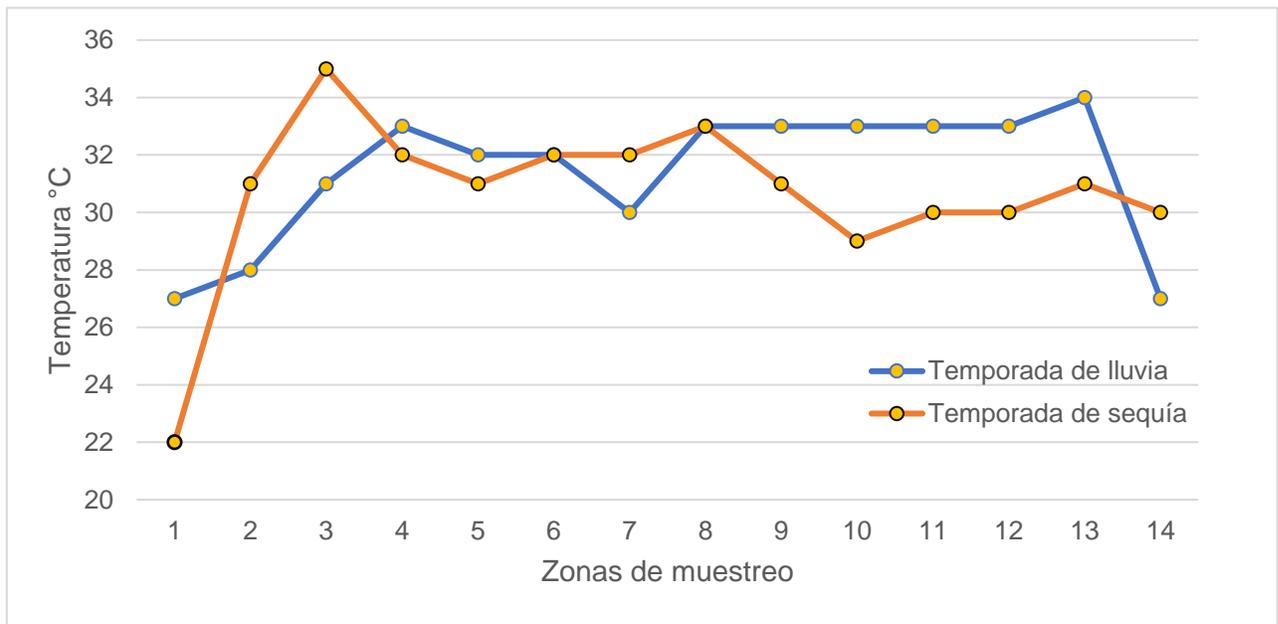
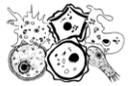


Figura 29. Valores de temperatura del agua medidos entre las dos temporadas de las distintas zonas de muestreo del balneario.



## 6.2. pH

En cuanto al pH, se observa tendencia a la alcalinidad en los diversos cuerpos de agua muestreados; en la temporada de lluvias se reportaron valores entre 8.4 y 9.3 y en temporada de sequía entre 8.9 y 9.8 (Fig. 30). Cabe mencionar que a pesar de que el valor más elevado fue de 9.8, se ha reportado que las AVL pueden soportar pH de entre 3 y 10 (Khan *et al.*, 2001) por lo cual, este valor no es limitante en el desarrollo de las amibas en el balneario.

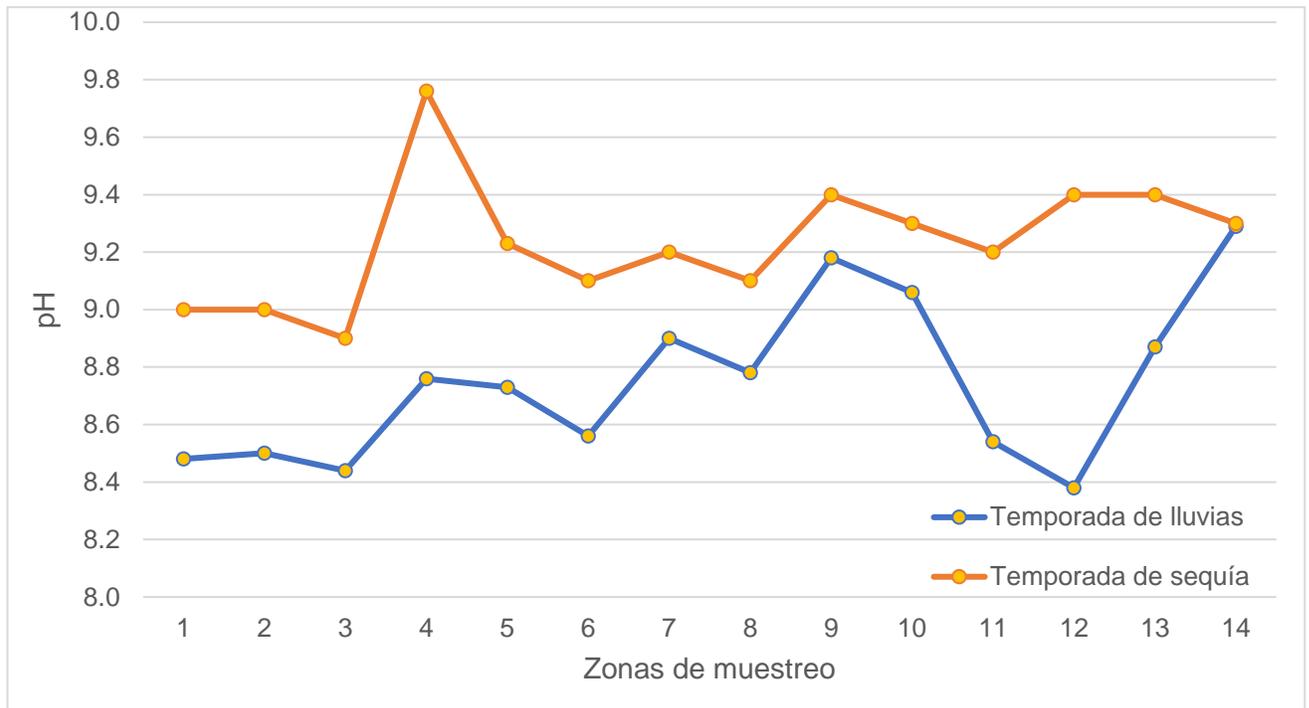
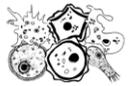


Figura 30. Valores de pH del agua obtenido entre las dos temporadas de las distintas zonas de muestreo en el balneario.



### 6.3. Conductividad

Para la conductividad (K25), los valores en temporada de lluvia oscilaron entre 1.04 y 1.16 mS/cm y en temporada de sequía entre 1.07 y 1.15 mS/cm, confirmando así la tolerancia de las amibas a un amplio ámbito de conductividad pudiendo sobrevivir en agua destilada, cultivo de tejidos, flujos corporales de mamíferos, así como agua marina (Fig. 31) (Mendoza, 2014). Por lo tanto, valores de conductividad que van desde 0.02 a 1.55 mS/cm no son ningún impedimento para la presencia de las amibas en este tipo de sistemas (Visvesvara, 2010)

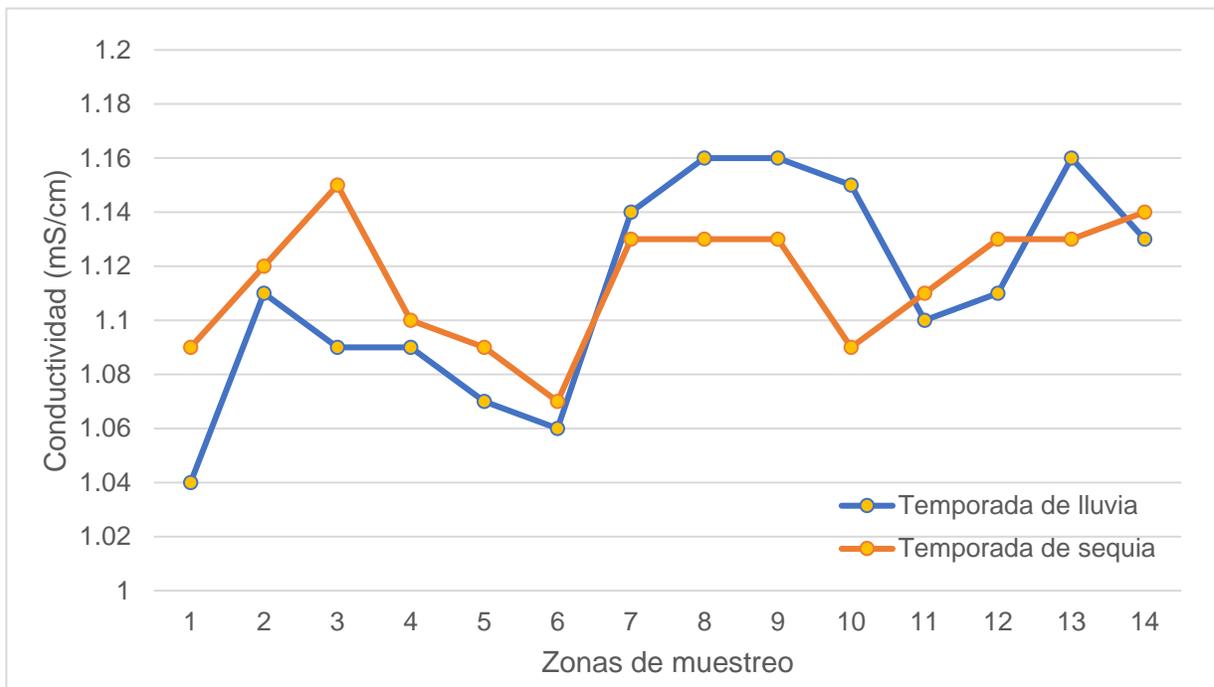
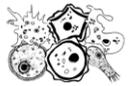


Figura 31. Valores de conductividad del agua obtenido entre las dos temporadas de las distintas zonas de muestreo del balneario.



## 7. Análisis estadístico

### 7.1. Análisis de cluster

Se realizó un clúster clásico por medio del índice de Jaccard para determinar la similitud entre la riqueza de las diferentes zonas muestreadas para las dos temporadas (lluvias y sequía).

En temporada de lluvia se encontró la mayor similitud entre las zonas 1 y 2 con 84 % de similitud y se puede observar que la mayoría de las zonas cuentan con una similitud menor a 70 %, esto puede deberse a que en esta temporada la dispersión de los organismos es mayor debido a varios factores (corriente de agua con mayor flujo, el nivel de agua aumentado, incremento de la dispersión de los organismos por vía anemócora, biopelícula casi nula y un mayor número de visitantes) por lo cual la distribución de estos organismos se ve afectada y se encuentra un menor porcentaje de similitud entre zonas (Fig. 32).

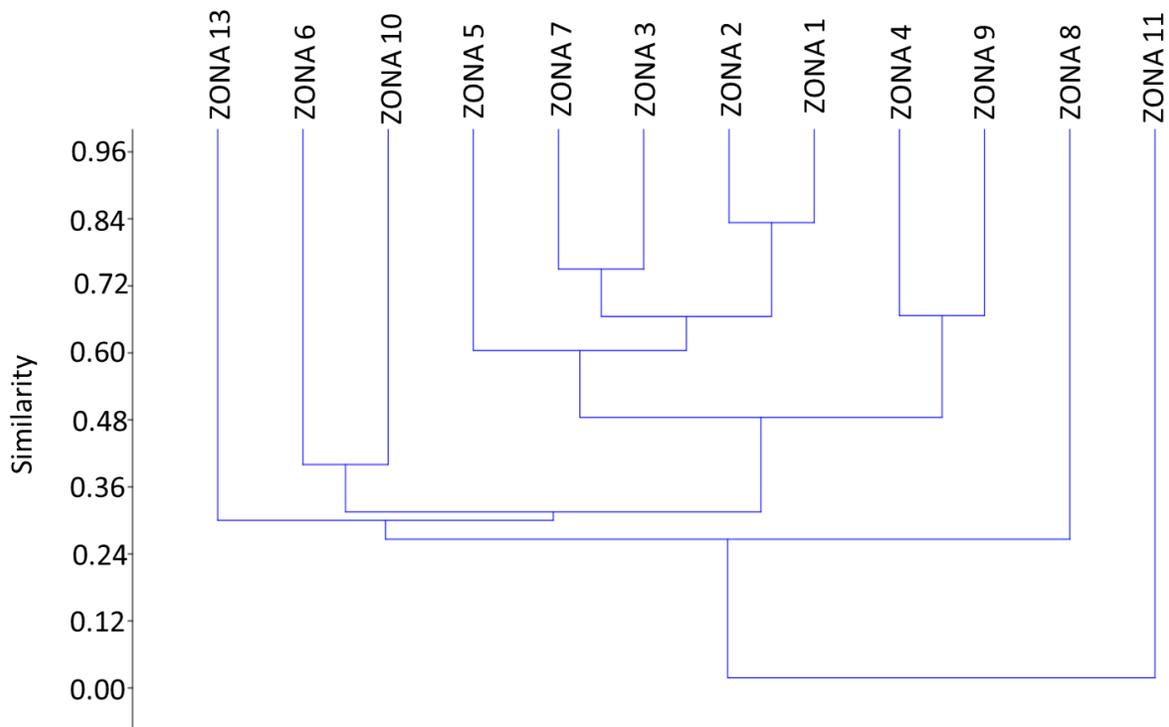
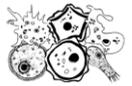


Figura 32. Dendrograma de agrupamiento para la época de lluvia en las diferentes zonas muestreadas. Índice de similitud de Jaccard. Método de agrupamiento UPGMA. Coeficiente de correlación = 0.93.



Para la temporada de sequía la mayor similitud de especies aisladas se encontró entre las zonas 10 y 14 con un 100 % de similitud, debido a que en ambas zonas solo se aisló *Rosculus ithacus*. La mayoría de las zonas muestran una similitud menor al 60 % con esto se puede inferir que la distribución de AVL dentro del balneario es aleatoria y concuerda con lo publicado por Ávila (2019) donde afirma que las AVL no siguen un patrón de agrupamiento único, se pueden encontrar en algunas circunstancias y separados en otras, caracterizándose por ser individuos que pueden ocupar todos los sitios del espacio donde se encuentran, la presencia de una especie no afecta la presencia de otro (Fig. 33).

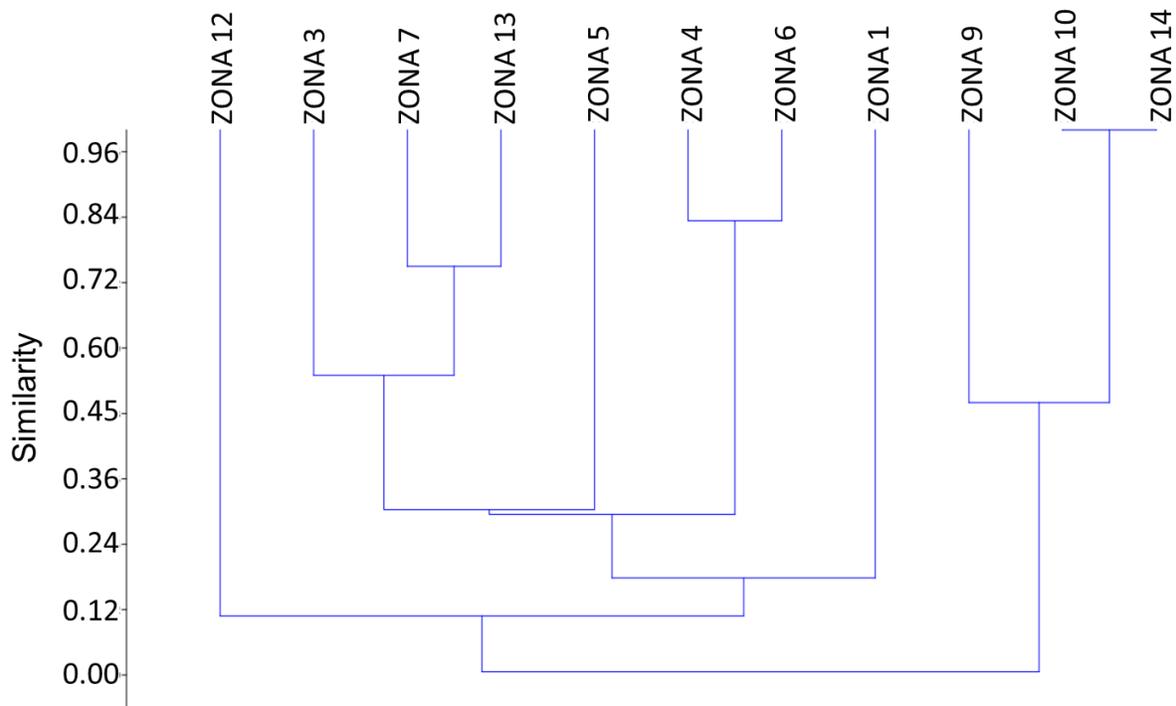
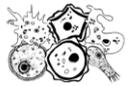


Figura 33. Dendrograma de agrupamiento para la época de sequía en las diferentes zonas muestreadas. Índice de similitud de Jaccard. Método de agrupamiento UPGMA. Coeficiente de correlación = 0.95.

## 7.2. Escalamiento multidimensional no métrico

Para determinar la relación entre los factores fisicoquímicos del agua y su influencia en la presencia de AVL, se realizó un escalamiento multidimensional no métrico (non metric MDS), por medio del cual se determinó que la presencia de amibas en las



distintas zonas muestreadas no es influida directamente por los parámetros fisicoquímicos debido a que no existe una variación grande entre estos. Como se puede observar en la figura 34 algunas estaciones se asocian a temperaturas elevadas (zonas 3,5 y 7 de la época de lluvias) mientras que otras se relacionan con los valores obtenidos de pH (7 y 13 de la temporada de sequía), aunque la mayoría de las zonas muestreadas no tuvieron asociación con alguna variable debido a que las condiciones ambientales permanecen estables durante todo el año y a lo largo del balneario, por lo cual no es posible considerar una relación directa entre la presencia de las AVL y los factores fisicoquímicos del agua.

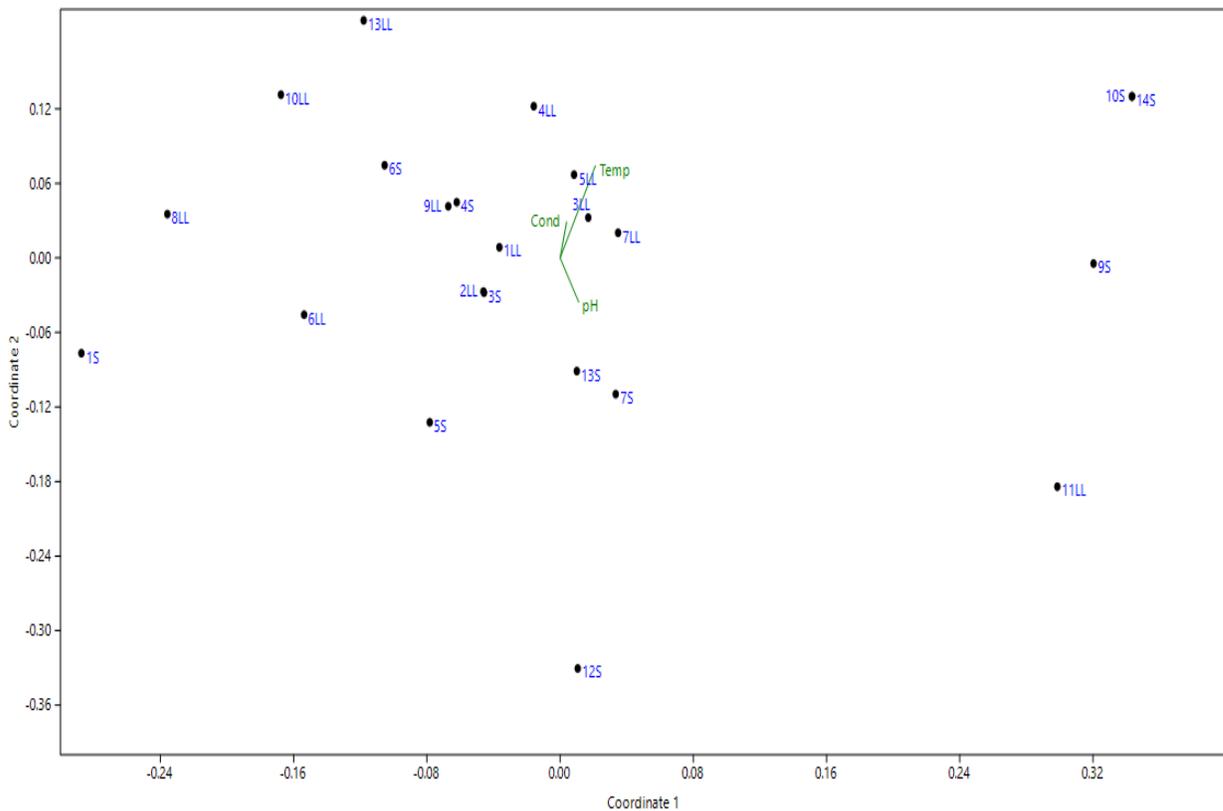
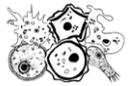
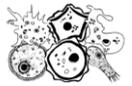


Figura 34. Escalamiento multidimensional no métrico. Stress= 0.21, r2 eje 1= 0.50, r2 eje 2= 0.22.



## IX. CONCLUSIONES

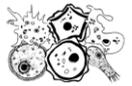
- Se realizó la identificación y registro de 15 especies pertenecientes a seis géneros. Del total de especies identificadas ocho han sido reportadas con potencial patógeno
- Se determinó una mayor riqueza y un mayor número de aislados en la temporada de lluvia.
- Las zonas de muestreo en donde mayor frecuencia de amibas se encontraron dentro del río Tolantongo.
- El biotopo con mayor frecuencia de amibas de vida libre fue el agua.
- Se realizaron pruebas de termotolerancia a las cepas reportadas con potencial patógeno resultando positivas el total de las muestras.
- Las pruebas de patogenicidad resultaron negativas para la mayoría de las muestras,
- Se determinó que los factores fisicoquímicos del agua no tienen diferencia significativa que demuestre la influencia en la presencia o ausencia de AVL.
- Se determinó la presencia de AVLPP en las albercas del balneario por lo cual no se cumple con los requerimientos indicados en la NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas”, para los cuerpos de agua natural, no aplica esta norma.



## X. RECOMENDACIONES

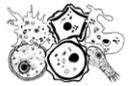
La presencia de AVLPP en el balneario las Grutas de Tolantongo, a pesar de no tener una gran presencia, puede resultar en un riesgo de salud pública para los usuarios de las instalaciones, sumado a esto, los pocos registros que se tienen de las enfermedades causadas por estas amibas y el mal diagnóstico por parte de las autoridades médicas resaltan una señal de alerta dentro de las instalaciones, por lo cual se recomienda:

- Seguir los lineamientos indicados en la NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas”.
- Indicar a los usuarios que deben evitar el uso de lentes de contacto y/o la correcta higiene de manos y estuche cuando realicen actividades acuáticas dentro de este balneario.
- Incentivar el uso de protectores nasales.
- Realización de pruebas de patogenicidad en modelos *in vivo* de AVLPP a los aislados amibianos que resultaron positivos para las pruebas de patogenicidad.
- Informar a los administradores del lugar explicando las condiciones del balneario para tomar medidas preventivas para los usuarios.
- Eliminación de biopelículas

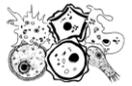


## XI.LITERATURA CITADA

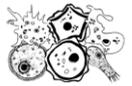
- Abedkhozasteh, H., Niyyati, M., Rahimi, F., Heidari, M., Farnia, S., Rezaeian, M. 2013. First Report of *Vermamoeba* keratitis in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. *Iran Journal of Parasitology*. 8(3):485.
- Adl, S., Simpson, A., Farmer, M., Andersen, R., Anderson, R., Barta, J., Bowser, S., Brugerolle, G., Fensome, R., Fredericq, S., James, T., Karpov, S., Krugens, P., Drug, J., Lane, C., Lewis, L., Lodge, J., Lynn, D., Mann, D., Mccourt, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S., Nerad, T., Shearer, C., Smirnov, A., Spiegel, F. y Taylor, M. 2012. The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protist. *Journal of Eukariotic Microbiology*. 59: 429-514.
- Ahmad Karamati, S., Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J. y Lasjerdi, Z. 2016. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* genotyps isolated from soil sources of public and recreational areas in Iran. *Acta Parasitológica*. 61 (4).784-789.
- Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J.Y. y Alizadeh, H. 2002. Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *Journal of Parasitology*. 88(3):621-623.
- Alvarez, J. 2015. *Detección de Amibas Patógenas de Vida Libre en el Balneario Natural “Hierve el Agua” en el Municipio de San Lorenzo Albarradas, Estado de Oaxaca. Tesis de licenciatura en biología*. FES Iztacala. UNAM. México, 80 p.
- Ávila, I. Rodríguez, F. M. Álvarez, O. y Briseño, M. 2006. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque “Las Cocuizas”, Maracay, Venezuela. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 58 (1) 19-24.
- 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-Lemus, P., Ramírez-Bautista, G., Zamora-Muñoz, C., Ibarra-Montes, R., Ramírez-Flores, E. y Hernández-Martínez M. 2010. *Acanthamoeba* spp. in domestic tap water in houses of contact lens wearers in the metropolitan area of Mexico City. *Experimental Parasitology*. 126: 54-58.
- Bonilla, P., Caballero, A., Carmona, J. y Lugo, A. 2014. Occurrence of free-living amoebae in streams of the Mexico Basin. *Experimental Parasitology*. 145: 28-33.



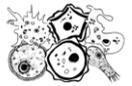
- Booton, G. C., Rogerson, A., Bonilla, T. D., Seal, D. V., Kelly, D. J., Beattie, T. K., Tomlinson, A., Lares-Villa, F., Fuerst, P. A. y Byers, T. J. 2004. Molecular and physiological evaluation of subtropical environmental isolates of *Acanthamoeba* spp., causal agent of *Acanthamoeba* keratitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 51 (2):192-200.
- Booton, G. C., Visvesvara, G. S., Byers, T., Kelly, D. y Fuerst, A. 2005. Identification and distribution of *Acanthamoeba* species genotypes associated with nonkeratitis infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 43 (4): 1689-1693.
- Bradbury, R.S., French, L.P. y Blizzard, L. 2014. Prevalence of *Acanthamoeba* spp. in Tasmanian intensive care clinical specimens. *Journal of Hospital Infections*. 86(3):178-81.
- Castrillón, J.C. y Orozco, L.P. 2013. *Acanthamoeba* spp. as opportunistic pathogens parasites. *Revista Chilena de Infectología*. 30(2):147-55.
- Center for Diseases Control and Prevention (CDC). 2019. Free living amoeba. DPDx. Consultado el: 20 de marzo del 2019. Disponible en: <https://www.cdc.gov/dpdx/freelivingamebic/index.html>.
- Chávez-Munguía, B., Omaña-Molina, M., Castañón, G., Bonilla, P., González-Lázaro, M., Hernández-Martínez, D., Salazar-Villatoro, L., Esparza-García, A., Martínez-Palomo y A., Ortega-Pierres, G. 2009. Ultrastructural study of the encystation and excystation processes in *Naegleria* sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 56(1):66-72.
- Coulon, C., Collignon, A., McDonell, G. y Thomas, V. 2010. Resistance of *Acanthamoeba* cyst to disinfection treatments used in health care settings. *Journal of Clinical Microbiology*. 48(8): 2689-2697.
- De Jonckheere, J. F. 1984. *Postgraduate Course on Biochemical Techniques for the Diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis*. UNAM, México. 70 p.
- De Jonckheere, J. F. y S. Brown. 1998. Three different group I introns in the nuclear large subunit ribosomal DNA of the amoeboflagellate *Naegleria*. *Nucleic Acids Research*. 26:456–461.
- De Jonckheere, J. F. 2004. Molecular definition and the ubiquity of species in the genus *Naegleria*. *Journal of Protistology*. 155:89-103.



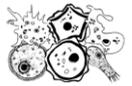
- De Jonckheere J. F. 2011. Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. 11(7):1520-8.
- Dirección General de Epidemiología. 2012. *Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Meningoencefalitis Amibianas Primaria (Amibas de Vida Libre)*. [en línea]. Consultado el: 20 de marzo del 2019. Disponible en: [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig\\_epid\\_manuales/16\\_2012\\_Manual\\_Meningoencefalitis\\_vFinal\\_7nov12.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/doctos/infoepid/vig_epid_manuales/16_2012_Manual_Meningoencefalitis_vFinal_7nov12.pdf)
- Dini, L.A., Cockinos, C., Freaan, J.A., Niszl, I.A. y Markus, M.B. 2000. Unusual case of *Acanthamoeba polyphaga* and *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in a contact lens wearer from Gauteng, South Africa. *Journal of Clinical Microbiology*. 9(2):826–829.
- Esquivel-Solís, M. 2018. *Estudio de Amibas Potencialmente Patógenas en Biotopos de Tres Sistemas de Cenotes en el Estado de Yucatán, México*. Tesis para obtener el título de Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 71 p.
- Fernández, M. 2015. *Caracterización Molecular de Amibas de Vida Libre e Identificación de otros Parásitos en Aguas de Red de la Provincia de Zaragoza: Asociación con otros Microorganismos y Riesgos en la Salud Pública*. Tesis para obtener el grado de doctor en ciencias. Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España. 150 p.
- Fowler, M. y Carter, R.F. 1965. Acute pyogenic meningitis probably due to *Acanthamoeba* sp.: a preliminary report. *Britannic Medical Journal*. 2: 740–743.
- 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. *Dermatología Peruana*. 16 (1):36-40.
- Gallegos-Neyra, 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 UNAM. México. 130 p.
- Gallegos-Neyra, E., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M., y Meyén-Estrada, R. 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 85: 10-25.



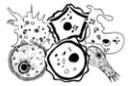
- Hammer, O. 2001. Past 3. Oslo. (3.23) (Software).
- Hickman, C. P., Roberts, L. S. y Larson, A. 2001. *Principles of Zoology*. McGraw Hill. Eleven Edition. New York, E.U. 299 p.
- Hsu, B-M., Huang, C-C., Chen, J-S., Chen, N-H. y Huang, J-T. 2011. Comparison of potentially pathogenic free-living amoeba hosts by *Legionellas* spp. in substrate-associated biofilms and floating biofilms from spring environments. *Water Research*. **45**: 5171-5183.
- INEGI. 2018. *Espacios y Datos de Mexico: Cardonal, Hidalgo*. Consultado el 20 de Abril del 2018. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/app/mapa/espacioydatos/default.aspx?ag=130150001>.
- Init, I. Lau, Y.L. Arin Faszlun, A. Foad, A.L. Neilson, R.S. y Nissapatorn, V. 2010. Detection of free-living amoeba, *Acanthamoeba* and *Naegleria*, in swimming pools, Malaysia. *Tropical Biomedicine*. 27(3). 566-577.
- Javanmard, E. Niyati, M. Lorenzo-Morales, J. Lasjerdi, Z. Behniafar, H y Mirjalali, H. 2017. Molecular identification of waterborne free living amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria* and *Vermamoeba*) isolated from municipal drinking water and environmental sources, Semnan province, north half of Iran. *Experimental Parasitology*. 1-5.
- Khan, N. A., Jarroll, E. L., Paget, T. A. 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Current Microbiology*. 43, 204–208.
- Khan N. A. y Teeren, J. Pathogenesis of *Acanthamoeba* infections. 2003. *Microbial Pathogenesis*. 34(6): 277-85.
- Khan, N. A. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*. 30 (4): 564-595.
- Khan, N. A. 2009. *Acanthamoeba: Biology a Pathogenesis*. Caister Academic Press. Norfolk, UK. 271 p.
- Lares-Jiménez, L.F. y Lares-Villa, F. (2009). Aislamiento de amibas de vida libre en aguas superficiales del Valle de Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*. 5 (2): 161-167.



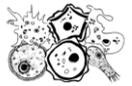
- Latifi, A. Niyiyati, M. Lorenzo-Morales, J- Lasjerdi, Z. Haghghi, A. y Seyyed Tabaei, S.J. 2016. Presence of *Balamuthia mandrillaris* in hot springs from Mazandaran province, northern Iran. *Epidemiology and Infection*. 1 (11). 1-6.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martinez, E. y Valladares, B. 2005. Isolation and identification of pathogenic *Acanthamoeba* strains in Tenerife, Canary Islands, Spain from water sources. *Parasitology Research*. 95: 273-277.
- Matin, A., Siddiqui, R., Jayasekera, S., y Ahmed Khan, N. 2008. Increasing importance of *Balamuthia mandrillaris*. *Clinical Microbiological Reviews*. 21 (3):435–448.
- Marciano-Cabral, F., Puffenbarger, R. y Cabral, G. A. 2000. The Increasing Importance of *Acanthamoeba* Infections. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 47 (1): 29-36.
- Martinez A.J, Visvesvara G.S. 1985. Free-living, amphizoic and opportunistic amibas. *Brain Pathology*. 7:583–98.
- Mendoza, J. 2014. *Aislamiento e identificación de Acanthamoeba spp. Patógenas del agua potable de la zona metropolitana del Valle de México (ZMVM)*. Tesis de licenciatura. FES Iztacala. UNAM. México, 81 p.
- Montes, N. 2012. *Identificación de amibas de vida libre en cuevas de la región central de México*. Tesis para obtener el grado de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. UNAM. 64 p.
- Moreno, A. 2012. *Amebas patógenas termotolerantes en las biopelículas de un balneario de aguas termales en el estado de Hidalgo, México*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. UNAM. 52 p.
- Merckell, E. y Voige, M. 1989. *Parasitología Médica*. Editorial Interamericana. 6a Edición Madrid, España.
- 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. *Parasitología Latinoamericana*. 58:106-111.
- Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010 “*Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las piscinas*”. Diario Oficial de la Nación. Consultado el 21 de Marzo del 2019. Disponible en: [http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5256066&fecha=25/06/2012](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5256066&fecha=25/06/2012)



- Oddo, B. D. 2006. Infecciones por amebas de vida libre: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. *Revista Chilena de Infectología*. 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.
- Peralta, M y Ayala, J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Salud Uninorte*. 25 (2): 280-292.
- Pussard, M. y Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kstique et taxonomies du genre *Acanthamoeba* (Protozoa,Amoebida). *Protistology*. 13: 557-598.
- Ramírez-Acevedo, A. (2009). *Bioindicadores de la Calidad del Agua en la Cuenca de Rio Tolantongo, Hidalgo*. (Tesis para obtener el grado de licenciatura). Universidad Autónoma Chapingo. Hidalgo, México.
- Ramírez, E., Robles, E., Sainz, M., Ayala, R. y Campoy, E. 2009. Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 25 (4): 247-255
- Retana-Moreira, L. Abrahams-Sandi, E. Cabello-Vilchez, A.M. Reyes-Battle, M. Valladares, B Martínez-Carretero, E. Piñero, J.E. y Lorenzo-Morales, J. 2014. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* and *Balamuthia mandrillaris* from combination shower units in Costa Rica. *Parasitology Research*. 113 (11). 4117-4122.
- 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. *Environmental Research*. 62: 43-52.
- Robinson, B., Christy, P., Hayes, S. y Dobson, P. 1992. Analytical Methods Manual Protozoology. State Water Laboratory Engineering And Water Supply Department South Australia. Australia. 90p.
- Rondanelli, E. G. 1987. *Infectious Diseases. 1. Amphizoic Amoeba Human Pathology*. Piccin Nuova Libreria. Padua, Italia. 279 pp.
- Schuster, F.L y Visvesvara, G. S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic pathogens of humans and animals. *International Journal of Parasitology*. 34: 1001-1027.

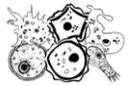


- Seas, R. C. y Bravo P. F. 2006. Encefalitis amibiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad fatal reconocida cada vez más frecuente en América Latina. *Revista Chilena de Infectología* 23(3):197-199
- Sharma R, Jhanji V, Satpathy G, Sharna N, Khokhar S, Agarwar T (2013) Coinfection with *Acanthamoeba* and *Pseudomonas* in contact lens-associated keratitis. *Optometry and Visual Science*, 90 (2), 53-55.
- Smirnov, A. V. y Brown, S. 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology*. 3 (3): 148-190.
- Siddiqui, R. y Khan, N. A. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites and Vectors*. 5 (6): 365-372
- Siemensma, F. J. 2019. Microworld, world of amoeboid organisms. World-wide electronic publication, Kortenhoef, Netherland.
- Sígala-Regalado, I. 2008. *Registro protozoologico en cinco biotopos de la cueva de los Riscos, Querétaro, México*. Tesis de licenciatura en biología. Facultad de Ciencias UNAM. México. 117 p.
- Sígala, I. 2011. *Diversidad de protozoos ciliados en cinco biotopos de cuevas de México*. Tesis de maestría en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias. México. UNAM. 150 p.
- Tamez, R. 2019. *Riqueza Especifica De Amibas De Vida Libre Potencialmente Patógenas De Laguna Larga, Michoacán*. Tesis de licenciatura en biología. FES Iztacala. México. UNAM. 96 p.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. y Ayadi, A. Pathogenic free-living amoeba: epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie*. 60 (6) :399-405.
- Visvesvara, G.S., Moura, H. y Schuster, F.L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, y *Sappinia diploidea*. *FEMS Microbiology reviews*. 50: 1-26
- Visvesvara, G. S. 2010. Free-Living Amebae as opportunistic agents of human disease. *Journal of Neuroparasitology*. 1: 1-13.
- Todd, C. Reyes, M. Piñero, J. Martínez-Carretero, E. Valladares, B. Streete, D. Lorenzo-Morales, J. y Lindo, J. 2015. Isolation and molecular characterization of

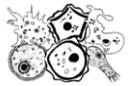


*Acanthamoeba* genotypes in recreational and domestic water sources from Jamaica, West Indies. *Journal of Water and Health*. 13(3): 909- 919.

- Urbina, C. 2006. *Efecto De La Temperatura Sobre La Distribución De Amebas De Vida Libre En Un Sistema De Aguas Termales Alimentado Por Un Géiser En El Estado De Hidalgo*. Tesis de licenciatura en biología. FES Iztacala UNAM. México. 69 p.
- Uribarren B, T. 2014. *Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia*. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Consultado el: 2 de marzo del 2019. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html>.
- Warhurst, D.1985. Pathogenic free-living amoebae. *Parasitology*. 1: 24-28
- Weekers, P.H., Gast, R.J., Fuerst, P.A. y Byers, T.J. 1994. Sequence variations in small-subunit ribosomal RNAs of *Vermamoeba vermiformis* and their phylogenetic implications. *Molecular Biology and Evolution*. 11 (4) 684-90
- Zúñiga, C. I. y Caro, J. 2011. *Balamuthia mandrillaris*: una amiba de vida libre altamente letal. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 96:134-135.



## XII. ANEXOS



## Anexo I. Medios de cultivo para AVL.

### A. Medio de cultivo solido con NNE (agar no nutritivo) y *Enterobacter aerogenes*

#### Reactivos:

- NaCl -----0.12g
- MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O -----0.004g
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> -----0.146g
- CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O -----0.004g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> -----0.136g
- Bactoagar -----15.0g
- Agua destilada -----1000mL

#### Procedimiento:

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



## B. Medio de cultivo semisólido para AVL con NNE y solución Prescott-James

### Reactivos:

- Medio NNE
- Solución Prescott –James (estéril)
- Extracto de suelo con sales(estéril)
- Infusión de granos (trigo, maíz, arroz)
- Infusión de planta (Cerophyl 0.15 %) (estéril)
- Tubo de concentrado de *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor
- Concentrado de muestra centrifugada

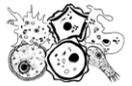
### Procedimiento:

1. Vaciar medio NNE en placas Petri aproximadamente con 5 mm de grosor.
2. Posteriormente agregar la cantidad de las soluciones en la siguiente proporción: Solución Prescott–James (seis gotas) Extracto de suelo con sales (cuatro gotas).

Infusión de granos (tres gotas por cada infusión de trigo, maíz y arroz) Infusión de planta (tres gotas).

Tubo de concentrado de *Enterobacter aerogenes* (una gota) Concentrado de la muestra centrifugada (seis gotas).

2. Dejar a temperatura ambiente o colocar en incubadora según sea el objetivo de estudio



### C. Medio de cultivo líquido para AVL con solución Prescott-James

#### Reactivos:

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

#### Procedimiento:

1. Agregar 1mL de la solución Prescott-James en cada pozo de la placa de cultivo celular a utilizar.
2. Posteriormente agregar la cantidad de las soluciones en la siguiente proporción:

Extracto de suelo con sales (cuatro gotas).

Infusión de granos (tres gotas por cada infusión de trigo, maíz y arroz) Infusión de planta (tres gotas).

Tubo de concentrado de *Enterobacter aerogenes* (una gota) Concentrado de la muestra centrifugada (seis gotas).

Dejar a temperatura ambiente o colocar en incubadora según sea el objetivo de estudio.



**Anexo II. ANOSIM entre las dos temporadas muestreadas (época de lluvia y de sequías).**

a) ANOSIM

Permutation N:	9999
Mean rank within	122.7
Mean rank between	130.9
R:	0.06474
p (same):	0.1018