



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA

***Acanthamoeba* spp. en aguas recreativas de “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

MONSERRAT BRENDA PÉREZ JIMÉNEZ



Facultad de Estudios Superiores
IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS:

D en C ELVIA MANUELA GALLEGOS NEYRA

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatoria

Papá, ha transcurrido mucho tiempo desde tu partida, extraño mucho sentir tu protección, tu amor, escuchar tu voz, abrazarte y que me brindes la fuerza que necesito con solo una mirada. Te agradezco por todas las conversaciones que tuvimos, consejos y regaños, por toda la confianza que depositaste en mí, por enseñarme a no rendirme y superar las adversidades de la vida. Siempre serás mi gran ejemplo, mi inspiración y mi todo. Deseo con todo mi corazón volver a encontrarnos para poder abrazarte y decirte lo mucho que te quiero y la falta que me haces. Este logro fue gracias a ti, por tu esfuerzo, dedicación y paciencia ¡Te lo dedico con todo mi amor!

Mamá, me has enseñado a ser una mujer fuerte, aguerrida y a conseguir las cosas por mí misma, te doy las gracias por cuidarme, defenderme y por procurarme siempre, eres mi gran inspiración, que la vida me permita recompensarte por todo lo que haces por mí, este triunfo y todos los que tenga en la vida son para ti, ¡te amo mamita!

Andrés, hermano, me brindas mucha fuerza para seguir cumpliendo mis objetivos, a no desviarme del camino, siempre retándome a dar más de mí, para terminar lo que empecé ¡Te quiero mucho!

Sam: mi hermana más pequeña, la más traviesa, rebelde, sincera y leal. Siempre me das alegría, fuerza y cariño en todo momento, espero ser tu inspiración y que seas la mejor en todo lo que hagas y te propongas, ¡Te quiero mucho!

Mau, eres la mejor persona que alguien puede tener en la vida, inteligente, noble, amable y empático, chistoso, alegre y carismático. Deseo que todos tengan alguien como tú en la vida ¡Te quiero con todo mi corazón!

Cookie, mi mejor amiga en la vida, ¡Te quiero mucho mi cachorra favorita por siempre!

Polo, eres el perrito más desastroso que alguien puede tener, ¡Te quiero mucho!

A mi **familia** en general por confiar en mí y motivarme a ser una mejor persona, siempre podrán contar conmigo de manera incondicional, ¡Los quiero mucho!

Agradecimientos

A **Dios**, por permitirme llegar a cumplir esta meta, por haberme dado unos padres ejemplares y por el regalo de la vida.

Le agradezco a la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por haber recibido, desde el CCH Azcapotzalco y hasta la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, una educación de excelente calidad.

A mi tutora, la **Doctora Elvia Manuela Gallegos Neyra**, por haberme recibido en su laboratorio, por el apoyo, la confianza y amistad que me brindo y por ser una persona comprensiva y cálida.

A mis sinodales, el **Doctor Alfonso Lugo**, el **Doctor Eric Monroy**, la **Maestra Dolores Hernández** y el **Maestro Ángel Lara**, siempre les estaré agradecida por brindarme el tiempo que dedicaron a mejorar este trabajo con cada una de sus observaciones.

A mis **padres**, por todo el cariño y apoyo que me han brindado, siempre los llevo en mis pensamientos y mi corazón, sin ustedes no habría logrado ser la persona que soy, gracias por estar siempre; ¡Los amo!

A mis hermanos, **Andrés** y **Sam** por todos los momentos que hemos vivido juntos, por ser mis cómplices y amigos de toda la vida, porque esta unión jamás se termine.

A **Mau**, por apoyarme en todo momento, inspirarme y motivarme a ser cada día mejor, y por confiar en mí, deseo que la vida nos deje compartir más momentos juntos.

A mis **abuelitos**, que, aunque ya no están presentes, sé que se sienten orgullosos de mis logros, ¡Gracias por todos los consejos que en algún momento me dieron!, les mando un fuerte abrazo hasta el cielo.

A mi **abuelita** y mi tía **Paula** que siempre me tienen en sus oraciones y me motiva a seguir esforzándome por mis metas ¡Las quiero!

A mis primos **Santi**, **Judá**, **David**, **Daniel**, **Miguel**, **Debo** y **Sharon** que nunca dejaron de creer en mí, que me apoyaron y brindaron todo su cariño, ¡Los quiero!

A mis amigos, **Jacque**, **Carlitos**, **Héctor**, **Deni** y **Vale** por haber compartido tantos momentos divertidos con ustedes, ¡Los quiero!

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
2.1 Amibas de vida libre	2
2.2 Acanthamoeba	4
2.2.1 Características de <i>Acanthamoeba</i>	5
2.2.2 Ubicación taxonómica de <i>Acanthamoeba</i>	5
2.2.3 Morfología y ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i>	6
2.2.4 Clasificación morfológica de las especies de <i>Acanthamoeba</i> mediante las características de su quiste.....	7
2.2.5 Patologías causadas por <i>Acanthamoeba</i>	8
2.2.6 Epidemiología de la Acanthamebiosis.....	12
III. ANTECEDENTES.....	12
3.1 Antecedentes mundiales	12
3.2 Antecedentes en México	14
IV. JUSTIFICACIÓN.....	17
V. OBJETIVOS	18
5.1.1 Objetivo general	18
5.1.2 Objetivos particulares	18
VI. ÁREA DE ESTUDIO.....	19
6.1 Balneario “Las Grutas de Tolantongo”	20
6.1.1 zonas de muestreo del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.	21
VII. MATERIAL Y MÉTODOS.....	24
7.1.1 TRABAJO EN CAMPO	24
7.1.1.1 Recolecta y transporte de las muestras de agua, sedimento y biopelícula.....	25
7.1.1.2 Registro de parámetros fisicoquímicos del agua “ <i>in situ</i> ”	25
7.1.2 TRABAJO EN LABORATORIO	25
7.1.2.1 Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre.	25
7.1.2.2 Identificación morfológica de las amibas aisladas	26
7.1.3 Prueba de termotolerancia.....	26
7.1.4 Pruebas de patogenicidad.....	27
7.1.4.1 Prueba de osmotolerancia	27
7.1.5 Análisis estadísticos.....	28
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
8.1.1 Géneros y especies de AVL aisladas	28

8.1.2 Especies de <i>Acanthamoeba</i> aisladas.....	29
8.1.3 Catálogo de especies patógenas.....	31
8.1.4.1 Comparación de zonas de muestreo.....	39
8.1.4.2 Comparación de aislados de <i>Acanthamoeba</i> por biotopos y épocas del año.	40
8.1.5 Termotolerancia	44
8.1.6 Pruebas de patogenicidad.....	46
8.1.6.1 Osmotolerancia	46
8.1.7 Parámetros físicos y químicos del agua	49
8.1.7.1. Temperatura del agua	49
8.1.7.2 pH del agua	51
8.1.7.3 Conductividad del agua	53
8.1.8 Análisis estadísticos.....	54
8.1.8.1. Índice de Jaccard.....	54
8.8.2 Análisis de similitudes (ANOSIM).....	57
8.8.3 Escalamiento multidimensional no métrico	58
IX. CONCLUSIONES.....	59
X. RECOMENDACIONES.....	60
XI. LITERATURA CITADA.....	61
XI. ANEXOS.....	72
Anexo 1	72
Especies de AVL aisladas en las dos épocas muestreadas	72
Anexo 2	73
Medio NNE (agar no nutritivo con <i>Enterobacter aerogenes</i>) (De Jonckheere, 1979).....	73
Anexo 3	74
Medio semisólido con medio NNE y solución Prescott-James (Aladro-Lubel, 2009)	74
Anexo 4	75
Medio líquido con solución Prescott-James (Aladro-Lubel, 2009)	75

Cuadro 1 Clasificación taxonómica de las AVL potencialmente patógenas (Adl <i>et al.</i> , 2012).	3
Cuadro 2. Prueba de tolerancia a la temperatura de los aislados de <i>Acanthamoeba</i> en la época de lluvia.....	44
Cuadro 3. Prueba de tolerancia a la temperatura de los aislados de <i>Acanthamoeba</i> en la época de sequía.....	45
Cuadro 4. Evaluación del crecimiento de <i>Acanthamoeba spp</i> en presencia de manitol a diferentes concentraciones.....	47
Cuadro 5. Evaluación del crecimiento de <i>Acanthamoeba spp</i> en presencia de manitol a diferentes concentraciones.....	48
Cuadro 6. ANOSIM, comparación de las dos épocas muestreadas (lluvias y sequía) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.....	57
Cuadro 7. Especies de AVL que se registraron en las dos épocas muestreadas (lluvias y sequía) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México....	72

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba spp.</i> (CDC 2004).	7
Figura 2. Clasificación morfológica de las características del quiste de <i>Acanthamoeba</i> . Grupo I (a), grupo II (b) y grupo III (c) (Tomado de Castrillón y Orozco, 2013).	8
Figura 3. Queratitis por <i>Acanthamoeba</i>	10
Figura 4. Ubicación geográfica del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, localización geográfica del municipio el Cardonal (a), imagen satelital del balneario (b)...	19
Figura 5. Zonas de muestreo en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México; cascada (a), gruta (b), río (c), pozas (d), alberca 1 (e), alberca 2 (f) y túnel (g).	20
Figura 6. Cascada del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.....	21
Figura 7. Gruta del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México. Toma aérea (a), dentro de la Gruta (b).	21
Figura 8. Túnel del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.	22
Figura 9. Río del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.	22
Figura 10. Albercas del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México. Alberca “El Huamúchil” (a) y Alberca “El Paraíso Escondido”.....	23
Figura 11. Pozas del balneario “Las Grutas de Tolantongo” Hidalgo, México.	23
Figura 12. Zonas de muestreo del balneario “Las Grutas de Tolantongo”. Hidalgo, México. Imagen tomada de Google maps, 2019.	24
Figura 13. Porcentaje de aislados de AVL en las dos épocas muestreadas (sequía y lluvias) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.....	29
Figura 14. Riqueza específica de especies de <i>Acanthamoeba</i> aisladas en las dos épocas muestreadas (sequía y lluvias) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.	30
Figura 15. <i>Acanthamoeba astronyxis</i> . Fase quística (a), esquema del quiste (b): ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (n). Barra de escala 10 μ m. 400X.	32
Figura 16. <i>Acanthamoeba castellanii</i> . Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10 μ m. 400X....	33

Figura 17. <i>Acanthamoeba culbertsoni</i> . Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10µm. 400X....	34
Figura 18. <i>Acanthamoeba griffini</i> . Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10µm. 400X.	35
Figura 19. <i>Acanthamoeba polyphaga</i> . Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10µm. 400X....	36
Figura 20. <i>Acanthamoeba rhyodes</i> . Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10µm. 400X.	37
Figura 21. <i>Acanthamoeba triangularis</i> . Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10µm. 400X....	38
Figura 22. Comparación de frecuencia de <i>Acanthamoeba</i> por época del año (lluvias y sequía) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.....	40
Figura 23. Abundancia de <i>Acanthamoeba</i> por biotopo en la época de lluvias en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.....	41
Figura 24. Abundancia de <i>Acanthamoeba</i> por biotopos en la época de sequía en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.....	41
Figura 25. Porcentaje de aislados de <i>Acanthamoeba</i> por épocas (lluvias y sequía) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.....	43
Figura 26. Variación espacial de los valores de temperatura en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, en ambas épocas del muestreo.	50
Figura 27. Variación espacial de los valores de pH en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, en ambas épocas del muestreo.	52
Figura 28. Variación espacial de los valores de conductividad en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, en ambas épocas del muestreo.	53
Figura 29. Clúster clásico de la época de lluvias, coeficiente de correlación de 0.88, realizado con el software Past versión 3.3.....	55
Figura 30. Clúster clásico de la época de sequía, presenta un coeficiente de correlación de 0.80, realizado con el software Past versión 3.3.	56
Figura 31. Escalamiento multidimensional no métrico de los parámetros físicos y químicos del agua del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.	58

I. RESUMEN

Las amibas de vida libre pertenecen al grupo de los protozoos, son organismos unicelulares, cosmopolitas capaces de sobrevivir a cambios graduales en el ambiente, la mayoría de las especies presentan dos formas en su ciclo de vida; trofozoíto y quiste.

Dentro del grupo de las amibas de vida libre, se encuentra el género *Acanthamoeba*, causante de queratitis amibiana, encefalitis amibiana granulomatosa y acantamebiosis cutánea. Estas amibas se han aislado del suelo y ambientes acuáticos como: aguas termales y albercas.

El muestreo se realizó en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, se dividió en 14 zonas de las cuales se tomaron muestras de sedimento, biopelícula y agua. Se aislaron un total de siete especies del género *Acanthamoeba*, siendo *Acanthamoeba polyphaga* la especie con mayor frecuencia, la cual se aisló en las dos épocas del año muestreadas.

Se realizaron pruebas de termotolerancia y patogenicidad (osmotolerancia) a los aislados de *Acanthamoeba* spp. de los resultados obtenidos en la prueba de termotolerancia fueron positivos en todas las especies aisladas mientras que para la prueba de patogenicidad solo hubo crecimiento de amibas en la concentración de 0.5 M.

Se realizó un clúster clásico por medio del índice de Jaccard, el cual demostró la similitud de las especies aisladas entre las zonas muestreadas en cada época del año. También se demostró la similitud mediante el análisis ANOSIM de los aislados entre cada época. Por último, se correlacionaron los factores físicos y químicos del agua por medio de un escalamiento multidimensional no métrico, el cual demostró que los factores físicos y químicos del agua, no tuvieron relación en la presencia ausencia de especies aisladas

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Amibas de vida libre

Las amibas de vida libre (AVL) pertenecen al grupo de los protozoos, son organismos unicelulares, se caracterizan por estar formados por una membrana plasmática rodeada por hialinoplasma, presentan vacuolas alimenticias y contráctiles, pseudópodos (los cuales son proyecciones citoplasmáticas que sirven tanto para su locomoción como para su alimentación), y algunas especies presentan uroide, siendo de gran importancia para su identificación morfológica. Las amibas son organismos cosmopolitas capaces de sobrevivir a cambios graduales en el ambiente (Hickman *et al.*, 2001; Smirnov y Brown, 2004), esto debido a que presentan dos fases en su ciclo de vida; la primera llamada trofozoíto; en esta la amiba es móvil, se reproduce y se alimenta de una amplia variedad de microorganismos, principalmente bacterias y levaduras. La segunda fase se denomina quiste, en este estadio los trofozoítos, disminuyen su metabolismo y adoptan diferentes formas dependiendo del género, permaneciendo viables durante mucho tiempo. Además, presentan una gran resistencia a la desecación, a temperaturas extremas, a diversos agentes antimicrobianos y desinfectantes (Ramírez-Molas *et al.*, 2005).

Las AVL se encuentran comúnmente en el suelo y en ambientes acuáticos como: lagos, ríos, estuarios, corrientes subterráneas, aguas termales y en agua potable (Mahittikorn *et al.*, 2017).

Las amibas tienen una función fundamental en el flujo energético y en el reciclado de los nutrientes del agua, en su fase trófica son organismos capaces de controlar una gran diversidad de especies microbianas (bacterias) y al pasar a su estado quístico, pueden ser diseminados a través del viento (Saburi *et al.*, 2017). Tienen la capacidad de vivir dentro de biopelículas, las cuales se pueden encontrar en las interfaces agua-aire, agua-suelo, agua plantas y agua animal o en sustratos sólidos que están en contacto con el agua, estas se forman mediante la secreción de

polisacáridos de las bacterias en el medio, permitiendo a las amibas interactuar con una gran cantidad de microorganismos, por ejemplo: bacterias, rotíferos y otros protozoos (Khan, 2006).

La clasificación taxonómica clásica dividió al reino Protozoa en cuatro grupos: Sarcodina (amibas), Mastigophora (flagelados), Sporozoa (la mayoría protozoos parásitos) y Ciliophora (ciliados) (Visvesvara *et al.*, 2007). Esta taxonomía ha sido totalmente abandonada por la Sociedad Internacional de Protozoólogos por una basada en enfoques morfológicos modernos, vías bioquímicas y filogenia molecular. De acuerdo con este nuevo esquema 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 amibas de vida libre potencialmente patógenas (AVLPP) según la nomenclatura actual han sido clasificadas en dos súper grupos (Cuadro. 1) (Adl *et al.*, 2012).

Cuadro 1 Clasificación taxonómica de las AVL potencialmente patógenas (Adl *et al.*, 2012).

Súper grupo	Amebozoa		Excavata
Familia	Acanthamoebidae	Thecamoebidae	Vahlkampfiidae
Género	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Acanthamoeba</i> • <i>Balamuthia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Sappinia</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Naegleria</i> • <i>Vahlkampfia</i>

Dentro del grupo de las AVL (Cuadro 1) se encuentran cinco géneros considerados como potencialmente patógenos (*Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Naegleria*, *Sappinia* y *Vahlkampfia*), son causantes de distintas enfermedades como la meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP) causada por *Naegleria fowleri*, la queratitis amibiana (QA), encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) y amebiosis cutánea (AC) causadas por *Acanthamoeba* spp. Estas amibas se desarrollan principalmente en agua con temperatura elevada y con poca movilidad (Gallegos,

1997). Estos géneros se han aislado de agua embotellada, albercas, soluciones para lentes de contacto y desinfectantes, incluso se han aislado del suelo, polvo, aire, sedimentos y en algunos vegetales y animales como: peces, anfibios, reptiles y mamíferos (Muñoz, 2003). Además, algunas de las AVL potencialmente patógenas también pueden actuar como vectores de bacterias patógenas, de esta manera el quiste amibiano les confiere un mecanismo de protección, un medio de transporte y les permite colonizar nuevos ambientes (Peralta-Rodríguez *et al.*, 2009).

2.2 *Acanthamoeba*

El género *Acanthamoeba* es conocido como un protozoo de tipo “anfizoico”, debido a que tiene la capacidad de vivir como organismo de vida libre y como parásito patógeno y oportunista (Ávila, 2006).

Acanthamoeba fue descrita por primera vez en 1930 por Castellani, cuando reportó la presencia de una amiba en un cultivo de *Cryptococcus pararoseus*. Sin embargo, en 1931 fue establecido su género, donde se ubican las amibas que presentan numerosas proyecciones citoplasmáticas espinosas, superficiales, conocidas como acantopodios. El primer indicio de que el género *Acanthamoeba* podía causar enfermedades en humanos fue en 1958 durante los ensayos para la vacuna contra la poliomielitis la cual fue realizada por Culbertson. En cultivos celulares usados para preparar la vacuna, aparecieron amibas del género *Acanthamoeba*, que después de ser inoculadas en algunos modelos animales provocaron su muerte por encefalitis. Estas observaciones llevaron a Culbertson a predecir el papel de las amibas de vida libre como agentes causantes de enfermedades en el hombre. Los primeros casos en los que *Acanthamoeba* fue establecida claramente como agente causal de enfermedades en humanos fueron reportados a partir de 1970 (Oddó 2006).

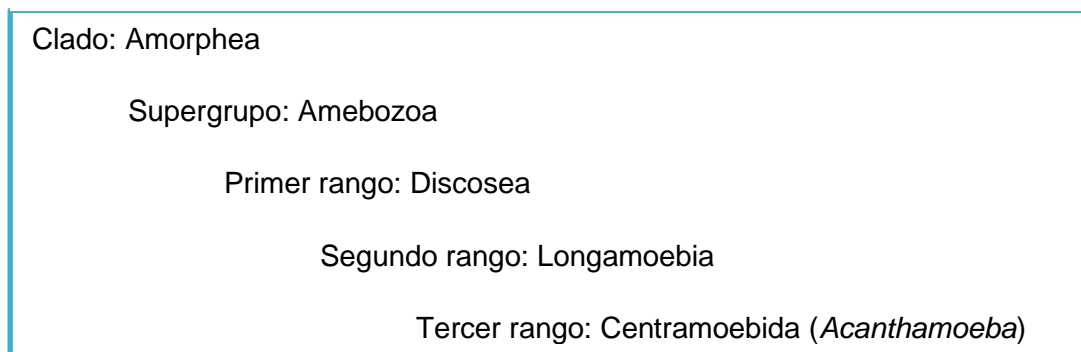
2.2.1 Características de *Acanthamoeba*

Las especies de *Acanthamoeba* se encuentran entre los protozoos frecuentemente encontrados en la naturaleza. Están distribuidas por todo el mundo y han sido aisladas de suelo, polvo, aire, agua dulce natural y tratada, agua de mar, albercas, aguas residuales, sedimentos, aire acondicionado, hospitales (en los aerosoles, regaderas, máquinas de diálisis), lentes de contacto, cultivos celulares, equipos dentales, etc. También han sido aisladas de la vegetación; de animales incluyendo especies de peces, anfibios, reptiles y mamíferos; de la cavidad nasofaríngea de personas aparentemente sanas y de pacientes inmunocomprometidos (Pérez-Irezábal *et al.*, 2005).

2.2.2 Ubicación taxonómica de *Acanthamoeba*

En 2005, Adl y cols., propusieron una nueva clasificación taxonómica basada en un sistema jerárquico carente de rangos como: “clase”, “sub-clase”, “súper orden” u “orden”. En el 2012, se realizó una revisión de la clasificación propuesta por Adl y cols. en el 2005, en la cual se realizaron diversos cambios, tales como la eliminación de algunos grupos polifiléticos quedando de la siguiente manera (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Acanthamoeba* (Adl *et al.*, 2012).



2.2.3 Morfología y ciclo de vida de *Acanthamoeba*

Su ciclo biológico consta de dos estadios: una forma activa, con capacidad infecciosa y reproductora, que es el trofozoíto, y la forma latente, que es el quiste. El trofozoíto se alimenta de bacterias como *Mycobacterium* spp., cianobacterias tóxicas, *Pseudomonas* spp., *Legionella pneumophila*, *Burkholderia cepacia*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Aeromonas hydrophila* y *Vibrio cholera*, algas, levaduras y partículas orgánicas ambientales, las cuales son atraídas y envueltas por pseudópodos para después ser fagocitadas (en la córnea se piensa que se alimentan de queratocitos) (Benito *et al.*, 2018). La locomoción la realizan gracias a los acantopodios y se reproducen por fisión binaria (Oddó, 2006).

La formación del quiste ocurre bajo condiciones ambientales adversas, como la falta de alimento, desecación o cambios en la temperatura y pH. En estas condiciones, la amiba reduce drásticamente su actividad metabólica y así es capaz de sobrevivir a la acción de desinfectantes, antibióticos, cloración y bajas temperaturas, incluso la congelación, permaneciendo viables varios años a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Garaycochea *et al.*, 2008). Bajo condiciones ambientales apropiadas, los quistes de las amibas con potencial patógeno se transforman en trofozoítos, los cuales sintetizan enzimas que favorecen la penetración y destrucción tisular (Pérez-Irezábal *et al.*, 2005). Estas amibas se introducen al hospedero principalmente por la vía respiratoria alta y baja o por heridas (Fig. 1), viajan a través del torrente sanguíneo hasta llegar al sistema nervioso central (SNC) (Peralta-Rodríguez y Ayala-Oviedo, 2009).

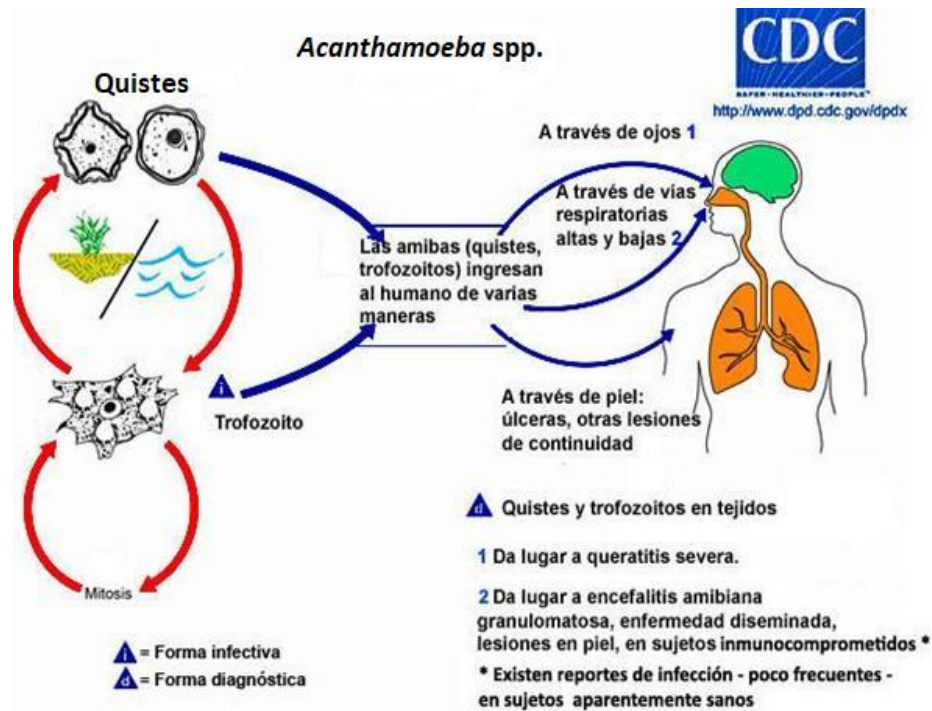


Figura 1. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. (CDC 2004).

2.2.4 Clasificación morfológica de las especies de *Acanthamoeba* mediante las características de su quiste

Pussard y Pons en 1977 propusieron una clasificación del género *Acanthamoeba* basada en las características morfológicas que adquieren los quistes, en esta clasificación se toma en cuenta el diámetro, el grosor del ectoquiste, el número de “brazos” y la forma que se adquiere el endoquiste (Fig.2), estos se asocian en tres grupos:

El **grupo I** se caracteriza por presentar quistes $\geq 18 \mu\text{m}$ de diámetro, el ectoquiste es redondo y el endoquiste estrellado (Fig.2a), las especies que se encuentran ubicadas en este grupo no son relevantes en el área médica ya que carece de representantes patógenos y no crecen a temperaturas mayores de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y difícilmente crecen en medios axénicos. Las especies que se ubican en el grupo son: *Acanthamoeba astronyxis*, *Acanthamoeba comandoni*, *Acanthamoeba echinulata*, *Acanthamoeba pearcei* y *Acanthamoeba tubiashi*.

El **grupo II** presenta un quiste ligeramente redondeado, un diámetro de hasta $<18\ \mu\text{m}$, el ectoquiste es irregular y el endoquiste puede estar estrellado o con formas poligonales con ángulos ligeramente marcados (Fig. 2b). En este grupo se encuentran las especies del género que tienen importancia médica. Las especies que lo conforman son: *Acanthamoeba polyphaga*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba rhyodes*, *Acanthamoeba mauritaniensis*, *Acanthamoeba lugdunensis*, *Acanthamoeba quitina*, *Acanthamoeba divionensis*, *Acanthamoeba hatchetti* y *Acanthamoeba triangularis*.

Por último, el **grupo III** (Fig. 2c) presenta un quiste irregular de $<18\ \mu\text{m}$ de diámetro, el ectoquiste es ligeramente irregular y el endoquiste presenta formas poligonales, este último grupo es más difícil de encontrarlo en la naturaleza. Las especies que se encuentran en el grupo son: *Acanthamoeba palestinensis*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba lenticulata*, *Acanthamoeba royreba* y *Acanthamoeba postulosa* (Robinson *et al.*, 1992).

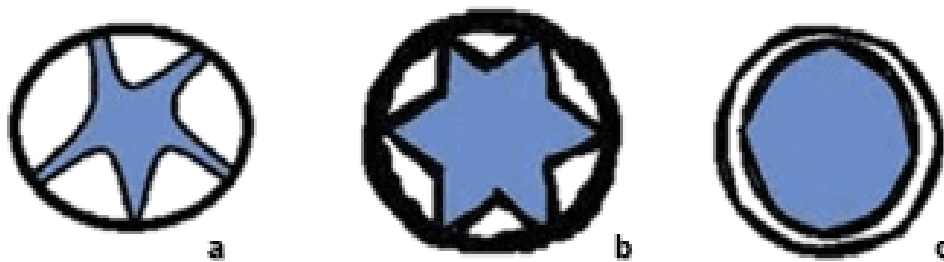


Figura 2. Clasificación morfológica de las características del quiste de *Acanthamoeba*. Grupo I (a), grupo II (b) y grupo III (c) (Tomado de Castrillón y Orozco, 2013).

2.2.5 Patologías causadas por *Acanthamoeba*

Los tipos de infecciones más comunes causadas por estos organismos incluyen la queratitis amibiana (QA), la encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) y la acantamebiosis cutánea (AC), causadas por *Acanthamoeba spp.* (Siddiqui, 2012).

2.2.5.1 Queratitis amebiana

La queratitis amebiana (QA) corresponde a un proceso inflamatorio crónico activo que afecta la córnea y a veces la conjuntiva y otras estructuras oculares, asociado en ocasiones al antecedente de un traumatismo corneal y la exposición a agua contaminada (Fig. 3), esta infección esta frecuentemente asociada con con *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini* y *A. polyphaga* (Oddó, 2006; Verani, 2009; Cárdenas, 2016; Omaña-Molina, 2018).

La infección progresa produciendo una ulceración de la córnea, de la que puede resultar ceguera en casos muy severos, el cuadro clínico en sus inicios se caracteriza por limbitis, queratopatía punteada, infiltrados epiteliales, subepiteliales o perineurales (Khan, 2009). El paciente sufre enrojecimiento, lagrimeo, fotofobia y dolor de diversa intensidad, pero desproporcionado respecto a los signos oculares, así como visión borrosa. Al progresar la enfermedad, puede observarse ulceración, infiltrados anulares, placas endoteliales y uveítis anterior, con o sin hipopión (presencia de pus en la cámara anterior del ojo), y más infrecuentemente, edema corneal (Cabello-Vilchez, 2015).

La QA es una enfermedad difícil de diagnosticar y tratar ya que las manifestaciones clínicas se confunden a menudo con las de la queratitis herpética, fúngica, bacteriana o viral, lo que provoca que el diagnóstico correcto y el comienzo del tratamiento se retrasen semanas o meses. La enfermedad se ha asociado en el 80 % de los casos al uso de lentes de contacto (limpieza incorrecta y/o almacenamiento inadecuado) por sujetos sanos e inmunocomprometidos, así como a su empleo durante la realización de deportes acuáticos y traumatismos corneales (Booton *et al.*, 2009).



Figura 3. Queratitis por *Acanthamoeba*.

2.2.5.2 Encefalitis amibiana granulomatosa

La encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) es provocada por diferentes especies de *Acanthamoeba*, dentro de las cuales se encuentran: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *Acanthamoeba hatchetii*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *Acanthamoeba royreba* y *A. triangularis* (Peralta-Rodríguez, Ayala-Oviedo, 2009; Villa, 2016). Esta es una afección que se presenta en el tejido cerebral, siendo los lóbulos temporales los más afectados con necrosis hemorrágica y edema (Castro, 2012).

Está descrito que la ruta de entrada de la amiba incluye el tracto respiratorio o vía hematogena por alguna lesión cutánea. La vía nasal lleva a la invasión de los vasos alveolares, seguido de la diseminación hematogena para atravesar la barrera hematoencefálica, logrando entrar al sistema nervioso central (SNC), aunque aún no se conoce totalmente el mecanismo de infección (Khan, 2009). Esto es provocado por la inhalación de aerosoles y polvo que contengan quistes o trofozoítos, principalmente afecta pacientes con enfermedad crónica y/o inmunocomprometidos (Fernández, 2015; Álvarez-Barrientos, 2016).

La EAG es una infección donde los síntomas y signos clínicos son variados, se caracteriza por cambios neurológicos debidos a un granuloma único o múltiple en

el cerebro; cambios en la personalidad, somnolencia, convulsiones, cefalea, fiebre esporádica, y rigidez de la nuca en la mayoría de los casos; la náusea, el vómito y la letargia pueden ser manifestaciones tempranas de la infección (Khan, 2009; Trabelsi *et al.*, 2012; Cabello-Vilchez, 2015). Algunos pacientes pueden presentar parálisis de los nervios craneales (principalmente en el III y VI), ataxia cerebral y coma. El diagnóstico se realiza por medio de la técnica indirecta de anticuerpos fluorescentes para detectar anticuerpos en el suero, además de la neuroimagen, biopsia del tejido afectado y el cultivo de la muestra para aislar el microorganismo (Castro-Artavia, 2015). A menudo la muerte se presenta por bronconeumonía (Dirección General de Epidemiología, 2012).

La familiaridad con el cuadro clínico es de gran importancia para un diagnóstico oportuno. Además del análisis de pruebas de laboratorio como el estudio del líquido cefalorraquídeo, tanto para determinar aumento de la concentración de proteínas y disminución de la concentración de glucosa, como para buscar formas ameboides (Retana-Moreira *et al.*, 2014).

2.2.5.3 Acantamebiosis cutánea

La acantamebiosis cutánea (AC) es una infección inusual oportunista de la piel producida por *Acanthamoeba polyphaga*, *A. castellanii*, y *A. culbertsoni*; puede ser por una lesión primaria de la piel o manifestación secundaria de una infección extracerebral diseminada, algunos casos son claramente primarios, también puede ocurrir una diseminación hematógena en un cuadro de EAG típico, con puerta de entrada en el tracto respiratorio inferior. En algunos casos las manifestaciones de la lesión cutánea anteceden a las de la invasión del SNC, la presencia de trofozoítos y quistes en las zonas dérmicas inflamadas (Cabello-Vilchez, 2015).

2.2.6 Epidemiología de la acantamebiosis

En el mundo se conocen cerca de 177 casos clínicos de EAG provocados por *Acanthamoeba* (Orrego-Puelles *et al.*, 2015), 300 casos de QA, mientras que el número de reportes para AC se desconoce (Galarza *et al.*, 2009).

En México se han reportado siete casos de queratitis amibiana y tres casos de EAG. Hasta el momento no se han realizado sondeos recientes para saber el número exacto de pacientes con alguno de estos padecimientos (Lares-Villa F. 2001; Lemus *et al.*, 2007; Omaña *et al.*, 2016).

Cabe mencionar que estas enfermedades son frecuentemente confundidas con otras patologías ya que presentan cuadros clínicos similares por lo tanto se emiten diagnósticos erróneos y se reporta la tasa de mortalidad con la enfermedad incorrecta.

III. ANTECEDENTES

El estudio del género *Acanthamoeba* tiene una gran importancia ecológica y médica ya que se han aislado de todo tipo de biotopos, diversos autores han reportado la presencia de este género en aguas con temperaturas elevadas como las aguas termales de uso recreativo.

3.1 Antecedentes mundiales

En 2002, Suárez y cols. realizaron un estudio mediante el cual determinaron la presencia de *Acanthamoeba* en fuentes de agua naturales y artificiales en la ciudad de Ica, al sur de Lima. Examinaron 31 muestras de siete fuentes de agua naturales (lagunas) y 25 artificiales (pozos, tanques para terapia de rehabilitación, reservorios y cisternas). Concluyendo que la presencia de organismos del género *Acanthamoeba* es más frecuente en fuentes de agua naturales, ya que en estas se aislaron seis especies y cinco de fuentes artificiales.

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

Ávila y cols. en 2006, determinaron la presencia de amibas de vida libre y la calidad microbiológica del agua del parque “Las Cocuizas” en Venezuela, observaron la presencia de formas parasitarias en 15 del total de las 30 muestras recolectadas. Los resultados arrojaron que existe el riesgo de contaminación por diversos microorganismos patógenos transmitidos por el agua y esto puede ser peligroso para los usuarios del parque.

En 2015 Fernández-Rodrigo, realizó una 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 para la salud pública. En este estudio reportó tres géneros potencialmente patógenos, entre los cuales destaca *Acanthamoeba* spp., por otra parte, realizó pruebas de termotolerancia y osmotolerancia, esto con el fin de comprobar la patogenicidad de las amibas encontradas.

Castro Artavia en 2015 aisló amibas de vida libre de género *Acanthamoeba*, los aislados obtenidos fueron sometidos a pruebas de termotolerancia y osmotolerancia para probar la patogenicidad de las especies encontradas, de los 21 aislados, el 100 % obtuvo un resultado positivo en la prueba de termotolerancia a 37 °C, solo el 87.5 % fue positivo a 40 °C, en el caso de la prueba de osmotolerancia el 100 %

de los aislados resultó positivo a la concentración de 0.5 M, mientras que en la concentración de 1 M solo el 90.5 % fue positivo.

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.

En 2016 Astorga realizó un estudio sobre la ecología de *Acanthamoeba* spp. del agua, suelo en Chile, en este estudio se compararon épocas del año, así como los biotopos en los cuales aisló amibas del género *Acanthamoeba*, también realizó pruebas de termotolerancia a los organismos amibianos.

Latifi y cols. en 2016, demostraron la presencia de *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, y *Naegleria* spp. en aguas termales de la provincia de Mazandrará 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.

Javanmard y cols. en 2017, realizaron el aislamiento e identificación de AVL en 80 muestras de agua municipal, termal y recreativa de Irán, de las cuales 16 fueron positivas para AVL y de éstas diez muestras con AVL potencialmente patógenas. Este estudio confirmó una mayor presencia de AVL potencialmente patógenas en sitios con alta actividad humana lo que incrementa el riesgo de adquirir alguna enfermedad causada por amibas patógenas.

3.2 Antecedentes en México

En México se han realizado los siguientes trabajos:

Rivera y cols. en 1993, estudiaron la presencia de AVL en albercas para fisioterapia en la Ciudad de México, en el que registraron al género *Acanthamoeba* como el más frecuente en las épocas de primavera y verano.

Gallegos-Neyra en 1997, realizó un estudio de amibas de vida libre potencialmente patógenas en cuerpos de agua de uso recreativo en el estado de San Luis Potosí, donde aisló cuatro especies pertenecientes al género *Acanthamoeba*, de las cuales dos especies presentaron potencial patógeno; *A. polyphaga* y *A. quina*.

En 2009 Lares-Jiménez y cols., realizaron el aislamiento de amibas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora, identificando morfológica y fisiológicamente 11 géneros de AVL en la región, sometiénolas a temperaturas elevadas y a pruebas de osmolaridad, entre otras.

Castro en 2012 aisló e identificó amibas de vida libre en albercas termales en Tecozautla, en el Estado de Hidalgo, obteniendo como resultado que el 72% de sus aislados fueron pertenecientes al género *Acanthamoeba*, las especies más frecuentes que identificó se encontraron: *A. castellanii* y *A. polyphaga*.

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

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

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

En 2015 Andrade aisló amibas de vida libre en ríos de la cuenca de valle México, en este estudio reportó que aisló tres especies de amibas con potencial patógeno de los géneros *Acanthamoeba* (*A. polyphaga* y *A. triangularis*) y *Naegleria* sp.

Mendoza-Romero en 2014 aisló e identificó amibas potencialmente patógenas del género *Acanthamoeba* del agua potable de la zona metropolitana del Valle de México reportando nueve especies pertenecientes al género: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhysodes*, *A. triangularis* y *Acanthamoeba* sp., concluyendo que la presencia de este género es una señal de alerta sobre la mala calidad del agua en esta zona ya que representa un riesgo potencial de adquirir enfermedades asociadas a estos especies.

En 2016 Álvarez-Barrientos realizó un estudio en el balneario natural “Hierve el Agua” en el municipio de San Lorenzo Albarradas, estado de Oaxaca, en el cual reportó nueve especies de amibas potencialmente patógenas; ocho pertenecientes al género *Acanthamoeba* y uno a *Naegleria*.

Esquivel-Solís en 2018 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. polyphaga* y *A. culbertsoni*.

En 2019 Hernández aisló amibas del género *Acanthamoeba* de aguas de albercas, del Estado de México (Tlalnepantla, Naucalpan de Juárez y Atizapán de Zaragoza), reportó que este fue el género que predominó en sus muestras, siendo *A. polyphaga* la especie que se aisló con mayor frecuencia.

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

Domínguez en 2019 identificó amibas de vida libre de tres biotopos diferentes; agua, sedimento y biopelículas, en las Grutas de Tolantongo, Hidalgo, México, obteniendo como resultado el aislamiento de seis géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria*,

Korotnnevella, *Rosculus*, *Saccamoeba* y *Vannella*, de los cuales dos han sido reportados con potencial patógeno; *Acanthamoeba* y *Naegleria*.

IV. JUSTIFICACIÓN

Se debe conocer la diversidad de *Acanthamoeba* spp. en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, ya que este género se encuentra ampliamente distribuido en diferentes tipos de cuerpos de agua y debido a las condiciones ambientales que presenta el balneario se considera un ambiente propicio para su crecimiento lo cual representan un riesgo potencial para la salud de los usuarios que llevan a cabo actividades recreativas y medicinales en este sistema. Asimismo, es importante conocer la diversidad de especies del género *Acanthamoeba* ya que estas amibas tienen una gran importancia ecológica y médica, además de que resisten temperaturas elevadas y cambios drásticos en su ambiente.

Es importante realizar muestreos en los parques recreativos, para cerciorarse que los cuerpos de agua de uso recreativo cuenten con las condiciones sanitarias necesarias para que los usuarios puedan prevenir algún tipo de enfermedad, tal como lo establece la NORMA Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas, donde se menciona que las albercas deben estar libres de AVLPP como lo son algunas especies del género *Acanthamoeba* y una del género *Naegleria*. Es por esto que se deben realizar campañas en las que se informe a los turistas del riesgo potencial en el que pueden poner su salud; debido a que estos protozoos potencialmente patógenos afectan principalmente a personas que se encuentran inmunosuprimidas, o con alguna herida en la piel, como pudiera ser bebés y adultos mayores.

V. OBJETIVOS

5.1.1 Objetivo general

- Determinar la presencia de *Acanthamoeba* spp. en aguas recreativas de “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

5.1.2 Objetivos particulares

- a. Aislar, cultivar e identificar amibas del género *Acanthamoeba* que se encuentran en los diferentes biotopos (agua, sedimento y biopelícula) ubicados en el balneario “Las Grutas de Tolantongo” Hidalgo, México.
- b. Determinar y comparar la riqueza específica del género *Acanthamoeba* obtenida por biotopo, por tipo de sistemas y época del año.
- c. Realizar pruebas de termotolerancia a los aislados de las especies obtenidas del género *Acanthamoeba*.
- d. Realizar pruebas de patogenicidad a los aislados de *Acanthamoeba*.
- e. Registrar y relacionar los parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, conductividad y pH) de los diferentes sitios muestreados durante las dos épocas del año (lluvias y sequia) que puedan estar relacionados con la presencia ausencia de los aislados del género *Acanthamoeba*.
- f. Emitir recomendaciones preventivas para los usuarios.

VI. ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio se encuentra al noroeste del estado de Hidalgo, entre los paralelos 20°37" de latitud norte y 99°07" longitud oeste, aproximadamente a 120 kilómetros de la capital. El balneario “Las Grutas de Tolantongo” (Fig.4), abarca los municipios de Cardonal, Thauhiltapa, Eloxochitlan y parte de Nicolás Flores, y está a 1,282 msnm. Este atractivo turístico queda comprendido dentro de la provincia fisiográfica de la Sierra Madre Oriental. Presenta dos tipos de clima predominante; semiárido y templado con lluvias en verano y templado y subhúmedo, con lluvias en invierno, con una temperatura anual de 16 °C y una precipitación pluvial media de 30 mm. 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 (Ramírez-Acevedo, 2009). Con una temperatura anual de 16 °C y una precipitación pluvial media de 430 milímetros. (Ramírez-Acevedo, 2009; INEGI, 2018).

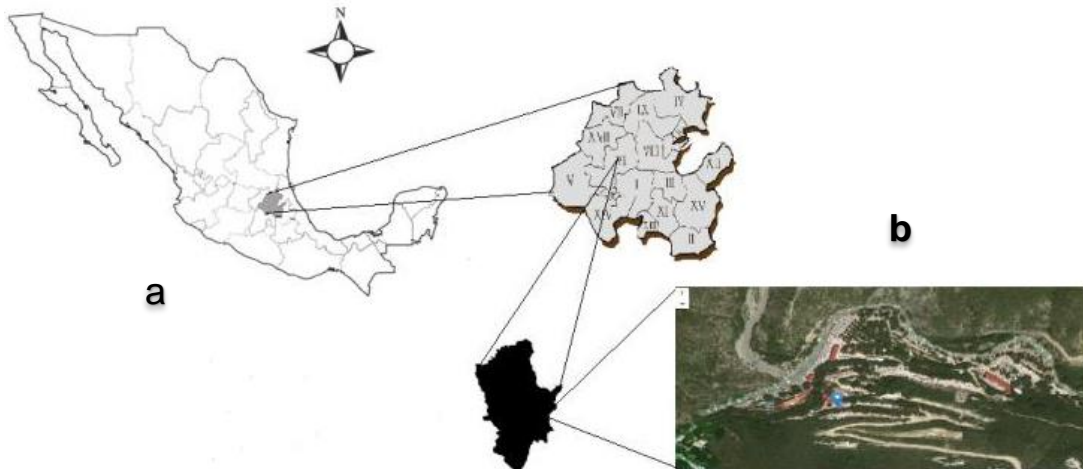


Figura 4. Ubicación geográfica del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, localización geográfica del municipio el Cardonal (a), imagen satelital del balneario (b).

6.1 Balneario “Las Grutas de Tolantongo”

El balneario “Las Grutas de Tolantongo” consta de dos grutas la principal que es de donde surge el río y la segunda llamada el túnel, el cual se encuentra situado unos metros más arriba de la gruta principal, el río Tolantongo abarca todo el ejido, este alimenta a las albercas y las pozas, las pozas principales se formaron naturalmente y algunas otras, al igual que las albercas, son artificiales. A la orilla del río hay una zona de camping donde los turistas pueden rentar casa de campaña y dormir en sus orillas (Fig. 5).



Figura 5. Zonas de muestreo en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México; cascada (a), gruta (b), río (c), pozas (d), alberca 1 (e), alberca 2 (f) y túnel (g).

6.1.1 Zonas de muestreo del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

6.1.1.1 Zona 1 “La 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 del agua de este balneario (INEGI, 2018). La caída de agua desemboca en el Río Tolantongo donde se mezclan con las aguas termales del balneario (Fig.6).



Figura 6. Cascada del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

6.1.1.2 Zona 2 “Gruta Principal”



Figura 7. Gruta del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México. Toma aérea (a), dentro de la Gruta (b).

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 (Fig.7).

6.1.1.3 Zona 3 “El Túnel”

Es conocida como “El Túnel”, comprende una pequeña gruta que se formó posteriormente por un derrumbe. 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 (Fig. 8).



Figura 8. Túnel del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

6.1.1.4 Zonas 4, 5 y 6 “El Río Tolantongo”



Figura 9. Río del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

Estas zonas se conocen como “El Río”, el agua que corre por el balneario está constituida por la mezcla del agua termal naciente de la gruta y del 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 (Fig. 9).

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

6.1.1.5 Zona 7 y 8 albercas “El Huamúchil” y “Paraíso Escondido”

Estas se encuentran constituidas por la alberca de mayor tamaño con un tobogán llamada “El Huamúchil” y una de menor tamaño llamada “El Paraíso Escondido” la cual cuenta con más usuarios debido a que presenta diferentes profundidades que van desde un chapoteadero hasta la zona de clavados (Fig.10 a y b). Para darle mantenimiento y limpieza a estas zonas, el flujo del agua es interrumpido por la tarde-noche y una vez concluido se procede a su llenado. Ambas albercas son alimentadas por las aguas termales nacientes de la zona 2.



Figura 10. Albercas del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México. Alberca “E Huamúchil” (a) y Alberca “El Paraíso Escondido”.

6.1.1.6 Zonas 9, 10, 11, 12, 13 y 14 “Las Pozas”



Figura 11. Pozas del balneario “Las Grutas de Tolantongo” Hidalgo, México.

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 con respecto de la otra. Del total de las pozas fueron seleccionadas seis diferentes dentro de las dos secciones que se encuentran en el balneario. Estas fueron seleccionadas

por la afluencia de turistas en cada una, a la altura que se encontraban y la distancia entre ellas (Fig.11).

La figura 12 es una imagen satelital del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, en esta se puede observar la distribución de cada una de las zonas de muestreo.



Figura 12. Zonas de muestreo del balneario “Las Grutas de Tolantongo”. Hidalgo, México. Imagen tomada de Google maps, 2019.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

El estudio se realizó en dos fases, la primera fue trabajo en campo y la segunda en laboratorio, a continuación, se describe los métodos que se usaron para cumplir con los objetivos anteriormente planteados.

7.1.1 TRABAJO EN CAMPO

Se realizaron dos recolectas en distintas épocas del año la primera en el mes de agosto del 2017 (época de lluvias) y la segunda en el mes de enero del 2018 (época de sequía) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

7.1.1.1 Recolecta y transporte de las muestras de agua, sedimento y biopelículas

La recolección de muestras de agua se realizó en frascos de plástico de boca ancha con volumen de 1L y en tubos de polipropileno de 50 ml, previamente esterilizados. Se tomaron un total de 56 muestras de agua de 750 ml cada una, a 10 cm de profundidad (dejando el espacio restante para la oxigenación de los organismos), fueron recolectadas en las partes más concurridas de los 12 cuerpos acuáticos. Las 29 muestras de sedimento y biopelícula se tomaron solo de los sistemas que contenían estos biotopos. Posteriormente las muestras fueron transportadas a temperatura ambiente al Laboratorio de Investigación en Patógenos Emergentes (LIPE) de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE) de la FES-Iztacala UNAM, para su posterior análisis.

7.1.1.2 Registro de parámetros fisicoquímicos del agua *in situ*

Se realizó el registro de los siguientes factores físicos y químicos del agua *in situ*: temperatura del agua (°C), pH y conductividad (mS/cm³). Los parámetros de temperatura, pH y conductividad fueron medidos con un medidor digital HANNA modelo HI 98129.

7.1.2 TRABAJO EN LABORATORIO

7.1.2.1 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) (medio sólido), placas con agar no nutritivo (NNE) con solución de Prescott-James (medio semi-sólido) y placas de seis pozos con solución Prescott-James (Medio líquido), todas adicionadas con una capa 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 solido se incubaron a 37 °C, en posición invertida, dentro de bolsas de plástico para evitar su desecación. Las placas cultivadas 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, se realizaron observaciones a las placas con un microscopio invertido. Detectado el crecimiento de las 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 mm²) en condiciones de esterilidad, para resembrar en una placa nueva (incubando a 37 °C).

7.1.2.2 Identificación morfológica de las amibas aisladas

Una vez detectado el crecimiento amebiano (trofozoítos y quistes) 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 por contraste de fases a 10, 20 y 40x (Nikon Eclipse TS100). Para la identificación taxonómica se observaron las características tanto del trofozoíto como del quiste para compararlas con las características morfológicas de acuerdo con las claves taxonómicas de Page, 1988 y Siemensma, 2019. Se procedió a tomar un registro fotográfico con la cámara (Nikon coolpix 990).

7.1.3 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, 1x10³ células de la amiba a ensayar. Posteriormente, dichas placas fueron incubadas a 30, 37, y 42

°C, observando el crecimiento del inoculo 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 que se obtuvieron los resultados, se volvieron a incubar las placas a 30 °C, tomando esta como la temperatura más favorable para el crecimiento de los organismos y poder 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).

7.1.4 Pruebas de patogenicidad

Para el estudio de la patogenicidad de AVL *in vitro*, se seleccionaron aquellas cepas que demostraron mayor capacidad de adaptación al aumento de la temperatura. De esta forma se demostró la capacidad patógena de las especies de *Acanthamoeba* que fueron aisladas de los biotopos de cada punto muestreado (Fernández-Rodrigo, 2015).

7.1.4.1 Prueba de osmotolerancia

Para comprobar la osmotolerancia de las cepas de AVLPP se prepararon placas en medio NNE con D-manitol de la marca SIGMA-ALDRICH, 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(1ml) 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 1×10^3 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).

7.1.5 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software Past versión 3.23 (2015). Se realizó un análisis de clúster por medio del índice de Jaccard para determinar la similitud entre especies encontradas en las zonas muestreadas. Para comparar las épocas de muestreo, se realizó un ANOSIM, Por último, se efectuó una escala multidimensional no métrica (non metric MDS) 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

8.1.1 Géneros y especies de AVL aisladas

En el estudio se obtuvieron un total de 85 muestras de las dos épocas muestreadas (sequía y lluvias), 56 fueron de agua, 25 de sedimento y cuatro de biopelículas. Se aislaron 15 especies pertenecientes a seis géneros; *Acanthamoeba*, *Korotnevella*, *Naegleria*, *Rosculus*, *Saccamoeba* y *Vannella* (Fig. 13-Cuadro 7, anexo 1). Los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* fueron los más frecuentes en las muestras, algunas especies pertenecientes a estos géneros han sido reportados como parásitos oportunistas ya que provocan enfermedades en humanos como la

meningoencefalitis amibiana primaria causada por *Naegleria fowleri*, la EAG, QA y AC causadas por diferentes especies de *Acanthamoeba* (Garaycochea *et al.*, 2008).

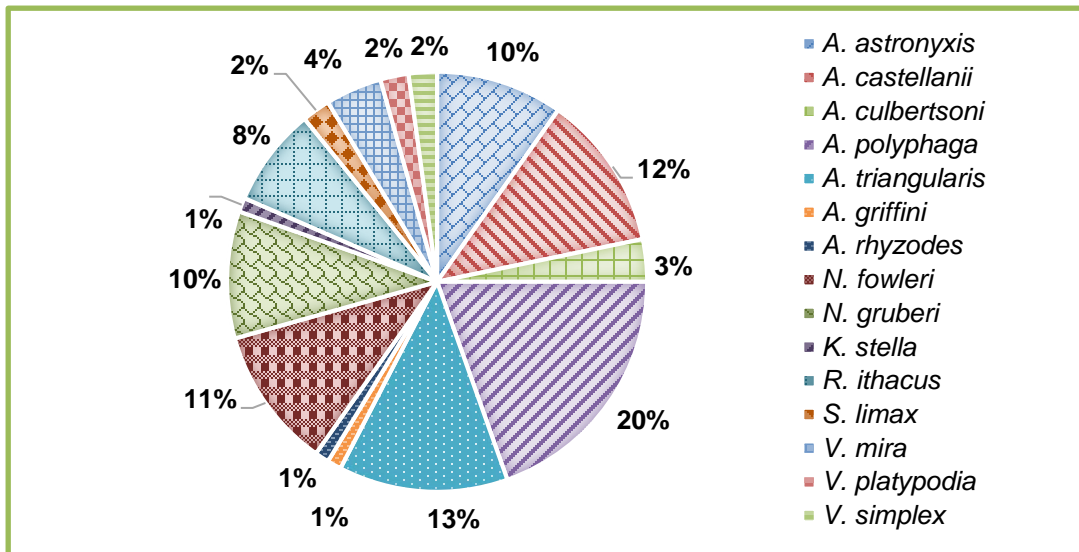


Figura 13. Porcentaje de aislados de AVL en las dos épocas muestreadas (sequía y lluvias) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

En 2012 Castro reportó cinco géneros de AVL; *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Leptomyxa*, *Naegleria* y *Vahlkampfia*, en el balneario “El Géiser”, de los cuales reportó con mayor frecuencia al género *Acanthamoeba* con el 72 %, seguido de *Naegleria* con 14 % y *Vahlkampfia* 9 %, este estudio coincide con el presente trabajo, ya que el género que se aisló con mayor frecuencia fue *Acanthamoeba*, además de que también se identificó al género *Naegleria*, esto podría deberse a que ambos balnearios son alimentados por aguas termales.

Carbal (2016) reporta que de las 54 muestras recolectadas en arrollo del municipio de Turbaco en el departamento de Bolívar-Colombia el género que se aisló con mayor frecuencia fue *Naegleria* seguido por *Acanthamoeba*.

En 2019 Hernández reportó cinco especies de amibas de vida libre pertenecientes a cuatro géneros aisladas de piscinas, de los cuales dos géneros corresponden a los identificados en el estudio (*Acanthamoeba* spp. y *Vannella* spp.).

8.1.2 Especies de *Acanthamoeba* aisladas

Se aislaron un total de siete especies del género *Acanthamoeba*, siendo *Acanthamoeba polyphaga* con un 38 % la especie más frecuentemente aislada ya que se encontró en las dos épocas muestreadas, mientras que *Acanthamoeba griffini* (1 %) y *Acanthamoeba rhyodes* (3 %) fueron las especies menos aisladas, es importante mencionar que *Acanthamoeba triangularis* (19 %) y *Acanthamoeba castellanii* (18 %) se aislaron en un porcentaje similar (Fig.14).

Todas las especies de *Acanthamoeba* tienen la capacidad de sobrevivir en distintos ambientes, esto debido a la capacidad de resistencia que presenta el quiste la cual les permite permanecer latentes por meses e inclusive años hasta que encuentren las condiciones óptimas para estar en fase trófica (Visvesvara, 2010).

Las especies de *Acanthamoeba* que se aislaron han sido reportadas como potencialmente patógenas para el humano, ya que provocan diversas enfermedades como la QA, EAG y AC (Robinson, 1997).

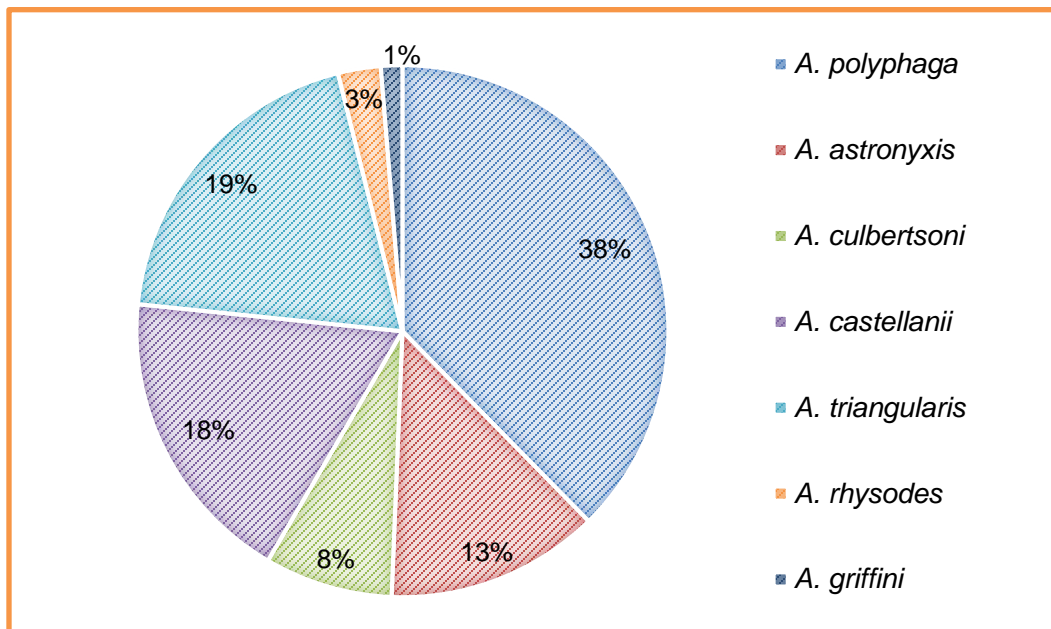


Figura 14. Riqueza específica de especies de *Acanthamoeba* aisladas en las dos épocas muestreadas (sequía y lluvias) en el balneario "Las Grutas de Tolantongo", Hidalgo, México.

Montalbano y colaboradores en 2015 en Italia aislaron 33.3 % de AVL de aguas termales, de las cuales el 17 % pertenecía al género *Acanthamoeba*. Mientras que en Taiwán se aisló el 21.2 % de *Acanthamoeba* spp. en aguas termales (Huang *et al.*, 2010), en el mismo país, pero en el 2013 en un estudio realizado por Kao y

colaboradores identificaron el 10.4 % de aislados pertenecientes al género *Acanthamoeba*, los cuales provenían de aguas termales.

Las especies de ALV encontradas concuerdan con el estudio realizado en aguas termales en el estado de Hidalgo por Rivera en 1988 en el cual se aislaron amibas de este género, siendo las especies más frecuentemente aisladas *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*.

En 2013 Al-Herrawy y colaboradores aislaron el 42 % de amibas del género *Acanthamoeba* en albercas del Cairo en Egipto. Astorga en 2016 en Chile identificó el 35 % de amibas del género *Acanthamoeba* en aguas provenientes de albercas.

Taméz en 2019 reportó el aislamiento de tres especies del género *Acanthamoeba* las cuales de acuerdo a la literatura son consideradas con potencial patógeno para los humanos, estas especies coinciden con las aisladas en el presente trabajo (*Acanthamoeba culbertsoni*, *A. polyphaga* y *A. triangularis*).

Es importante mencionar que la NORMA Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas.” Donde se establece que el agua para uso recreativo de albercas y otras fuentes artificiales deben estar libres de AVL, especialmente de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria fowleri*, esto con la finalidad de prevenir y minimizar riesgos a la salud por contacto e inhalación de estos organismos.

8.1.3 Catálogo de especies patógenas

La identificación de las especies se efectuó con base en las características morfológicas del quiste y trofozoíto de las claves de Page (1988) y Pussard y Pons (1997). La ubicación taxonómica está basada en la clasificación de Adl *et al.*, 2012

Cada especie de *Acanthamoeba* identificada se muestra con su descripción morfológica y fotografía, de algunas especies se muestran las dos fases (trófica y quística) de su ciclo vida. Además, se incluye un esquema donde se señalan los componentes morfológicos del quiste.

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

Quiste esférico, ectoquiste rugoso y endoquiste estrellado, todos los brazos del endoquiste están en contacto con el ectoquiste, presenta de siete a más de nueve brazos, el quiste mide entre 19.2 y 22 μm (Fig. 15).

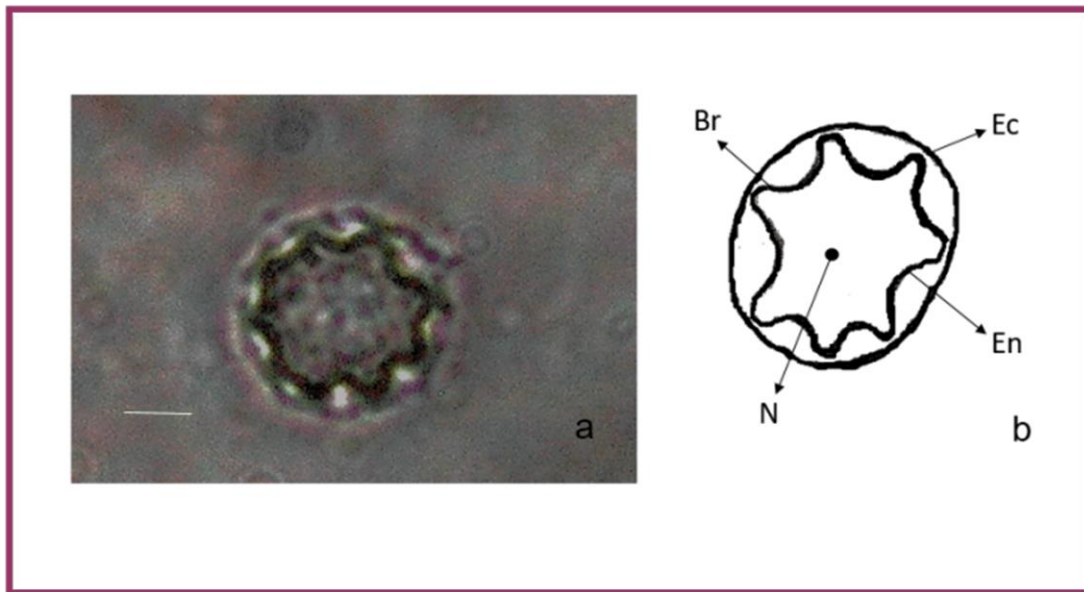


Figura 15. *Acanthamoeba astronyxis*. Fase quística (a), esquema del quiste (b): ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (n). Barra de escala 10 μm . 400X.

Acanthamoeba castellanii (Douglas, 1930) Volkonski, 19931

El quiste es usualmente redondeado, el ectoquiste es reticulado, grueso y muy rugoso, endoquiste poligonal o estrellado, conectado al ectoquiste por brazos cónicos no prominentes, presenta un intervalo de diámetro de 14 a 16 μm (Fig. 16).

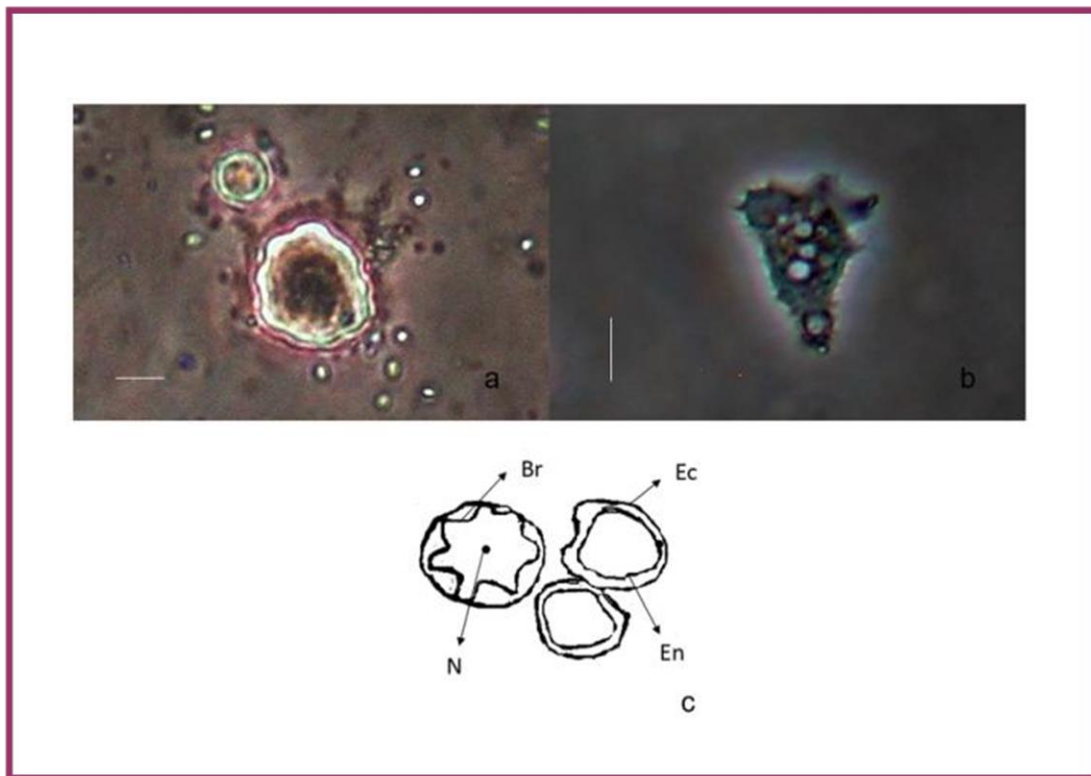


Figura 16. *Acanthamoeba castellanii*. Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10 μm . 400X.

Acanthamoeba culbertsoni (Singh y Das, 1970) Griffin, 1972

Quiste más o menos esférico, ectoquiste reticulado grueso y rugoso, endoquiste redondeado, y en ocasiones ligeramente poligonal pero nunca estrellado, el diámetro promedio del quiste es de 15 a 18 μm (Fig. 17).

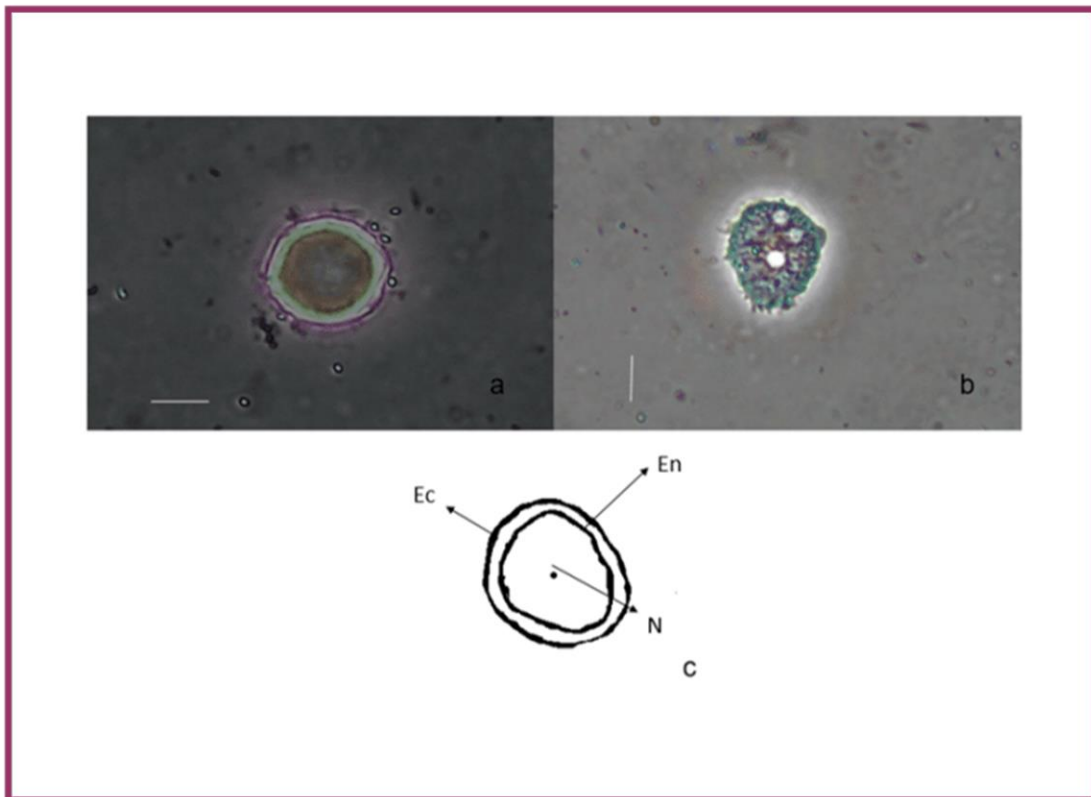


Figura 17. *Acanthamoeba culbertsoni*. Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10 μm . 400X.

Acanthamoeba griffini (Sawyer, 1971)

Quiste redondeado, un ectoquiste ondulado con forma de engranes, casi siempre cercano al endoquiste, este último puede ser ovoide o esférico, algunas veces estelado, puede o no tener hasta seis brazos cortos bien desarrollados, el diámetro del quiste tiene un promedio de 15 μm (Fig.18).

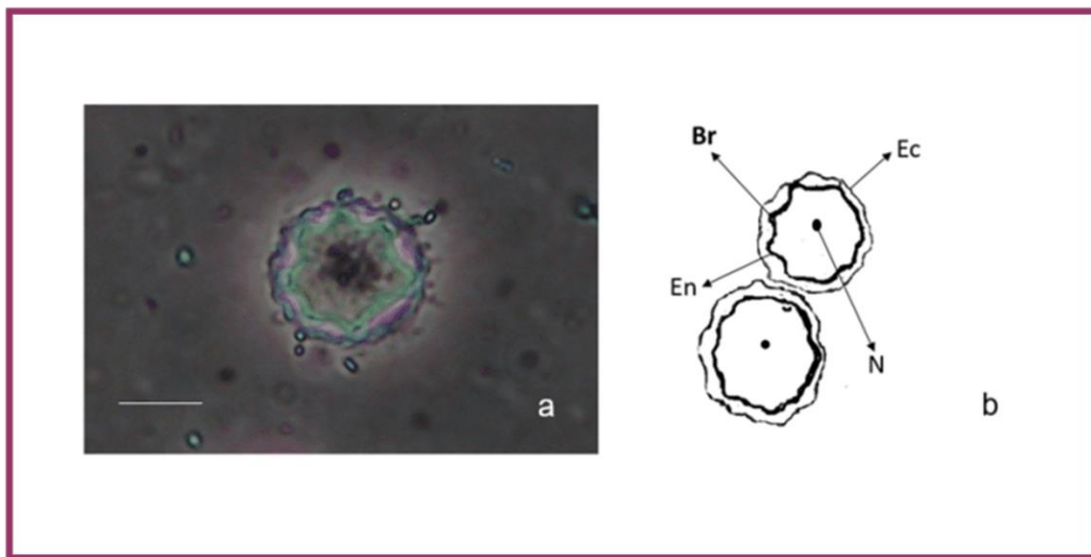


Figura 18. *Acanthamoeba griffini*. Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10 μm . 400X.

Acanthamoeba polyphaga (Puschkarew, 1913) Volkonski, 1931

Esta especie se caracteriza por tener un quiste usualmente redondeado, el ectoquiste está muy separado del endoquiste y es delgado, el endoquiste es muy irregular, nunca estelado, pero puede adoptar formas poligonales, presenta de cuatro a seis brazos, el diámetro promedio del quiste es de 14 μm (Fig. 19).

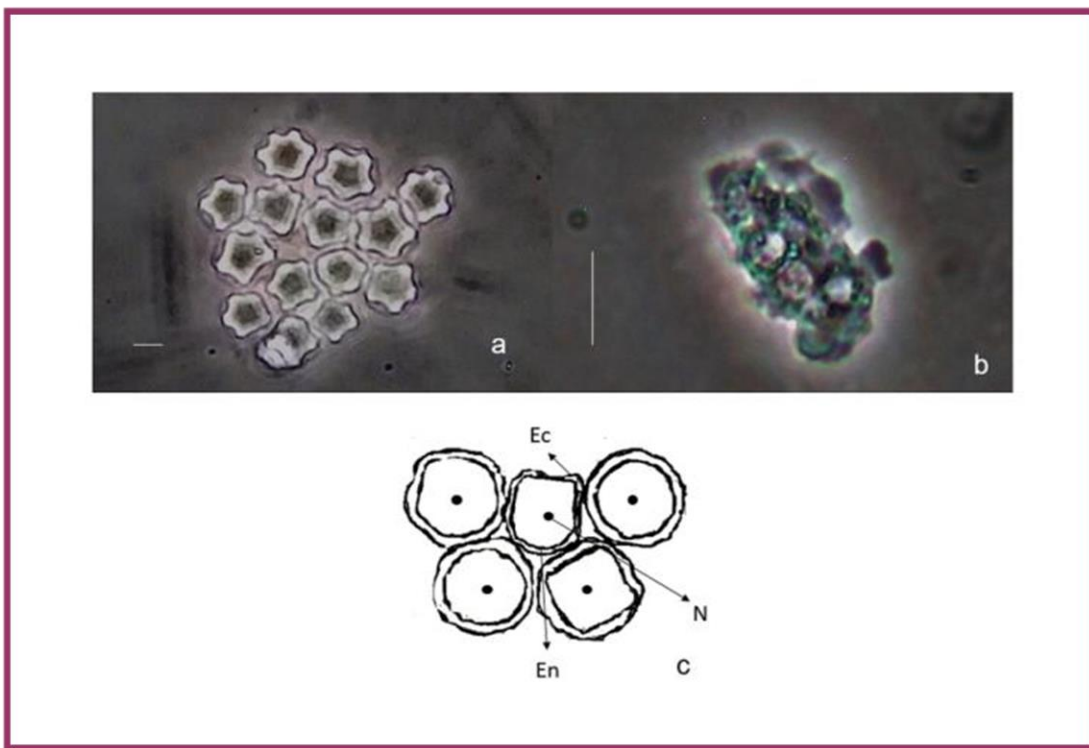


Figura 19. *Acanthamoeba polyphaga*. Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10 μm . 400X.

Acanthamoeba rhyssodes (Singh, 1952) Griffin, 1972

Presenta un quiste generalmente redondeado, el ectoquiste es pseudoreticulado, el endoquiste presenta brazos cónicos o tubulares, pocos son estelados o tienen forma de engrane, presenta de siete a ocho brazos, el diámetro promedio del quiste es de 18 μm (Fig. 20).

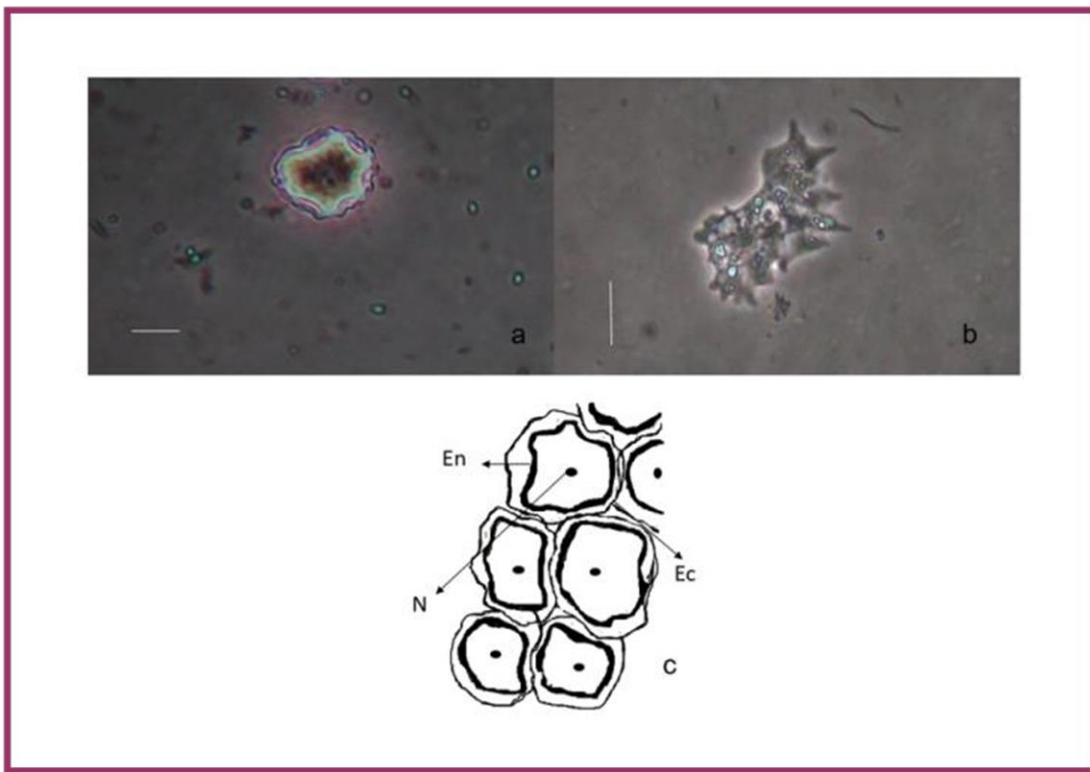


Figura 20. *Acanthamoeba rhyssodes*. Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10 μm . 400X.

Acanthamoeba triangularis (Pussard y Pons, 1977)

Quiste usualmente irregular y redondeado, ectoquiste ovoide o esférico, endoquiste triangular, aunque a veces puede ser cuadrado, presenta brazos, raramente cuatro, el intervalo del diámetro del quiste es de 12 a 13 μm (Fig. 21).

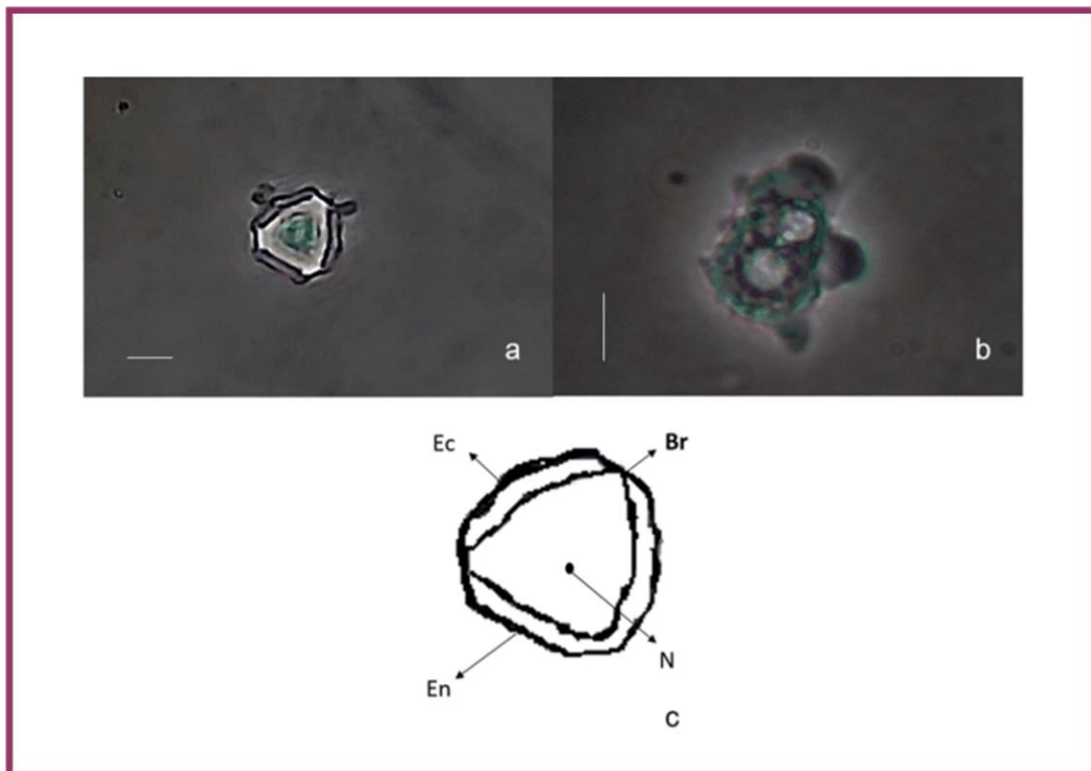


Figura 21. *Acanthamoeba triangularis*. Fase quística (a), fase trófica (b), esquema del quiste (c); ectoquiste (Ec), endoquiste (En) y núcleo (N). Barra de escala 10 μm . 400X.

8.1.4.1 Comparación de zonas de muestreo

De las 14 zonas muestreadas en las dos épocas del año (lluvias y sequía) solo 11 fueron positivas para la presencia de *Acanthamoeba* en el primer muestreo (época de lluvias). La zona con mayor frecuencia de aislados de *Acanthamoeba* spp. fue la zona cuatro (15 aislados), seguida de la cinco (diez aislados) y la seis (nueve aislados), estas zonas comprenden el río (Fig. 22). Esto es posible debido a que las características fisicoquímicas que se encuentran en esta zona son las óptimas para que estos organismos puedan sobrevivir (Loret y Greub, 2010; Siddiqui y Khan, 2012), esto además podría deberse a que el agua se encuentra en constante movimiento (Carbal, 2016), ya que Castillo y colaboradores (2011) mencionan que la presencia/ausencia de amibas de vida libre se ve influenciada por la recirculación del agua, la acumulación de sustancias orgánicas y la frecuencia con que acuden las personas a este sitio. Como se puede observar en la figura 22 en el segundo muestreo (época de sequía) solo en seis zonas se encontró la presencia de *Acanthamoeba* spp., la zona con un número mayor de aislados fue la cuatro con un total de siete especies de *Acanthamoeba*, en tanto las zonas con menos aislados fueron la uno y la ocho.

Es importante mencionar que en las zonas 12,13 y 14 (pozas) no se encontró ninguna especie perteneciente al género estudiado en las dos épocas muestreadas. Esto, probablemente se debe a que como son sistemas artificiales, el agua recibe un tratamiento especial para el uso turístico; sin embargo, en las demás zonas que también son artificiales (7-11) se aislaron especies de *Acanthamoeba*, por lo tanto, es importante realizar más estudios para saber si hay algún factor físico o químico que tenga un impacto en la presencia o ausencia de organismos amibianos.

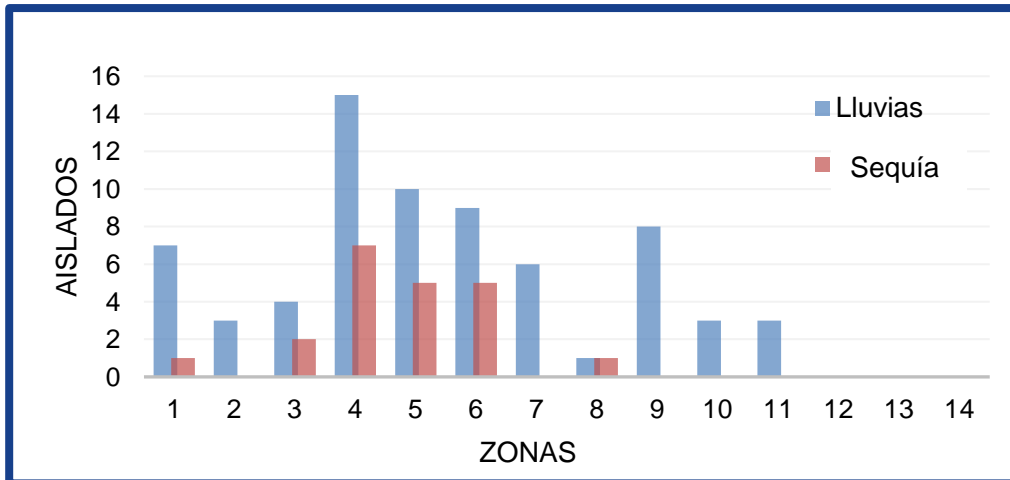


Figura 22. Comparación de frecuencia de *Acanthamoeba* por época del año (lluvias y sequía) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

Taméz en 2019 reportó tres especies del género *Acanthamoeba*, aisladas de Laguna Larga Michoacán, estas especies son similares a las que se aislaron en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, las cuales son *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* y *A. triangularis*

8.1.4.2 Comparación de aislados de *Acanthamoeba* spp. por biotopos y épocas del año.

Se recolectaron muestras de tres biotopos diferentes; agua, sedimento y biopelícula de las dos épocas muestreadas (lluvias y sequía). En el primer muestreo el biotopo con mayor riqueza de especies de *Acanthamoeba* fue el agua, seguida de la biopelícula y el sedimento. Es importante resaltar que no en todas las zonas se recolectaron los tres biotopos, ya que en algunos casos como las albercas (zona 7 y 8) y las pozas (zonas 10, 11, 12, 13 y 14) solo se recolectó agua, esto se debe probablemente a que son sistemas artificiales y reciben un tratamiento diferentes a las primeras zonas, las únicas pozas donde se logró obtener biopelícula pertenecen a la zona 9 y 11; en la primera (Z9) se logró identificar seis especies pertenecientes al género *Acanthamoeba* en el biotopo agua y dos en biopelícula, mientras que en la segunda (Z11) sólo en el biotopo biopelícula, se aisló un total de tres organismos (Fig. 23). Cabe destacar que las biopelículas están formadas principalmente de polisacáridos, lo cual le confiere a estos organismos protección contra

depredadores y amortiguan cambios de pH, temperatura, osmolaridad entre otros factores fisicoquímicos (Kokare *et al.*, 2009; Thomas *et al.*, 2009 y Chang *et al.*, 2010).

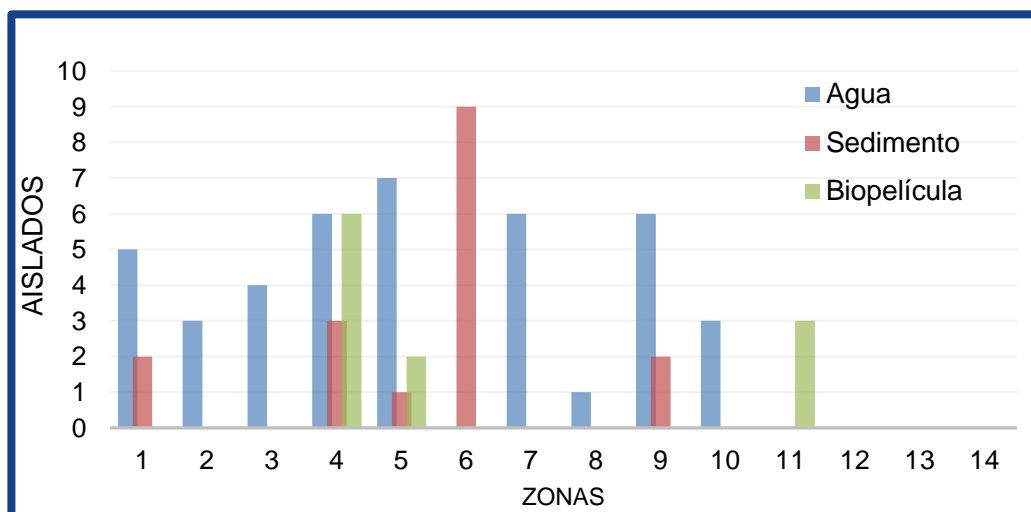


Figura 23. Abundancia de *Acanthamoeba* por biotopo en la época de lluvias en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

En el segundo muestreo se identificó una mayor abundancia de especies de *Acanthamoeba* en el biotopo agua, seguido de la biopelícula, sin embargo, en el sedimento no se encontró ninguna especie de *Acanthamoeba*, mientras que al igual que en el primer muestreo, no se obtuvieron los tres biotopos en todas las zonas de muestreo, especialmente de la zona siete a la nueve (Fig. 24), esto puede deberse a que son sitios que constantemente son saneados.

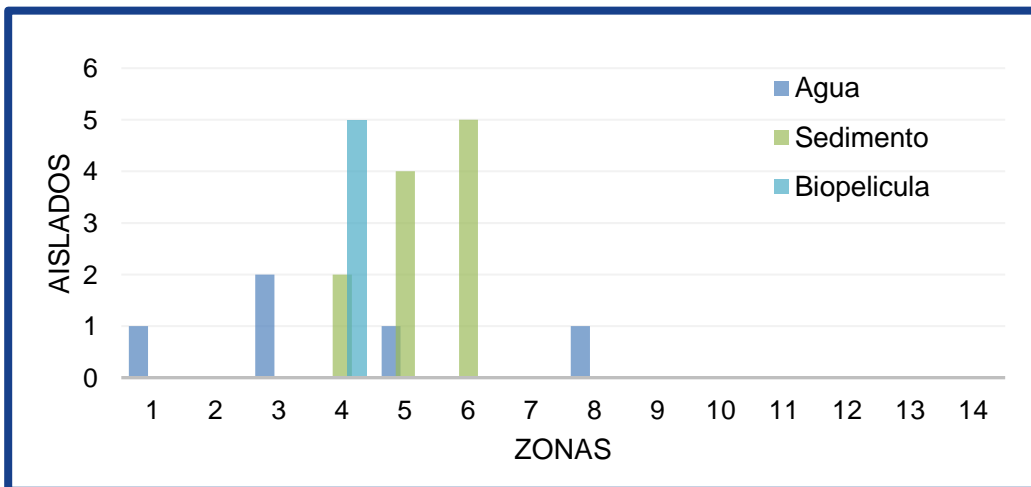


Figura 24. Abundancia de *Acanthamoeba* por biotopos en la época de sequía en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

En la figura 24 al igual de lo que se observa en la figura 23, las zonas con más aislados amibianos son de la zona tres-cinco, esto debido a que son sistemas que están conectados naturalmente y el agua que los abastece no pasa por ningún tratamiento previo para uso recreativo, mientras que las zonas de la 7 a la 14, son sistemas artificiales que aunque se abastece del agua corriente de la gruta y el río debe tener un tratamiento especial, esto se encuentra establecido en la NOM-245-SSA1-2010 en la cual se advierte que estos sistemas artificiales como lo son las albercas deben estar libres de AVL, especialmente de los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria fowleri*,

Astorga en 2016 aisló amibas del género *Acanthamoeba* de tres diferentes biotopos (agua, suelo y vegetales). Del 100 % de AVL reportadas el 68 % de los aislados perteneció al biotopo agua, el 19 % al biotopo suelo y el 13 % al biotopo vegetales, esto es semejante al presente estudio, ya que el biotopo que obtuvo un mayor porcentaje de aislados amibianos fue el agua, seguido por el sedimento y por ultimo las biopelículas.

Por otra parte, es importante mencionar que las épocas del año en las que se realizó el muestreo influyeron en la presencia/ausencia de amibas del género *Acanthamoeba* ya que la época con mayor porcentaje de aislados fue la época de lluvias (Fig.24), esto concuerda con Taméz en 2019, quien aisló especies del género *Acanthamoeba* en la época de lluvias, mientras que en la época de sequía no reportó aislados pertenecientes al género. Por otra parte, Ramírez y cols. en 2014 reportaron que no tuvieron diferencias significativas entre las épocas del año muestreadas (lluvias y sequía) para la obtención de aislados amibianos.

Astorga en 2016 realizó un estudio ecológico del género *Acanthamoeba* en Chile, en el cual obtuvo que las épocas del año con un mayor porcentaje de prevalencia de este género fue el verano con el 27 % de los aislados, seguida por la primavera con el 18 %, mientras que en otoño e invierno obtuvo el 11 % de aislados positivos en cada época, estos resultados son similares al presente estudio, ya que la época en la que se obtuvieron más aislados amibianos fue en la de lluvias 77 % (verano-otoño en Chile)

Estudios similares que se han realizado en España, pero en plantas de tratamiento de agua potable y residual, muestran que la época del año en la cual se presenta un mayor porcentaje de aislados amibianos del género *Acanthamoeba* es en primavera, seguida por verano, otoño e invierno (Magnet *et al.*, 2013). En Taiwán Tzeng k, y colaboradores en 2013 reportan que la época en la cual aislaron un mayor número de amibas del género *Acanthamoeba* fue otoño con un 28.3 % seguida por el invierno con un 21.7 % y primavera con un 8.3 %.

Como se puede apreciar en la figura 25 los porcentajes de aislados del género *Acanthamoeba* son completamente diferentes, sin embargo esto también puede atribuirse a que en la época de lluvias había más usuarios en el balneario, mientras que en la época de sequía el índice de usuarios disminuyó, de esta manera los administradores del balneario podían realizar con mayor frecuencia un lavado de las albercas así como una buena cloración para evitar la proliferación de organismos con potencial patógeno, especialmente de amibas del género *Acanthamoeba*. En 2010 Gertiser en Buenos Aires, Argentina atribuyó la presencia/ausencia de amibas a la concurrencia de los usuarios ya que hubo un mayor número de aislados al igual que usuarios en la época de invierno-primavera, mientras que verano-otoño la cantidad de usuarios disminuyó al igual que la cantidad de aislados amibianos.

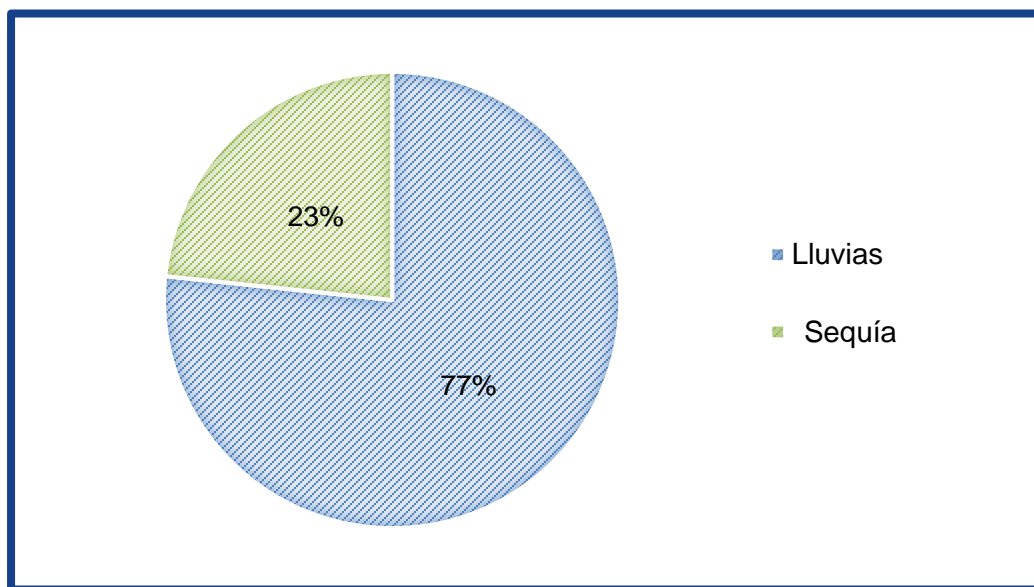


Figura 25. Porcentaje de aislados de *Acanthamoeba* por épocas (lluvias y sequía) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

Muchesa y cols. en 2014 en Sudáfrica reportaron que la época que presentó un mayor índice de aislados fue en otoño con un porcentaje de 51.2, seguida por el verano con 2.3 % mientras que, en el caso de primavera e invierno, no se reportó ningún aislado amibiano. Por otra parte, en estudios realizados por Magnet y cols. en 2012, reportó que el mayor porcentaje de aislados que obtuvo fue en invierno con el 100 % mientras que en la época de primavera obtuvo el 89.3 %.

8.1.5 Termotolerancia

En los cuadros 3 y 4 se puede observar que los aislados seleccionados que fueron sometidos a esta prueba dieron positivo, estos resultados obtenidos concuerdan con los de Tsvetkova y cols. (2004), los cuales arrojaron que hubo crecimiento amibiano en temperaturas de más de 45 °C de aquellos aislados amibianos que se encontraban en albercas al aire libre.

La tolerancia a la temperatura mayor a 35 °C de los aislados indica que podrían tener un potencial patógeno (Lorenzo-Morales *et al.*, 2005), ya que se ha demostrado que los aislados clínicos presentan una tolerancia a la temperatura mayor de 35 °C (Walochnik *et al.*, 2000).

Cuadro 3. Prueba de tolerancia a la temperatura de los aislados de *Acanthamoeba* en la época de lluvia.

Época de lluvias	32 °C			37 °C			42 °C		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Aislamiento									
<i>A. astronyxis</i> Z1 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Z1 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Z1 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Z2 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. astronyxis</i> Z2 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Z4 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. astronyxis</i> Z4 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Z6 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. triangularis</i> Z5 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. astronyxis</i> Z13 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Z13 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. astronyxis</i> Z3 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Aislado positivo (+) y negativo (-), agua (A) y biopelícula (B).

En Egipto Al-Herrawy y colaboradores (2013) incubaron amibas del género *Acanthamoeba* a 40 °C, obteniendo como resultado que el 56 % de los aislados del Río Nilo, el 58.6 % aislados del agua del grifo y el 49.2 % de los aislados de agua de albercas, sobrevivieron a esta temperatura. En Hungría fueron reportados nueve especies del género *Acanthamoeba* aisladas de albercas, las cuales fueron sometidas a temperaturas de 25, 30, 36 y 42 °C, las primeras tres temperaturas (25, 30 y 36 °C) resultaron las adecuadas para su desarrollo. Sin embargo, el crecimiento disminuyó a 42 °C (Kiss *et al.*, 2014).

Cuadro 4. Prueba de tolerancia a la temperatura de los aislados de *Acanthamoeba* en la época de sequía.

Época de sequía	32 °C			37 °C			42 °C		
Aislamiento	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>A. polyphaga</i> Z1 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Z2 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. triangularis</i> Z2 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Z4 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Z4 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Z4 S	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Z13 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Z13 B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. rhyodes</i> Z7 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Z7 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. polyphaga</i> Z7 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Z7 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Aislado positivo (+) y negativo (-), agua (A) y biopelícula (B).

En 2012 en Irán, Solgi y cols. incubaron amibas del género *Acanthamoeba* a 30, 37 y 42 °C durante 30 días, el 100 % de los aislados creció a 30 °C, el 92 % creció a 37 °C y el 67 % a 42 °C. Por otra parte, un estudio realizado en Polonia demostró que las especies de *Acanthamoeba* que se aislaron del agua, solo el 10 % se adaptó a la temperatura de 42 °C luego de 72 horas, comparado con lo que se reporta en el presente estudio, las especies de *Acanthamoeba* que se aislaron encontraron un

ambiente idóneo para su desarrollo, ya que la temperatura más alta a la que fueron sometidas fue de 42 °C.

También se han realizado estudios, donde se muestra que las especies de *Acanthamoeba* que presentan potencial patógeno para el humano pueden sobrevivir a temperaturas mayores a 50 °C inclusive hay algunas que han logrado adaptarse hasta los 60 °C (Astorga, 2016). En 2012, Ozcelik y cols. en Turquía, sometieron amibas aisladas de muestras de agua a temperaturas de 37, 42 y 52 °C durante dos días, demostrando que las AVL pueden sobrevivir a temperaturas de hasta 42 °C mientras que las especies del género *Acanthamoeba* fueron las únicas capaces de sobrevivir a temperaturas de 52 °C. En el mismo año en Turquía, Coskun y cols. demostraron el crecimiento de seis especies de *Acanthamoeba* a la temperatura de 52 °C.

8.1.6 Pruebas de patogenicidad

Se realizaron pruebas de patogenicidad (osmotolerancia) a los aislados de *Acanthamoeba* spp. (Lorenzo-Morales *et al.*, 2013), esto con la finalidad de probar si los organismos encontrados presentan potencial patógeno, ya que, de acuerdo a la identificación taxonómica, se encuentran dentro del grupo de las amibas con potencial patógeno (Robinson *et al.*, 1992). Cabe mencionar que estas pruebas no son suficientes para asegurar que estas especies son patógenas, ya que es necesario realizar otro tipo de estudios como pruebas moleculares, y pruebas con modelos murinos para comprobar la patogenicidad de estas especies (Marciano-Cabral y Cabral, 2003; Caumo *et al.*, 2011; Magnet *et al.*, 2012) para saber con exactitud si son potencialmente causantes de enfermedades en humanos.

8.1.6.1 Osmotolerancia

En el cuadro 5 se puede observar que el crecimiento de los organismos se vio afectado por las concentraciones de manitol a las que fueron sometidos los aislados seleccionados, de estos solo algunas especies como *A. astronyxis* y *A. polyphaga* tuvieron crecimiento a las 24, 48 y 72 horas en la concentración de 0.5 M, mientras

que en la concentración de 1 M solo una especie (*A. polyphaga*) creció a las 72 horas, por otra parte se observa que las especies que no tuvieron crecimiento a ninguna concentración fueron; *A. astronyxis* la cual fue aisladas de la zona 2 y 4 y *A. triangularis* aislada de la zona 5.

Cuadro 5. Evaluación del crecimiento de *Acanthamoeba* en presencia de manitol a diferentes concentraciones.

Época de lluvias	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
Aislados									
<i>A. astronyxis</i> Z1 A	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Z1 A	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Z1 A	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Z2 A	+	+	+	-	+	+	-	-	+
<i>A. astronyxis</i> Z2 A	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Z5 A	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. astronyxis</i> Z5 B	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Z7 B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>A. triangularis</i> Z6 S	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. astronyxis</i> Z13 B	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Z13 B	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. astronyxis</i> Z1 A	+	+	+	+	+	+	-	-	-

Aislado positivo (+) y negativo (-), agua (A) y biopelícula (B).

En el cuadro 6 se observa que solo *A. polyphaga* aislada de la zona 4 la época de sequía fue positivo a las dos concentraciones a las que fue sometida. Mientras que *A. castellanii* aislada de la misma zona no mostró crecimiento en ninguna concentración. *Acanthamoeba polyphaga* (aislada de la zona 1 y 4) y *A. castellanii* (aislada de la zona 7) fueron las únicas especies que crecieron en las dos concentraciones (0.5 y 1 M), pero solo *A. polyphaga* fue capaz de soportar el cambio y adaptarse a la segunda concentración (1M).

Cuadro 6. Evaluación del crecimiento de *Acanthamoeba* en presencia de manitol a diferentes concentraciones.

Época de sequía	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
Aislamiento									
<i>A. polyphaga</i> Z1 A	+	+	+	+	+	+	-	+	+
<i>A. castellanii</i> Z2 S	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>A. triangularis</i> Z2 S	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Z4 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. castellanii</i> Z4 B	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. castellanii</i> Z4 S	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Z13 A	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. castellanii</i> Z13 B	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>A. rhyodes</i> Z7 A	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. castellanii</i> Z7 A	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. polyphaga</i> Z7 A	+	+	+	-	+	+	-	-	-
<i>A. castellanii</i> Z7 A	+	+	+	-	-	+	-	-	+

Aislado positivo (+) y negativo (-), agua (A) y biopelícula (B).

Khan y cols. en 2001, realizaron una comparación de aislados ambientales y clínicos. En este estudio, sometieron a los organismos a diferentes concentraciones de manitol, en el cual demostraron que los aislados ambientales son muy poco resistentes a la prueba, ya que del 100 %, solo el 43 % de los organismos, fue capaz de adaptarse y crecer en las concentraciones de manitol a las que fueron sometidos, esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio ya que del 100 % de los organismos seleccionados para la prueba, solo el 38 % logró adaptarse a las concentraciones sometidas y crecer. Por otra parte, se ha relacionado que las especies que resisten una concentración de manitol mayor a 1 M presentan una mayor patogenicidad (Walochnik *et al.*, 2000; Khant *et al.*, 2002; Lorenzo-Morales *et al.*, 2005). La osmotolerancia indica la capacidad de las cepas de adaptación a los tejidos (Khan y Tereen, 2003) y algunos estudios relacionan estos condicionantes fisiológicos con la virulencia de las cepas ambientales y clínicas (Gianinazzi *et al.*, 2010). La capacidad patógena de *Acanthamoeba* es multifactorial y la capacidad de adaptación a la osmolaridad protectora que supone las lágrimas del ojo, favorece la citotoxicidad, aunque existen

otros factores como la capacidad de las amibas de producir proteasas, que favorece la invasión a las células del epitelio corneal (Fernández-Rodrigo, 2015).

La prueba de osmotolerancia indica que las amibas del género *Acanthamoeba* que fueron aisladas, presentan características especiales que le permiten adaptarse a nuevos medios, lo cual puede inferir que probablemente tengan potencial patógeno (Geisen *et al.*, 2004), sin embargo, es necesario realizar más pruebas para comprobar el potencial patógeno de estas especies aisladas del balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

8.1.7 Parámetros físicos y químicos del agua

Durante el muestreo se realizó la medición de algunos parámetros físicos y químicos del agua como la temperatura, el pH y la conductividad, esto para saber algunas condiciones ambientales en las que se encuentra tanto el balneario como los organismos amibianos aislados.

Se ha demostrado que las especies de AVL con potencial patógeno pueden sobrevivir a diferentes medios, especialmente el género *Acanthamoeba*, ya que la fase quística le confiere cualidades especiales para poder sobrevivir en diferentes ambientes y en condiciones adversas (Trabelsi *et al.*, 2012).

8.1.7.1. Temperatura del agua

Las especies de *Acanthamoeba* son organismos termotolerantes, es decir; que pueden soportar elevadas temperaturas (Castrillón, 2013). La temperatura a la cual fueron aisladas las especies podría inferir que los aislados son organismos con potencial patógeno (Rohr *et al.*, 1998; Todero *et al.*, 2011), por lo tanto, la temperatura podría ser un factor importante para que estos organismos estuvieran presentes en el balneario. Sin embargo, en la época de lluvias, fue donde más organismos aislados hubo.

La temperatura del balneario osciló entre los 26 y 35 °C para ambos muestreos (Fig. 26), el registro más bajo fue entre 22 y 27 °C el cual se presentó en la cascada (zona 1), mientras que el registro más alto fue tomado de la zona 2 (gruta) y esta osciló entre los 32 y 35 °C en ambos muestreos, estas cifras se encuentran dentro del ámbito de tolerancia adecuado para estos organismos, en el caso de AVL presentan una tolerancia que va de los 4 a los 35 °C, este ámbito es el ideal para que estos organismos estén presentes en el agua (De Jonckheere, 1984). Cabe destacar que balneario es alimentado por el agua naciente de la gruta principal, es por lo que la temperatura reportada como la más alta fue de 35 °C en la época de sequía esta se obtuvo en la gruta, caso contrario a la época de lluvias ya que la temperatura más alta que se reportó fue de 34 °C la cual se obtuvo en la zona de las pozas (Fig. 26).

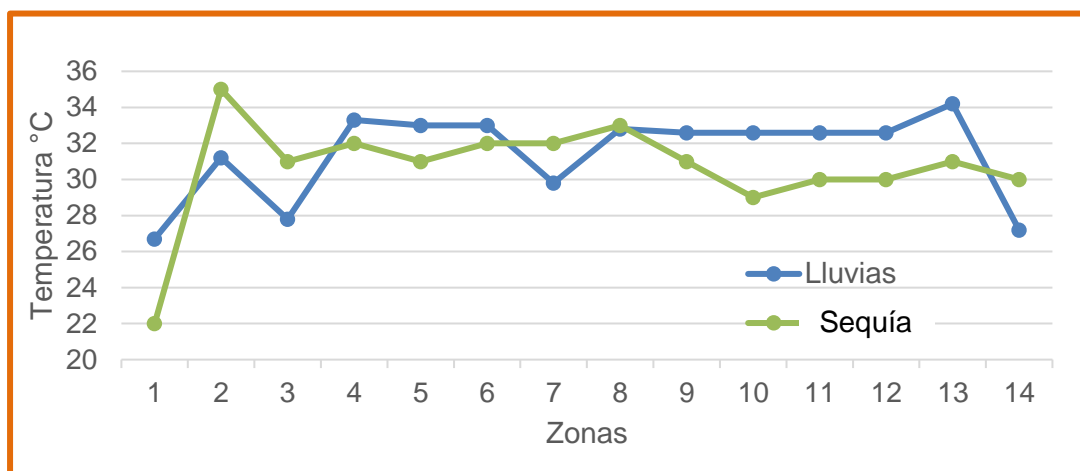


Figura 26. Variación espacial de los valores de temperatura en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, en ambas épocas del muestreo.

Otros trabajos sobre AVL realizados en aguas con temperaturas elevadas mencionan la presencia de estas amibas, Álvarez-Barrientos (2016) en “Hierve el agua”, Oaxaca, reportó por primera vez amibas del género *Acanthamoeba* con potencial patógeno dentro de las cuales se encontró: *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes* y *A. triangularis* en este sitio de aguas recreativas.

Taméz en 2018 realizó un estudio en “Laguna Larga” en el estado de Michoacán, reportó que en la época de lluvias obtuvo la mayor temperatura del agua, la cual fluctuó entre 26 y 46 °C y en la época de sequía la temperatura estuvo entre 26 y 36 °C, en el presente trabajo la temperatura en la época de lluvias osciló entre los 27 y 34 °C mientras que en la época de sequía la temperatura del agua se encontró entre los 22 y 35 °C, la temperatura del agua solo varió por un grado, sin embargo en este caso la época de sequía fue en la que se obtuvieron tanto la temperatura más baja como la más alta.

8.1.7.2 pH del agua

En el estudio se pudo observar que el pH del agua fluctuó entre 8.4 y 9.7 en las dos épocas muestreadas (Fig. 27), por lo cual los valores obtenidos están dentro del ámbito que soportan las amibas, el cual oscila desde 4.6 hasta 9.5 (Kyle y Noblet, 1986).

En la figura 11 se puede observar que en la época de lluvias el valor más bajo que se registró se obtuvo en la zona 12 (pozas) el cual fue de 8.3 y el más alto se registró en la última de las pozas muestreadas (zona 14) el cual fue de 9.2, mientras que en la época de sequía los valores más altos oscilaron entre 9.7 y 9.72, los cuales se registraron en la zona 1 (cascada) y en la zona 4 (nacimiento del río), el valor más bajo se registró en la zona 2 (gruta) el cual fue de 8.9. Los valores registrados indican que el pH del balneario es alcalino, esto puede deberse a que la composición de las rocas que conforman el sedimento del balneario es de carbonatos y bicarbonatos.

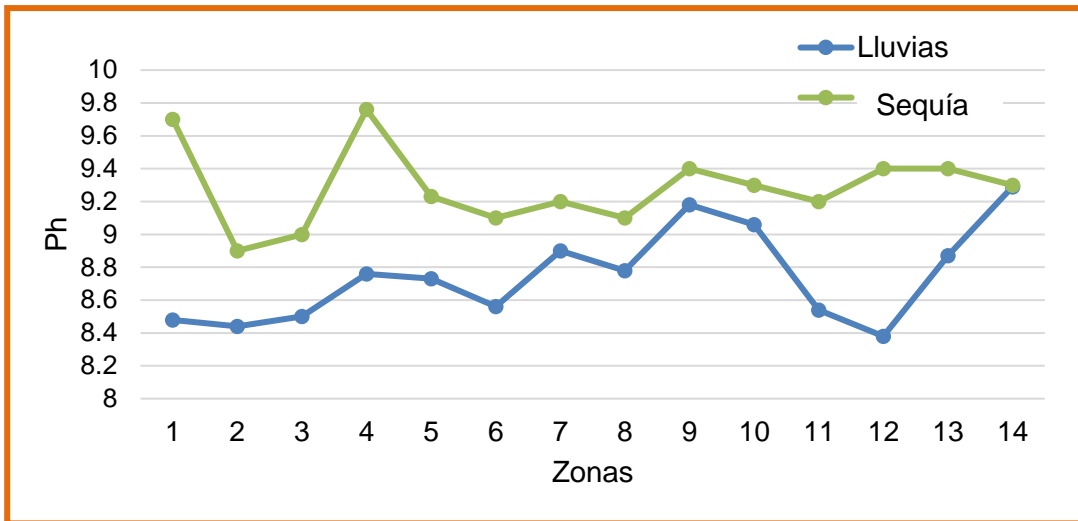


Figura 27. Variación espacial de los valores de pH en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, en ambas épocas del muestreo.

Estos resultados comparados con los de Andrade en 2015, el cual aisló amibas de vida libre en ríos de la cuenca de México, reporta que el pH se mantuvo en los ámbitos de neutralidad ya que los valores más bajos que obtuvo en su muestreo fueron de 6.6 y el más alto es de 7.7 en los ríos, mientras que en el presente trabajo el pH fluctuó más hacia la alcalinidad, esto se puede atribuir a la composición de las rocas arrastradas por el río.

La mayoría de los trabajos de amibas de vida libre reportan que el pH se mantiene en los niveles óptimos para que las amibas de vida libre puedan sobrevivir a estas condiciones y se encuentren presentes en el agua sin que afecte su ciclo de vida.

Taméz en 2019 reportó que las condiciones de pH que se encontraron en el balneario “Laguna Larga” en el estado de Michoacán, no afectaron la presencia ausencia de las amibas de vida libre, los valores de pH fueron ácidos, estos oscilaron entre los 3.3 y los 4.75 en las dos épocas (lluvias y sequía).

Hernández en 2019 quien aisló amibas de vida libre en albercas del estado de México reportó que los valores que obtuvo en el muestreo oscilaron entre 3.6 y 8.5, al valor más bajo que fue de 3.6 adjudica que este puede ser el motivo por el cual no obtuvo presencia de organismos, comparado con el presente trabajo realizado

en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México tiene mayor semejanza en cuanto a los valores de pH obtenidos, sin embargo no se puede asegurar que este parámetro fisicoquímico sea la causa por la cual en algunas zonas de muestreo no se encontraron especies de *Acanthamoeba*.

8.1.7.3 Conductividad del agua

En cuanto a la conductividad del agua se puede decir que no fue un factor limitante para determinar la presencia o ausencia de los organismos, pues estos parámetros también se encuentran dentro del ámbito tolerado por las AVL ya que la conductividad soportada por las amibas va desde 0.02 a 1.55 mS/cm (Visvesvara, 2010). En la figura 28 se puede observar que en la época de lluvias (muestreo 1) el valor más bajo se presentó en la zona 1 (la cascada) el cuál fue de 1.04 mS/cm, mientras que los valores más altos se registraron en las zonas 8, 9 y 13 (alberca, y pozas) los cuales presentaron una conductividad de 1.16 mS/cm. En la época de sequía el valor más bajo que se registró fue de 1.05 mS/cm en la zona 6, seguido de la zona 1 y 10 (cascada y pozas) con una conductividad de 1.09 mS/cm, mientras que el registro más alto fue de 1.15 mS/cm en la zona 2 (gruta).

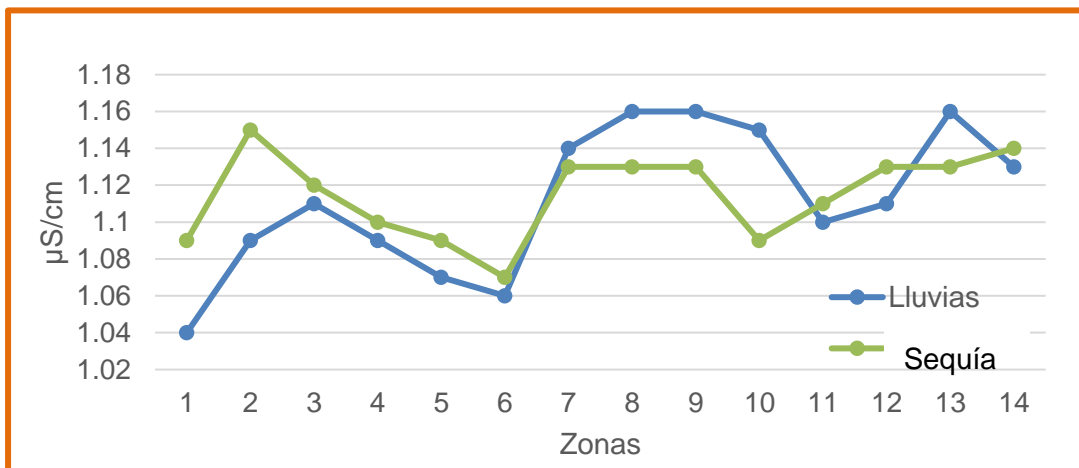


Figura 28. Variación espacial de los valores de conductividad en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México, en ambas épocas del muestreo.

Bonilla y cols. en 2014 reportan valores de conductividad bajos los cuales no afectaron directamente a la presencia/ausencia de amibas de vida libre, estos valores oscilaron entre 75 y 76 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Por otra parte, en 2015 Andrade reportó valores que oscilaron entre 441 y 77 $\mu\text{S cm}^{-1}$ en este trabajo aisló amibas de vida libre en ríos de la Cuenca de México, mientras que Taméz en 2019 reporta que los valores encontrados oscilaron entre 3.47 y 3.65 $\mu\text{s/cm}$ los cuales no influyeron en la presencia/ausencia de amibas de vida libre.

8.1.8 Análisis estadísticos

Los análisis se efectuaron para conocer las similitudes entre los sitios con base en la presencia-ausencia de las especies y para establecer si hubo diferencias significativas en las variables ambientales entre las dos épocas.

8.1.8.1. Índice de Jaccard

En la figura 29 se puede observar que la similitud entre las zonas de muestreo (época de lluvias) se dividió en dos grupos principales; en el primer grupo la mayor similitud existe entre las zonas 1 (cascada), 3 (túnel), 4 (nacimiento del río) y 9 (pozas), esto puede atribuirse a que las primeras 3 zonas muestreadas se encontraban cercanas, y a que el agua de la cascada cae al río y esta corre por las demás zonas.

En el segundo grupo la mayor similitud se encuentra entre la zona 6 (final del río) y la zona 10 (pozas), esto puede ser debido a que el agua del río alimenta a las pozas y esta misma es desechada en el río. Los grupos mostrados por el clúster nos indican que en estos sitios de muestreo se encontraron organismos de la misma especie.

Cabe destacar que las zonas que no tuvieron similitud fueron dos: la alberca 2 (zona 8) y la zona 13 (pozas), pudiera atribuirse que las zonas de muestreo además de estar lejanas, el agua recibe un tratamiento diferente, ya que el agua de las albercas

es clorada y se desecha en el río, mientras que el agua que llega a las pozas no recibe ningún tratamiento.

El estadístico presenta un coeficiente de correlación de 0.88, esto entra dentro del ámbito aceptable para que el análisis sea estadísticamente significativo, esto quiere decir que la similitud entre las muestras tiene un 0.88 de confianza.

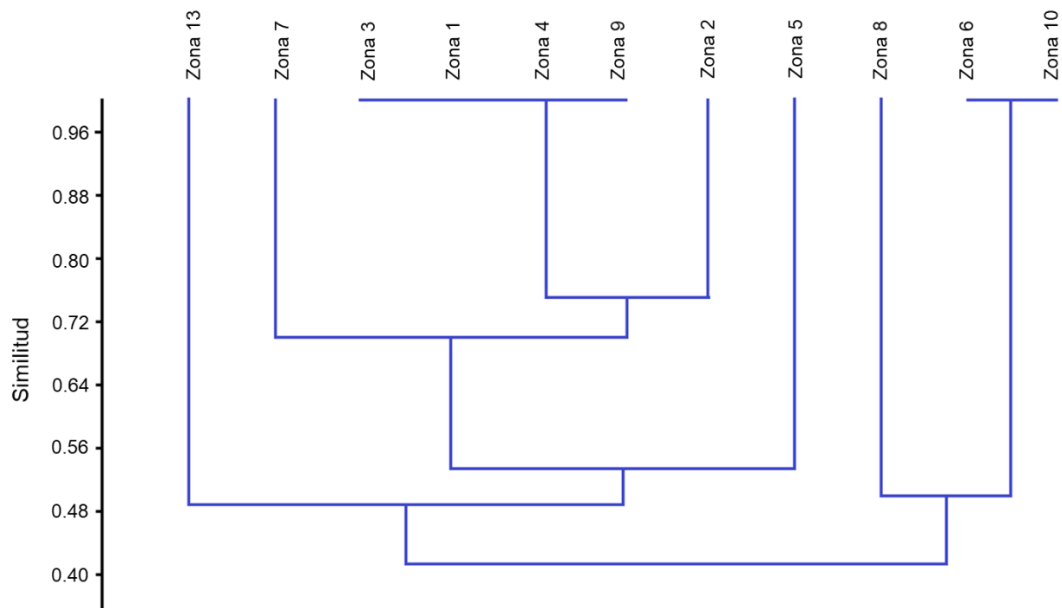


Figura 29. Clúster clásico de la época de lluvias, coeficiente de correlación de 0.88, realizado con el software Past versión 3.3.

Al igual que para el primer muestreo, en la época de sequía se realizó un clúster clásico por medio del índice de Jaccard (Fig. 30), en este se puede observar que la similitud de especies entre las zonas muestreadas se dividió en dos grupos principales, en el primer grupo se puede apreciar que las zonas con mayor similitud son la 4 (nacimiento del río) y la 6 (fin del río), mientras que en el segundo grupo se puede observar que la zona 1 (cascada) es la única que no presenta similitud con alguna otra zona de muestreo.

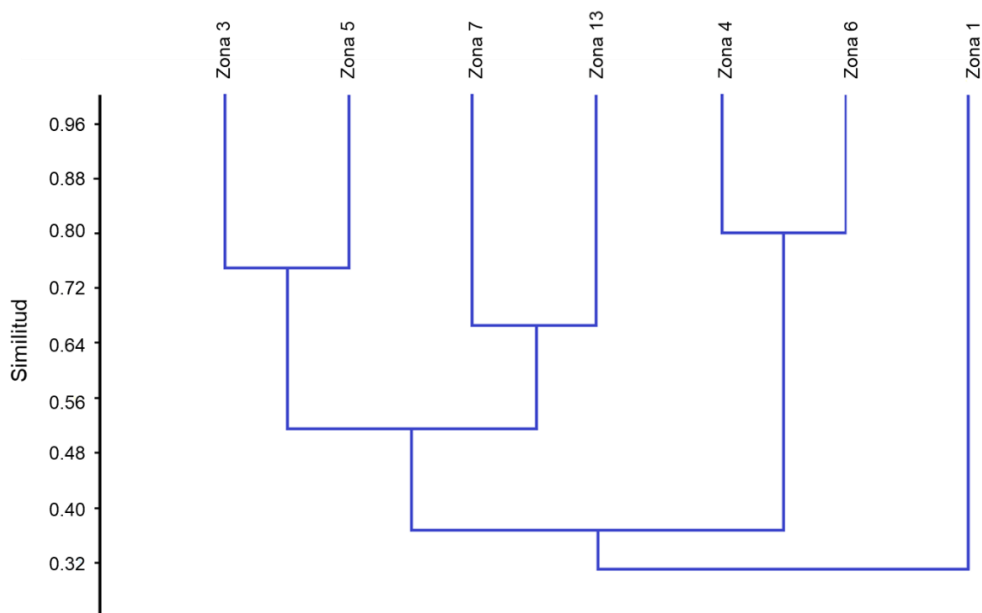


Figura 30. Clúster clásico de la época de sequía, presenta un coeficiente de correlación de 0.80, realizado con el software Past versión 3.3.

Álvarez-Barrientos (2016) realizó análisis estadísticos para probar si había similitud entre las muestras donde aisló amibas de vida libre, por medio del índice de Jaccard, el cual dio como resultado para la época de lluvias que el valor más alto que se alcanzó en cuanto a la similitud entre las muestras fue de 1, en el segundo muestreo (sequía) las similitud entre las muestras fluctuaron entre 0.7 y 1. En 2018 Taméz realizó un clúster con ayuda del índice de Jaccard en este comparó la similitud que existen entre los sitios muestreados, obteniendo como resultados que solo dos albercas presentaron una similitud del 70 % mientras que las demás albercas solo presentaban una similitud del 40 % en cuanto a las especies de amibas de vida libre que encontró en cada sitio. En ambos trabajos reportan que los factores fisicoquímicos no influenciaron en la similitud de las muestras ni de los sitios muestreados al igual que en el presente trabajo.

8.8.2 Análisis de similitudes (ANOSIM)

El ANOSIM se realizó con ayuda del software Past versión 3.3, con la finalidad de saber que tanta diferencia hay entre cada época muestreada (época de lluvias y sequía)

Cuadro 7. ANOSIM, comparación de las dos épocas muestreadas (lluvias y sequía) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

ANOSIM	
Permutación N:	9999
Rango medio dentro de:	81.58
Rango medio entre:	90.17
R:	0.1005
P (igual):	0.1028

El análisis indica que para que haya diferencias entre los muestreos R debe ser menor a 0.05, en este estadístico se puede observar que $R = 0.1005$ lo cual indica que no hay diferencia significativa entre cada muestreo (cuadro 7), este análisis también sirve para corroborar los resultados obtenidos con el clúster el cual indicó que no existió gran similitud entre los sitios muestreados, ya que las especies aisladas fueron las mismas para ambas épocas del año en las que se realizaron los muestreos.

8.8.3 Escalamiento multidimensional no métrico

En la figura 31 se puede observar que no hay una relación entre las variables ambientales medidas y las especies de *Acanthamoeba* encontradas en los muestreos, esto no quiere decir que los factores no influyen en la presencia o ausencia de estos organismos en el balneario, ya que otros estudios han demostrado que las condiciones ideales para que estas especies de amibas potencialmente patógenas puedan estar presentes en este tipo de sistemas. Cabe mencionar que se debió tomar en cuenta más factores físicos y químicos del agua para obtener una mejor correlación con las especies encontradas.

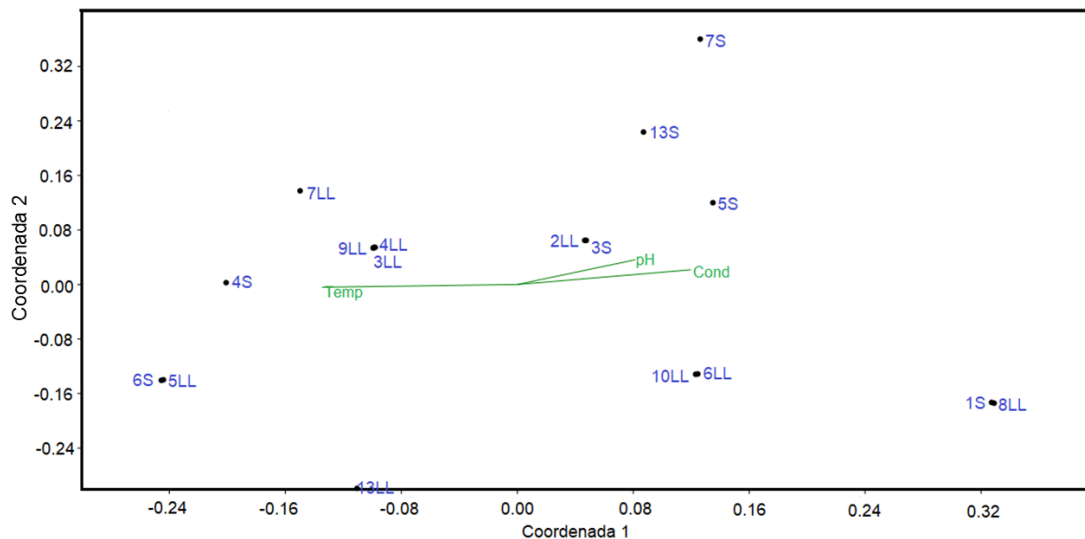


Figura 31. Escalamiento multidimensional no métrico de los parámetros físicos y químicos del agua del balneario "Las Grutas de Tolantongo", Hidalgo, México.

IX. CONCLUSIONES

1. Se aislaron un total de 15 especies de AVL pertenecientes a seis géneros; *Acanthamoeba*, *Korotnevella*, *Naegleria*, *Rosculus*, *Saccamoeba* y *Vannella*.
2. Se aislaron un total de siete especies pertenecientes al género *Acanthamoeba*; *A. astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. griffini*, *A. polyphaga*, *A. rhyssodes* y *A. triangularis*, las cuales, han sido reportadas con potencial patógeno.
3. Las especies más frecuentemente aisladas en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México fueron: *A. polyphaga*, *A. triangularis* y *A. castellanii*.
4. La época del año con más aislados de *Acanthamoeba* fue la época de lluvias, la zona que presentó mayor número de aislados de *Acanthamoeba* fue el río y el biotopo con un mayor número de organismos del género fue el agua con el 80 % de los aislados.
5. Las especies del género *Acanthamoeba* que se aislaron dieron positivo a la prueba de termotolerancia mientras que solo algunas especies como: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. astronyxis* y *A. triangularis* dieron positivo a la prueba de osmotolerancia.
6. Las variables ambientales estuvieron en los ámbitos adecuados que se han reportado para el crecimiento de estos organismos.
7. El balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México en las albercas no cumple con las medidas sanitarias necesarias que indica la NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas y que contempla como requisito la ausencia de amibas patógenas”.
8. En México no se cuenta con índices epidemiológicos actualizados de alguna infección causada por *Acanthamoeba* spp. como lo es QA, EAG y AC.

X. RECOMENDACIONES

1. Informar a la administración del balneario que las albercas y las pozas no presentan las condiciones sanitarias adecuadas que especifica la NORMA Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas”, ya que se aislaron amibas de vida libre con potencial patógeno y esto pone en riesgo tanto a los usuarios como a los trabajadores del balneario.
2. La administración del lugar podría colocar carteles que cuenten con la información necesaria sobre amibas de vida libre.
3. Emitir recomendaciones a los usuarios para que puedan prevenir alguna infección causada por estas amibas u otro organismo con potencial patógeno.
4. Realizar más pruebas de patogenicidad para saber si las amibas del género *Acanthamoeba* que se aislaron son potencialmente patógenas.

XI. LITERATURA CITADA

- 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. 2005. The new higher-level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protist. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52 (5): 399-451.
- Adl S., Simpson A. G., Lane C., Lukes J., Bass D., Bowser S., Brown M., Burky F., Durthorn M., Hampl V., Heiss A., Hoppenrath, Lara, Gall, Lynn, McManus, Mitchell, Mozley-Stanridge, Parfrey, Pawlowski, Rueckert, Shadwick, Schoch, Smirnov y Spiegel F. 2012. The revised classification of eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 59: 429-514.
- Ahmad Karamati, S., Niyayati, M., Lorenzo-Morales, J. y Lasjerdi, Z. 2016. Isolation and molecular characterization of *Acanthamoeba* genotypes isolated from soil sources of public and recreational areas in Iran. *Acta Parasitológica*, 61(4)784-789.
- Al-Herrawy, A., Bahgat, M., Mohammed, A., Ashour, A. y Hikal, W. 2014. *Acanthamoeba* species in Swimming Pools of Cairo, *Egypt Iranian Journal Parasitology*, 9(2): 194-201.
- Álvarez-Barrientos, J. L. 2016. *Detección de Amibas Patógenas de Vida Libre en el Balneario Natural "Hierva el Agua" en el Municipio de San Lorenzo Albarradas, Estado de Oaxaca*. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM, México. 80p.
- Andrade, M., Carrasco, Ma., Ortiz, R., Ibarra, Ma., Carmona, J., y Bonilla, P. 2015. Amibas de vida libre y potencialmente patógenas de ríos de la Cuenca de México. *Tendencias de Investigación en Limnología Tropical*, 115-122.
- Astorga, B. 2016. *Ecología de Acanthamoeba spp. en Chile: Identificación Fenotípica y Genotípica en Agua, Suelo y Vegetales*. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. Chile. 281p.

- Ávila, I., Rodríguez de G, M, Álvarez, O. y Briceño, 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.
- Benito, M., La Plante, D., Fernández, M T., Miguel, N., Lasheras, A M.,Gómez, J., Ormad, M P., Rubio, E. y Goñi, M P. 2018. Amebas de vida libre en aguas residuales y fangos: Su papel como reservorio natural de bacterias potencialmente patógenas. *Revista de Salud Ambiental*, 18(1): 69-77.
- 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., Joslin, E., Shoff, M., Tu, E., Kelly, D. y Fuerst, P. 2009. Genotypic identification of *Acanthamoeba* sp. isolates associated with an outbreak of *Acanthamoeba* keratitis (AK). *Cornea*, 28(6): 673–676.
- Cabello-Vilchez, M. 2015. *Acanthamoeba* spp. un agente oportunista en infecciones humanas. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener*, (4): 1-11.
- Carbal, L., Foen, L., Morale, M. y Orozco, M. 2016. Amebas de vida libre aisladas en aguas superficiales del municipio de Turbaco, Bolívar-Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(1): 59-69.
- Castillo, M., Santos, R., Cerna, M., Torres, E., Portillo, A. y Quintanilla, R. 2011. Amibas de vida libre en pozas, piscinas y lagos de El Salvador. *Crea Ciencia*, 7(11):6-10.
- Castrillón, J. y Orozco, L. 2013. *Acanthamoeba* spp. como parásitos patógenos y oportunistas. *Revista Chilena de Infectología*, 30(2):147-155.
- Castro-Artavia, E. 2015. *Determinación de características asociadas al potencial patogénico de aislamientos de Acanthamoeba, obtenidos a partir de muestras de equipos de la Universidad de Costa Rica*. Tesis para obtener el título de licenciado en Microbiología y Química Clínica. Universidad de Costa Rica, Costa Rica. 75p.

- Castro, M. A. 2012. *Aislamiento e Identificación de Amebas Patógenas del Género Acanthamoeba en Piscinas Termales en Tecozautla, Estado de Hidalgo*. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Estudios Superiores "Plantel Iztacala". Universidad Nacional Autónoma de México. México. 58p.
- Caumo, K. y Rott, M. B. 2011. *Acanthamoeba T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil*. *Acta Tropical*, 117(3): 233-235.
- Chang, C. W., Wu, Y. C. y Ming, K. W. 2010. Evaluation of real-time PCR methods for quantification of *Acanthamoeba* in antropogenic water and biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 109(3): 799-807.
- Coskun, K., Ozcelk, S., Tutar, L., Elaldi, N., y Tutar, Y. 2013. *Isolation and identification of free-Living Amoebae from Tap Water in Sivas, Tukey*. *BioMed Research International*, 2013: 1-8.
- De Jonckheere, J. F. 1984. *Postgraduate Course on Biochemical Techniques for the Diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis*. UNAM, México. 70p.
- Dirección General de Epidemiología. 2012. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica de Meningoencefalitis Amibiana Primaria (Amibas de Vida Libre). [en línea]. Consultado el 7 de junio del 2019. Disponible en: http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/docstos/infoepi/vig_epid_manuales/16_2012_Manual_Meningoencefalitis_vFinal_7nov12.pdf.
- 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 Bióloga. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 71p.
- Fernández, M.T. 2015. *Caracterización Molecular de Amebas de Vida Libre e Identificación de Otros Parásitos en Aguas de Red de la Provincia de Zaragoza: Asociación con Otros Microorganismos y Riesgos para la Salud Pública*. Tesis para obtener el grado de Doctorado. Universidad de Zaragoza. España. 301p.

- Galarza, C., Ramos, W., Gutiérrez, E., Ronceros, G., Terán, M., Uribe, M. N., Avincopa, M. y Ortega-Loayza A. 2009. Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *The International Society of Dermatology*, 48: 1324–1329.
- Gallegos-Neyra, E. M. 1997. *Amebas de Vida Libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis Potosí*. Tesis Doctoral en Ciencias (Biología). Facultad de Ciencias UNAM. México. 130p.
- Gallegos-Neyra, E., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M. y Mayén-Estrada, R. 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 10-25.
- Gertiser, M., Visciarelli, E., Basabe, N., Perez, M. y Costamagna, S. 2010. *Acanthamoeba* spp. en piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 44 (4): 697-703.
- Garaycochea M. Beltrán, M. y Morón, C. 2008. Patogenicidad de las amibas de vida libre aisladas de fuentes de agua en Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 25 (2): 204-207.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Zumkehr, B., Wüthrich, F., Nüesch, I., Ryter, R., Schürch, N., Gottstein, B. y Müller, N. 2010. Screening of swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. *Experimental Parasitology*, 126 (1): 45-53.
- Gianinazzi, C., Schild, M., Wüthrich, F., Ben Nour, N., Fuchsli, H. P., Schürch, N., Gottstein, B. y Müller, N. 2009. Screening Swiss water bodies for potentially pathogenic free-living amoebae. *Research in Microbiology*, 160 (6): 367-374.
- Hammer, O. 2001. Past 3. Oslo. (3.23) (Software).
- Hernández, P. Y. 2019. *Detección de Amibas de Vida Libre en Aguas de Piscina*. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. 52p.

- Hickman, C. P., Roberts, L. S. y Larson, A. 2001. *Principles of Zoology. McGraw Hill*. New York, E.U, (7): 299 p.
- Huang, S. W. y Hsu, B. M. 2010. Isolation and identification of *Acanthamoeba* from Taiwan spring recreation areas using culture enrichment combined with PCR. *Acta Tropica*, 115(3): 282-287.
- INEGI. 2018. *Espacios y Datos de México: Cardonal, Hidalgo*. Consultado el: 20 de abril del 2018. Disponible en: <https://www.inegi.org.mx/app/mapa/espacioydatos/default.aspx?ag=130150001>.
- Kao, P. M., Tung M. Ch., Hsu B. M., Tsai, H. L., Shen, S. M. y Huang, W. C. 2013. Real-time PCR method for the detection and quantification of *Acanthamoeba* species in various types of water samples. *Parasitology Research*, 112: 1131-1136.
- Khan, N. A., Jarroll, E. L. y Paget, T. A. 2001. *Acanthamoeba* can be differentiated by the polymerase chain reaction and simple plating assays. *Current Microbiology*, 43: 204–208
- Khan NA, Tareen NK. 2003. Genotypic, phenotypic, biochemical, physiological and pathogenicity-based categorization of *Acanthamoeba* strains. *Folia Parasitologica*, 50: 97–104.
- Khan, N. 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiology Reviews*, 30: 564–595.
- Khan, N. A. 2009. *Acanthamoeba: Biology a Pathogenesis*. Caister Academic Press. Norfolk, UK. 271p.
- Kiss, C., Barna, Z., Vargha, M. y Török, J. K. 2014. Incidence and molecular diversity of *Acanthamoeba* species isolated from public baths in Hungary. *Parasitology Research*, 113(7): 2551-2557.
- Kyle, D. E. y Noblet, G. P. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoeba. I. Willard's Pond. *The Journal of Protozoology*, 33(3): 422-434.
- Kokare, C., Chakraborty, S., Khopade, A. y Mahadik, K. 2009. Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotech*, 8: 159-168.

- 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.
- Lares, V. F., Ayala, M. I. T. y Verdugo, E. E. 2001. Amibas de vida libre aisladas de jacuzzis y piscinas de uso recreativo en Hermosillo, Sonora. *ITSON-DIEP*, 3(10): 39-47.
- Lares-Jiménez, L. F. y Lares Villa, F. 2009. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 5(2): 161-167.
- Loret, F. J. y Greub, G. 2010. Free-living amoebae: Biological by-passes in water treatment. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 213: 167-175.
- Lorenzo-Morales, J., Ortega-Rivas, A., Foronda, P., Martínez, 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.
- Lorenzo-Morales, J., Martin, C., Lopez, A., Arnalich, F., Piñero, E. y Valladares, B. 2013. *Acanthamoeba* Keratitis: and emerging disease gaining importance worldwide. *Trends in Parasitology*, 29(4): 181-187.
- Magnet, A., Galván, A. L., Fenoy, S., Izquierdo, F., Rueda, C., Fernández-Vadillo, C., Pérez-Irezábal, J., Bandyopadhyay, K., Visvesvara, G. S., Da Silva, A. J. y Del Águila, C. 2012. Molecular characterization of *Acanthamoeba* isolated in water treatment plants and comparison with clinical isolates. *Parasitology Research*, 111(1): 383-392.
- Magnet A., Fenoy, S., Galván, A. L., Izquierdo, F., Rueda, C. y Fernández C. 2013. A year long study of the presence of free-living amoeba in Spain. *Water Research*, 47(19): 6966-6972.
- Mahittikorn, A., Kittichathanakul, T., To-Im, J., y Nacapunchai, D. 2017. Knowledge, behavior, and free-living amoeba contamination of cosmetic contact lens among university wearers in Thailand: A cross-sectional study. *Eye & Contact Lens*, 2: 81-88.

- Marciano-Cabral, F. y Cabral, G. 2003. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiology Review*, 16(2): 273-307.
- Mendoza- Romero, M. 2014. *Aislamiento e Identificación de Acanthamoeba spp. Patógenas de las Aguas Potables del D.F. y Área Metropolitana del Valle de México*. Tesis para obtener el título de Bióloga. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. 80p.
- Montalbano, M., Santoro, M., Lovreglio, P., Monno, R., Capolongo, C., Calia, C., Fumarola, L., D'Alfonso R., Berrilli, F. y Di Cave, D. 2015. Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. *International Journal Environmental Research Public Health*, 12: 3417-3427.
- Moreno, A. 2012. *Amebas Patógenas Termotolerantes en las Biopelículas de un Balneario de Aguas Termales en el Estado de Hidalgo, México*. Tesis para obtener el título de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. UNAM. 52p.
- Muchesa, P., Mwamba O., Barnard, T. G. y Bartie, C. 2014. Detection of Free-Living amoebae using amoeba enrichment in Wastewater treatment Plant of Gauteng province, South Africa. *BioMed Research International*, 2014: 10p.
- Muñoz, V., Reyes, H., Toche, P., Carcamo, C. y Gottlieb, B. 2003. Aislamiento de amebas de vida libre en piscinas públicas de Santiago de Chile. *Parasitología Latinoamericana*, 58(3-4): 106-111.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010, Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas. Consultado el: 02 de abril del 2018. Disponible en: <http://www.dof.gob.mx/normasOficiales/4770/salud/salud.htm>.
- Oddó, D. 2006. Interacciones por amebas de vida libre: comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatómo-clínicos. *Revista Chilena de Infectología*, 23(3): 200-214.
- Omaña-Molina, M., Vanzzini-Zago, V., Hernández-Martínez, D., Reyes-Batlle, M., Castelan-Ramírez, I., Hernández-Olmos, P., Salazar-Villatoro, L., González-Robles, A., Ramírez-Flores, E., Servín-Flores, C., Flores-Alvarado,

- V., Alcántara-Castro, M., y Lorenzo-Morales, J. 2018. *Acanthamoeba* keratitis in Mexico: Report of a clinical case and importance of sensitivity assays for a better outcome. *Experimental Parasitology*, 1-31.
- Omaña-Molina, M. Vanzzini, V. Hernandez, D. Gonzalez, A. Salazar, L. Ramírez, E. Oregón, E. Lorenzo, J. y Martinez, A. 2016. *Acanthamoeba* genotypes T3 and T4 as causative agents of amoebic keratitis in Mexico. *Parasitology Research*, 115(2): 873-78.
 - Orrego-Puelles, E., Casavilca, S., Rodríguez, F. J., Pritt, B. S., Castillo, M. y Castañeda, C. A. 2015. Amebiasis del sistema nervioso central: reporte de seis casos en el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 32(3):591-597.
 - Ozcelik, S., Acikalin, K., Yünlü, Ö., Alim, A. y Malatyali, E. 2012. The prevalence, isolation and morphotyping of potentially pathogenic free-living amoebae from tap water and environmental water sources in Sivas. *Turkije Parazitol Derg*, 36:198-203.
 - Page, F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture*. Freshwater Biological Association Scientific Publication, Lóndres. 122p.
 - Peralta-Rodríguez, M.L. y Ayala-Oviedo, J.J. 2009. Amibas de vida libre en seres humanos. *Salud Uniforme*, 25(2): 280-292.
 - Pérez-Irezábala, J., Martínez, I., Isasa, P. y Barrón, J. 2006. Queratitis por *Acanthamoeba*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica*, 24: 46-52.
 - Pussard, M. y Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kstique et taxonomies du genre *Acanthamoeba* (Protozoa,Amoebida). *European Journal of Protistology*, 13: 557-598.
 - Queratitis amebiana: Todo lo que debes saber. (s/f). Supera tu enfermedad.com. Consultado el: 27 de septiembre del 2019. Disponible en: <https://superatuenfermedad.com/c-enfermedades-de-los-ojos/queratitis-amebiana/>
 - Ramírez-Acevedo, A. 2009. *Bioindicadores de la Calidad del Agua en la Cuenca de Río Tolantongo, Hidalgo*. Tesis para obtener el grado de título de

Ingeniero en Recursos Naturales Renovables. Universidad Autónoma Chapingo. Hidalgo, México. 99-114.

- Ramírez, E., Robles, E., Martínez, B., Ayala, R., Sainz, G., Martínez, M. E. y Gonzales, M. E. 2014. Distribution of free-living amoebae in a treatment system of textile industrial wastewater. *Experimental Parasitology*, 145: 34-38.
- Ramírez-Molas, L., Kang, H., Ayala-Lugo, R., Fariña, N., Sanabria, R. y Miño de Kaspar, H. 2005. Queratitis por *Acanthamoeba* sp. reporte de caso. *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas (Asunción)*, 38 (3): 44-47.
- Retana-Moreira, L., Abrahams-Sandí, E., Cabello-Vílchez, A. M., Reyes-Batlle, 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.
- Rohr, U., Weber, S., Michel, R., Selenka, F. y Wilhelm, M. 1998. Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(5): 1822-1824.
- 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.
- Saburi, E., Rajaii, T., Behdari, A., Kohansal, M. H. y Vazini, H. 2017. Free-living amoebae in the water resources of Iran: a systematic. *Review Journal Parasitology*, (4): 919-928.
- Siemensma, F. 2019. Microworld world of ameboid organism. Consultado el: 26 de enero del 2020. Disponible en: <https://www.arcella.nl/>.

- Siddiqui, R. y Khan, N. A. 2012. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasites & Vectors*, 5(6): 365-372.
- Smirnov, A. V. y Brown, S. 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology*, 3(3): 148-190.
- Solgi, R., Niyiyati, M., Haghighi, A., Taghipour, N., Javad, S., Tabaei, S., Eftekhar, M., y Nazemalhosseini, E. 2012. Thermotolerant *Acanthamoeba* spp. isolated from therapeutic hot springs in northwestern Iran. *Journal of Water and Health*, 10(4): 650-656.
- Taméz, L. 2019. *Riqueza Específica De Amibas De Vida Libre Potencialmente Patógenas de Laguna Larga, Michoacán*. Tesis de licenciatura en Biología. FES Iztacala. México. UNAM. 96p.
- Thomas, V., McDonell, G. P., Denyer, S. y Maillard, J. 2009. Free-living amoebae and their intracellular pathogenic microorganisms: risks for water quality. *FEMS Microbiology Reviews*, 34: 231-259.
- Todero, W. M., Caumo, K. y Brittes, R. M. 2011. Prevalence of *Acanthamoeba* from tap water in Rio Grande. *Current Microbiology*, 63: 464-469.
- Tsvetkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova-Mintcheva, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Lucas, MS. y Müller, N. 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitology Research*, 92(5):405-13.
- Tzeng, K., Hsu, B., Tsai, H., Huang, P., Tsai, J., Kao, P., Huang, K., Chen, J. 2013. Detection and identification of free-living amoeba from aquatic environment in different seasons in Taiwan. *American Geophysical Union, Fall Meeting*. 139
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. y Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoeba: epidemiology and clinical review. *Pathologie Biologie* 60(6):399-405.
- Uribarren B, T. *Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia*. 2014. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM. Consultado el 26 de octubre del 2019. Disponible en:

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html>.

- 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. Review article: Free-living amoebae as opportunistic agents of human disease. *Journal Neurosience*, 1: 1-13.
- Walochnik, J., Scheikl, U., y Haller-Schober, E. M. 2015. Twenty years of *Acanthamoeba* diagnostics in Austria. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62: 3-11.

XI. ANEXOS

Anexo 1

Especies de AVL aisladas en las dos épocas muestreadas

Cuadro 8. Especies de AVL que se registraron en las dos épocas muestreadas (lluvias y sequía) en el balneario “Las Grutas de Tolantongo”, Hidalgo, México.

Género	Especies
<i>Acanthamoeba</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>A. astronyxis</i>• <i>A. castellanii</i>• <i>A. culbertsoni</i>• <i>A. griffini</i>• <i>A. polyphaga</i>• <i>A. rhyodes</i>• <i>A. triangularis</i>
<i>Naegleria</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>N. fowleri</i>• <i>N. gruberi</i>
<i>Vannella</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>V. mira</i>• <i>V. platypodia</i>• <i>V. simplex</i>
<i>Korotnevella</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>K. stella</i>
<i>Rosculus</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>R. ithacus</i>
<i>Saccamoeba</i>	<ul style="list-style-type: none">• <i>S. limax</i>

Anexo 2

Medio NNE (agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes*) (De Jonckheere, 1979)

Reactivos:

- | | |
|--|---------|
| ➤ NaCl | 0.12g |
| ➤ MgSO ₄ .7H ₂ O | 0.004 g |
| ➤ Na ₂ HPO ₄ | 0.146 g |
| ➤ CaCl ₂ .2H ₂ O | 0.004 g |
| ➤ KH ₂ PO ₄ | 0.136 g |
| ➤ Bactoagar | 15.0 g |
| ➤ Agua destilada | 1000 ml |

Material:

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

Procedimiento:

1. Mezclar en seco todos los componentes, agregar primero 500 ml 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 de 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.

Anexo 3

Medio semisólido con medio NNE y solución de Prescott-James (Aladro-Lubel, 2009)

Reactivos:

- Medio NNE
- Solución de 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

Material:

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

Procedimiento:

1. Vaciar medio NNE en cajas de Petri aproximadamente con 5mm de grosor.
2. Posteriormente agregar la cantidad de las soluciones en la siguiente proporción:
 - Solución de 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).
3. Dejar a temperatura ambiente o colocar en incubadora según sea el objetivo de estudio.

Anexo 4

Medio líquido con solución de Prescott-James (Aladro-Lubel, 2009)

Reactivos:

- Solución de 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

Material:

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

Procedimiento:

1. Agregar 1 ml de la solución de Prescott-James en cada pozo de la placa de cultivo celular.
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).
3. Dejar a temperatura ambiente o colocar en incubadora según sea el objetivo de estudio.