

## Presencia del género *Acanthamoeba* spp. en albercas termales en Tecozautla, estado de Hidalgo, México.

Gallegos Neyra Elvia Manuela,  
Calderón Vega Arturo†, Castro Mora  
Alejandra, Martínez Domínguez  
Víctor Manuel, García García  
América Patricia

Laboratorio de Patógenos Emergentes, Unidad de  
Investigación Interdisciplinaria en Ciencias de la  
Salud y la Educación (UIICSE), Facultad de Estudios  
Superiores Iztacala, UNAM. Av. de los Barrios, No.  
1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México,  
México. C.P. 54090. Tél. 5556231296 ext. 39718

**RESUMEN:** Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos cosmopolitas de gran importancia ecológica ya que desarrollan un papel fundamental en el flujo energético y en el reciclado de nutrientes, convirtiéndose en un eslabón importante de las redes tróficas acuáticas. Algunas especies de AVL son patógenas para el humano (*Acanthamoeba castellanii*, *Naegleria fowlerii*, *Sappinia balamuthia*) y en la actualidad se les considera patógenos emergentes. En el presente estudio se realizaron tres muestreos en el balneario termal “El Géiser”, Tecozautla, Hidalgo. Se obtuvieron 151 aislados de AVL, de las cuales el 65% (98) pertenecía al género *Acanthamoeba*. Se determinaron siete especies, de las cuales cinco de ellas están relacionadas con patologías en humanos. Este reporte destaca un problema de salud pública para los usuarios del balneario y del seguimiento de la NOM-245-SSA1-2010.

**ABSTRACT:** Free living amoeba (FLA) are Cosmopolitan protozoa, they are of great ecological importance due to their fundamental task in the energetic flux of its ecosystem and in the recycling of nutrients, becoming an important member of the aquatic food chains. Some species of FLA are pathogenic for humans (*Acanthamoeba castellanii*, *Naegleria fowlerii*, *Sappinia balamuthia*) and in the present they are considered emerging pathogens. In the present study we realized three visits to the thermal Waters of “El Géiser”, Tecozautla, Hidalgo. We obtained 151 isolates of FLA, from which 65% (98) belonged to the genus *Acanthamoeba*. We determined seven species, five of these are known to be pathogenic to humans. This report sheds light on a public health problema for the users of the thermal pools and also to the compliance of the official norm NOM-245-SSA1-2010.

**Keywords:** Protozoa, free living amoeba, *Acanthamoeba*, thermophilic amoeba, thermal pools, granulomatous amoebic encephalitis

## INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son un grupo de protozoos que poseen una distribución cosmopolita, se encuentran en todo tipo de ambientes desde los casquetes polares hasta las zonas tropicales (Rivera y col., 1979; Sleigh, 1989; Tsvtkova y col., 2004; Hsu y col., 2009a; Trabelsi y col., 2012; Gallegos-Neyra y col., 2014; Sabury y col., 2017). Tienen gran importancia ecológica y médica, constituyen un grupo extenso y exitoso de protozoos, ocupan un lugar fundamental en el ciclo de nutrimentos nitrogenados y del fósforo, así como en el circuito microbiano, debido a que en forma de trofozoíto, se alimentan de materia orgánica, bacterias y otros protozoos de menor tamaño. El quiste es su estructura de resistencia y le permite sobrevivir a condiciones adversas en el ambiente (Merkell y Voge, 1989; Sleigh, 1989; Hsu y col., 2009b; Beaver y col., 1994). Las temperaturas elevadas favorecen su proliferación por lo que se les encuentra comúnmente en aguas termales naturales y artificiales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales (De Jonckheere, 1981). Existen registros previos sobre la identificación de AVL en cuerpos de agua termales localizados en distintos países (Italia, Hungría, Suiza, Tailandia, Irán, Taiwan, Brasil), en los cuales se reporta la presencia de algunos géneros de AVL como *Balamuthia*, *Naegleria*, *Vermamoeba* y *Acanthamoeba* (Amorn y col., 2005; Gianinazzi y col., 2010; Badirzadeh y col., 2011; Kao y col., 2012; Solgi y col., 2012; Kiss y col., 2014; Montalbano Di Filippo y col., 2015; Fabres y col., 2016; Sabury y col., 2017). En México, hay escasos registros de AVL potencialmente patógenas para el humano. En 2018, Lares-Villa y colaboradores reportaron la identificación de *Acanthamoeba jacobsi* en el sitio recreativo con agua termal “Agua Caliente” en Sonora, México. Existen factores que favorecen la presencia de las AVL en áreas de natación que son temperaturas cálidas tanto ambientales como del agua, fuentes de alimento para los trofozoítos, insuficiente cloración y limpieza, pH's cercanos al neutro, buena oxigenación y ausencia de competencia y depredación con otros organismos. Las amibas responden a las condiciones ambientales adversas enquistándose. El quiste de *Acanthamoeba* es muy resistente a la exposición a luz UV, cambios en la temperatura del agua y a desinfectantes presentes en las albercas o en el agua potable (De Jonckheere, 1981; Khan 2006; Gabriel y Panaligan, 2020).

Las AVL son protozoos de vida libre que pueden llegar a ser parásitos oportunistas del hombre y de otros animales, por lo que son llamadas “anfizoicas” (gr. *amphi*, que significa de ambos lados) (Gallegos-Neyra, 1997; Schuster y Visvesvara, 2004; Visvesvara y Schuster, 2008 a,b). De las numerosas especies de AVL descritas, solo cuatro géneros con sus respectivas especies se consideran patógenas para el hombre: *Balamuthia*, *Sappinia*, *Naegleria* y *Acanthamoeba* (Visvesvara y col., 2007; Król-Turmińska y Olender, 2017).

Se ha incrementado la importancia médica del género *Acanthamoeba* en los últimos años, debido al aumento en el número de casos asociados a personas inmunocomprometidas (Marciano-Cabral y col., 2000). Es el agente causal de la queratitis amebiana (QA), encefalitis amibiana granulomatosa (EAG) y acantamebiosis cutánea (AC) (Janitsschke y Martinez, 1985; Oddó, 2006; Visvesvara y Schuster, 2008a,b; Booton y col., 2009; Liang y col., 2010; Kao y col. 2012a; Siddiqui y Khan, 2014; Mendoza, 2014; Lorenzo-Morales, 2015). La EAG o acantamebiosis tiene como agente etiológico a diversas especies como *Acanthamoeba*

*culbertsoni*, *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga* (Martinez, 1983; Janitschke y Martinez, 1985; Marciano-Cabral y Cabral, 2003). El período de incubación es de varias semanas o meses para que la enfermedad se establezca. La entrada puede ser a través de la piel o mucosas, así como mediante la aspiración nasal de agua o aire contaminados con amibas o quistes viables de las mismas. Una vez en el organismo, se establece una lesión primaria desde la cual, por vía hematológica, las amibas alcanzan el sistema nervioso central (Janitschke y Martinez, 1985; John, 1993; Khan, 2006).

*Acanthamoeba* spp. se ha descrito como tolerante a elevadas temperaturas y se ha demostrado su supervivencia en cuerpos de agua termal (Amorn y col., 2005; Hsu y col., 2009b; Gianinazzi y col., 2010; Huang y Hsu, 2010; Badirzadeh y col., 2011). El detectar la presencia de AVL del género *Acanthamoeba* en aguas termales de uso recreativo destaca un problema de salud pública que ha sido olvidado debido a la baja incidencia (posiblemente debido a un subdiagnóstico de casos en México) de las infecciones por *Acanthamoeba* spp., sin embargo es necesario seguir realizando muestreos para la identificación de AVL para emitir recomendaciones adecuadas de profilaxis a los administradores de los balnearios y así prevenir posibles casos de patologías debidas a las AVL. Las medidas recomendadas para prevenir las infecciones por AVL en lugares recreativos son: educación al público usuario advirtiéndole que debe evitar en lo posible aspirar agua de las piscinas empleando narigueras, llevar a cabo un monitoreo continuo de la desinfección y limpieza de las piscinas.

El objetivo de este estudio fue el de determinar la presencia de especies de amibas potencialmente patógenas pertenecientes al género *Acanthamoeba* en albercas termales del balneario “El Géiser” en el municipio de Tecozautla, Hidalgo, a través de su identificación morfológica y de las condiciones fisicoquímicas del agua del sistema donde fueron aisladas, su presencia representaría un riesgo para la salud de las personas que en condiciones de inmunosupresión puedan estar en contacto con estos organismos oportunistas y causarles severas infecciones que incluso las puedan llevar a la muerte.

El municipio de Tecozautla, se encuentra ubicado en las coordenadas 20°31'58'' de latitud norte y 99°37'57'' de latitud oeste, a una altitud de 1700 msnm, el clima de la zona es templado-seco del tipo BShw" (w) (e) de acuerdo con García (1973), posee una superficie de 537.83 km<sup>2</sup>, lo que representa el 3% del territorio del estado de Hidalgo (Fig. 1 a), forma parte de la región hidrológica del Pánuco.

La cuenca de río Moctezuma cuenta con el río Tecozautla el cual es perenne, también es una zona rica en manantiales de aguas termales, convirtiéndolo en un importante municipio turístico, con centros recreativos atractivos, como es el balneario ejidal “El Géiser” que está ubicado en la localidad de Uxdejhé y cuyas aguas termales son empleadas como aguas curativas por personas que viajan desde diferentes lugares de México. El Balneario “El Géiser” está abierto las 24 horas de los 365 días del año.

En este balneario el principal atractivo es el géiser que es uno de los respiraderos del volcán Hualtepec y del cual brota agua sulfurosa con vapor a una temperatura de 95°C y que abastece todo el sistema de albercas artificiales a través de acueductos aéreos y en desnivel

para facilitar la llegada del agua a las albercas (Fig. 1 b y c) (Gobierno del estado de Hidalgo, 2011). Para llevar a cabo el estudio el balneario se dividió en 14 zonas de muestreo, desde donde brota el agua del géiser hasta la última piscina (Fig. 2).

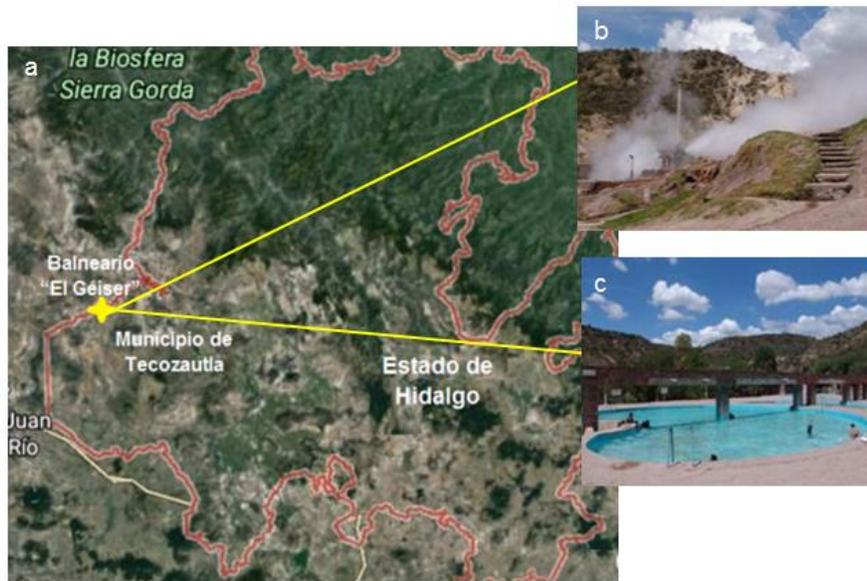


Figura 1. Balneario “El Géiser” en el municipio de Tecozautla en el estado de Hidalgo, México (a-c). a) Mapa donde se muestra el municipio de Tecozautla en el estado de Hidalgo y del balneario “El Géiser” Google Earth, 2020). b) Fotografía del manantial geotérmico donde brota el agua en el balneario c) Fotografía del canal aéreo por donde se surte el agua proveniente del géiser a cada alberca.

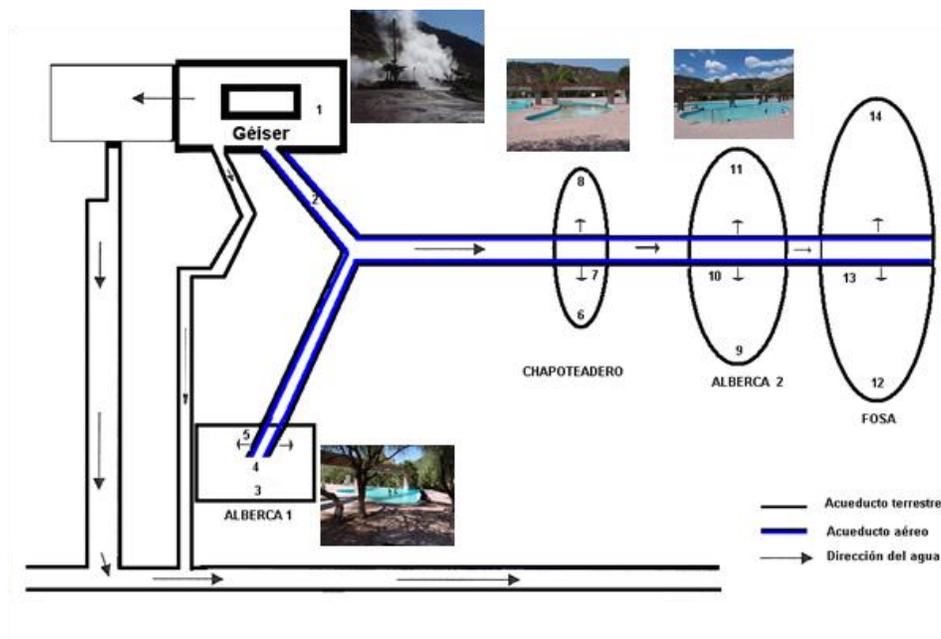


Figura 2. Esquema del balneario “El Géiser”, donde se observan los distintos cuerpos de agua que lo constituyen. Los números indican las estaciones donde se tomaron muestras de agua a lo largo de los tres muestreos.

## **METODOLOGÍA**

### **Trabajo de campo**

Se realizaron tres muestreos en el balneario “El Géiser”, durante diferentes épocas (febrero, agosto y noviembre) a lo largo de un año. Se recolectaron un total de 43 muestras de agua en diferentes zonas del balneario. Las muestras se obtuvieron en botellas estériles de polipropileno de un litro.

Para determinar las condiciones físicas y químicas del agua en la que se encuentran las AVL se realizaron las siguientes mediciones *in situ*: temperatura (°C) obtenida con un termómetro digital HANA © modelo H19040, pH y conductividad (mS/cm) obtenidos con un potenciómetro pH/EC/TDS Instrumentos HANA ©, modelo HI98130 y porcentaje de saturación de oxígeno disuelto (% OD) medido con la sonda del oxímetro digital HANNA modelo H19143.

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

### **Trabajo de laboratorio**

#### ***Análisis bacteriológico***

Se realizó un análisis de coliformes totales en cada sitio de muestreo mediante el método de filtro de membrana (Millipore MC0010025), reportando los resultados como unidades formadoras de colonias (UFC) por 100 ml de agua, (APHA, 2005).

#### ***Aislamiento y cultivo de amibas de vida libre***

Las muestras se procesaron según el método descrito por De Jonckheere (1984) para aislar AVL, se tomaron duplicados de 50 ml de agua de cada muestra y se centrifugaron a 1000 xg durante 10 minutos, la pastilla fue inoculada sobre placas de Petri con medio agar no nutritivo (NNE) con *Enterobacter aerogenes* inactivada por calor y se incubaron a 37°C (Huang y Hsu, 2010).

La observación de las placas se realizó 24h después de la inoculación, con ayuda de un microscopio invertido de contraste de fases (Nikon Eclipse TS100). En las placas con crecimiento amibiano se marcó el área de mayor abundancia y se cortó una pieza de agar de 5mm<sup>2</sup>, para ser trasferida a otra placa y ser incubadas a 37°C, después de 24h las placas fueron observadas, los trofozoítos se seleccionaron e inocularon en otra placa tantas veces como fue necesario para finalmente aislar y separar por morfotipo, las diferentes especies amibianas presentes en las muestras (De Jonckheere, 1981; Kao y col., 2012).

#### ***Axenización***

Identificados y clonados los aislados, fueron transferidos a cultivo axénico PBSGM con antibióticos. Los trofozoítos y quistes fueron seleccionados y trasferidos de las placas al medio liquido cortando la zona marcada del agar para ser incubados a 37°C manteniéndolos inclinados y sin agitación.

### **Identificación morfológica y registro fotográfico de AVL**

La identificación de los aislados amebianos se hizo tomando en cuenta los criterios morfológicos de los quistes y trofozoítos amebianos, se efectuó un barrido con solución salina y fueron observados en un microscopio invertido por contrastes de fases (Nikon Eclipse TS100) a diferentes aumentos 10, 20 y 40X e identificadas mediante el uso de claves taxonómicas y el atlas de vida libre elaborados por Page (1988), Pussard y Pons (1977) y Smirnov, y Brown, 2004. Las fotografías se realizaron con una cámara (Coolpix 990) acoplada al microscopio.

### **Medición de quistes y trofozoítos**

Se realizaron preparaciones en fresco de las amebas aisladas en laminillas y se observaron en un microscopio de contraste de fases a un aumento de 40X (Nikon Eclipse TS100). De cada aislado se registró la medida de 50 trofozoítos (largo y ancho) y 50 quistes (diámetro largo y ancho).

### **Pruebas de tolerancia a la temperatura**

Se determinó la temperatura máxima y óptima de crecimiento de las amebas aisladas. Cada uno de los aislados se sembró por triplicado en medio NNE y se mantuvieron a temperatura ambiente (20 a 22°C), 37, 42 y 45°C, posteriormente las placas se observaron con un microscopio invertido a 10,20 y 40X aumentos durante una semana para observar su crecimiento.

### **Métodos estadísticos**

Las gráficas y el análisis estadístico fueron realizados utilizando el software Prism (GraphPad). La significancia estadística fue determinada utilizando la prueba de "t" no pareada cuando se compararon dos grupos y se utilizó ANOVA de una sola vía cuando se compararon más de dos grupos. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados significativos.

## **RESULTADOS**

### **Identificación de amebas de vida libre**

De 43 muestras obtenidas del balneario "El Géiser", se obtuvieron 151 aislados de AVL. Se lograron identificar cinco géneros amebianos: *Acanthamoeba*, *Leptomyxa*, *Naegleria*, *Valkampfia* y *Vermamoeba*. El género amebiano más frecuentemente aislado fue *Acanthamoeba* (65%) (Fig.3), del cual se determinaron siete especies por las características morfológicas del trofozoíto y quiste *Acanthamoeba astronyxis*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba griffini*, *Acanthamoeba mauritaniensis*, *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba* sp. (ameba que solo se identificó hasta nivel genérico), de las cuales las especies más predominantes fueron *Acanthamoeba castellanii* y *Acanthamoeba polyphaga*. (Fig. 4). Las mediciones morfométricas de trofozoítos y quistes permitieron corroborar la identificación morfológica, debido a que el tamaño promedio de los quistes para las diferentes especies de acantamebas coincide con el ámbito de tamaño establecido por Page (1966,1975, 1976 y 1988).

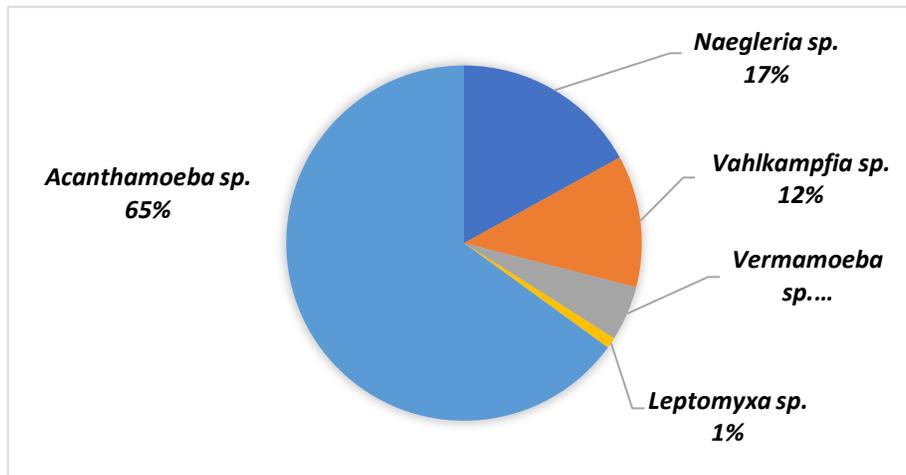


Figura 3. Diversidad de los géneros de amibas de vida libre encontrados en los tres muestreos en el agua del balneario “El Géiser” en Tecozautla, Hidalgo.

En el primer muestreo (febrero) se obtuvieron 46 aislados de los cuales 21 correspondieron al género *Acanthamoeba*, donde *A. castellanii* y *A. polyphaga*, fueron las especies más frecuentemente aisladas. En el segundo muestreo (agosto) se obtuvo un mayor número de aislados (59), de los cuales 46 correspondieron al género *Acanthamoeba*, es decir casi el 78% del total de aislados, *A. castellanii* siguió siendo la especie más presente en el agua seguida por *A. astronyxis*, *A. culbertsoni* y *A. polyphaga*. En el último muestreo (noviembre) se obtuvieron 31 aislados del género *Acanthamoeba*, siendo *A. polyphaga* la especie más frecuente, seguida por *A. castellanii* (Cuadro 1).

ESTACIÓN	UBICACIÓN	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
1	GÉISER	<i>A. castellanii</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. castellanii</i>
		<i>A. polyphaga</i>	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. griffini</i>
			<i>A. polyphaga</i>	<i>A. polyphaga</i>
			<i>A. sp.</i>	<i>A. sp.</i>
2	ACUEDUCTO	<i>A. castellanii</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. castellanii</i>
		<i>A. sp.</i>	<i>A. sp.</i>	<i>A. griffini</i>
				<i>A. polyphaga</i>
3, 4 y 5	ALBERCA 1	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. astronyxis</i>
		<i>A. polyphaga</i>	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. castellanii</i>
			<i>A. polyphaga</i>	<i>A. culbertsoni</i>
			<i>A. sp.</i>	<i>A. griffini</i>
				<i>A. polyphaga</i>
6, 7 y 8	CHAPOTEADERO	<i>A. castellanii</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. castellanii</i>
			<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. polyphaga</i>
			<i>A. polyphaga</i>	
			<i>A. sp.</i>	
9, 10 y 11	ALBERCA 2	<i>A. castellanii</i>	<i>A. astronyxis</i>	<i>A. castellanii</i>
		<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. culbertsoni</i>
		<i>A. griffini</i>	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. polyphaga</i>
		<i>A. polyphaga</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. sp.</i>
		<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. sp.</i>	
		<i>A. sp.</i>		
12, 13 y 14	FOSA	<i>A. griffini</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. griffini</i>
		<i>A. polyphaga</i>	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. polyphaga</i>
			<i>A. polyphaga</i>	<i>A. sp.</i>
			<i>A. sp.</i>	

Cuadro 1. Estaciones de muestreo en el balneario “El Géiser” y especies de *Acanthamoeba* aisladas en cada sitio.

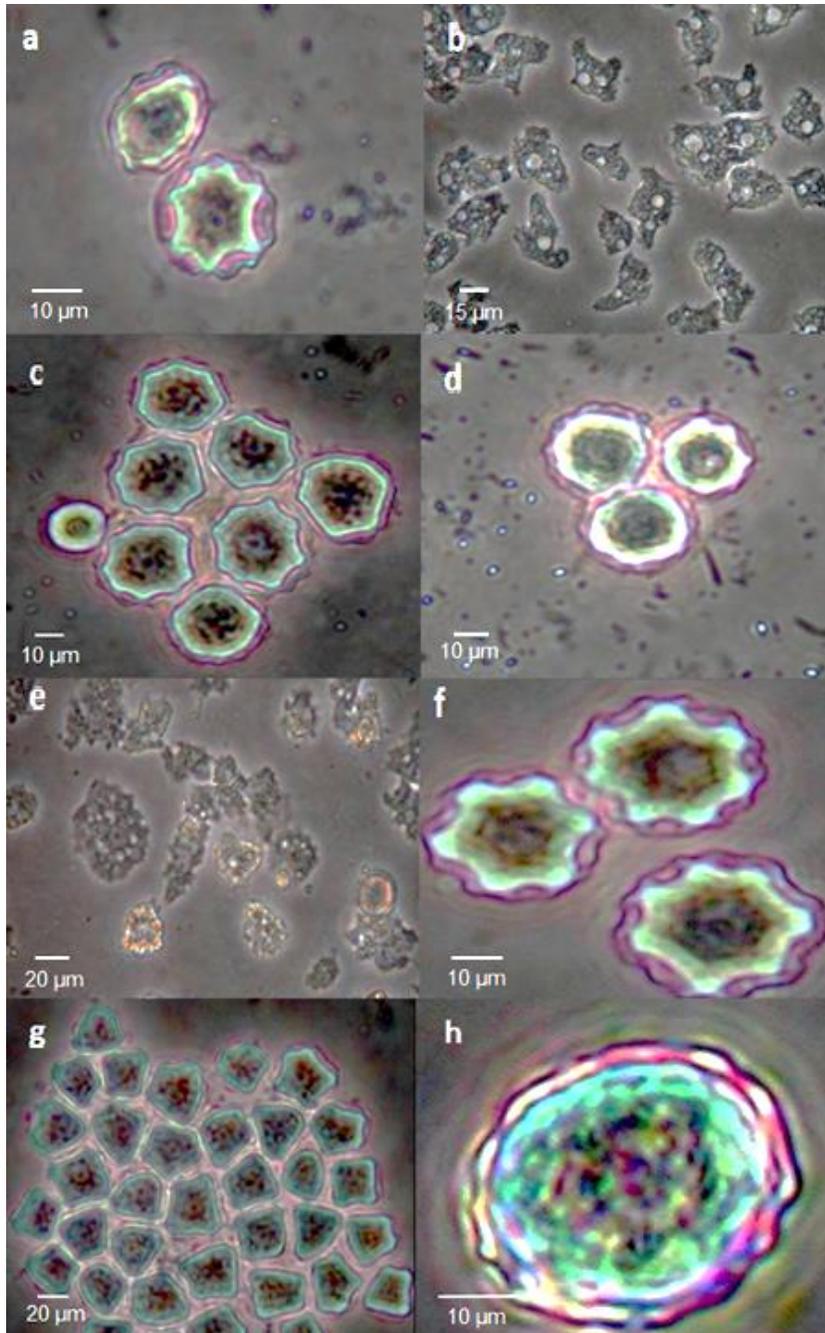


Figura 4. Especies de amebas del género *Acanthamoeba* identificadas. Quiste (a ) y trofozoíto (b) de *A. astronyxis*; quiste de *A. castellanii* (c); quiste (d) y trofozoíto (e) de *A. culbertsoni*; quiste de *A. griffini* (f) ; quiste de *A. polyphaga* (g) y quiste *Acanthamoeba* sp. Microscopía por contraste de fases, 20 y 40X.

#### **Pruebas de termotolerancia de los aislados de *Acanthamoeba***

De acuerdo con las pruebas de tolerancia a la temperatura, de las siete especies del género *Acanthamoeba* encontradas en el balneario; solamente *A. culbertsoni*, *A. polyphaga* y *A. castellanii* crecieron hasta los 45°C. En el caso de *A. astronyxis*, *A. griffini*, *A. mauritaniensis* y *Acanthamoeba* sp., tuvieron un crecimiento óptimo hasta los 37°C, a temperaturas mayores las formas quísticas predominaron (Cuadro 2).

## Coliformes totales

Los resultados de la medición de coliformes totales mostraron una diferencia significativa durante los meses de febrero/agosto ( $p=0.000018$ ) y agosto/noviembre ( $p=0.000000102$ ), las diferencias pueden ser debido a que en la temporada de agosto, la cantidad de personas que visitan el parque aumenta debido al periodo vacacional que ocurre durante esa temporada, la presencia de una mayor cantidad de coliformes puede estar relacionado con una mayor diversidad de amibas de vida libre así como también un mayor enriquecimiento de ciertas especies (Fig. 5) (Toscano-Aparicio, 2017).

Especies de <i>Acanthamoeba</i> spp.	Temperaturas de incubación											
	Temperatura ambiente (20-22 °C)			37 °C			42 °C			45 °C		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
<i>A. astronyxis</i>	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. castellanii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
<i>A. culbertsoni</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. griffini</i>	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. mauritaniensis</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. polyphaga</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Acanthamoeba</i> sp.1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Cuadro 2. Pruebas de termotolerancia de las especies de *Acanthamoeba* obtenidas de los tres muestreos en el agua del balneario “El Géiser”.

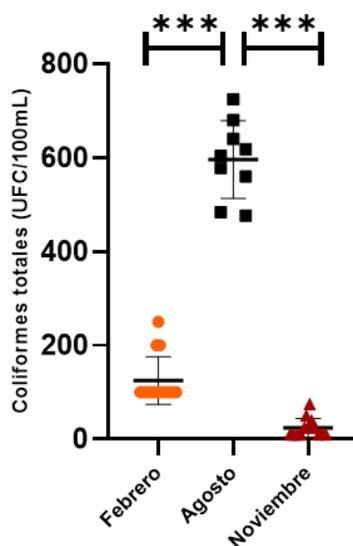


Figura 5. Coliformes totales del agua en el balneario “El Géiser”. \*\*\* corresponde a un  $p$  valor  $<0.00001$

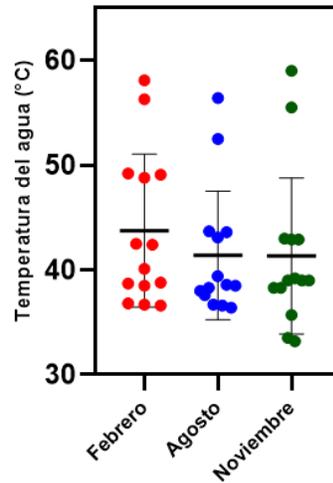


Figura 6. Temperatura del agua en el balneario “El Géiser”.



Figura 7. Periodo de alta afluencia al balneario durante los periodos vacacionales de semana santa y mes de agosto “El Géiser”, Tecozautla, Hidalgo (Toscana-Aparicio, 2017).

### Parámetros fisicoquímicos

La temperatura promedio del agua ( $42.16 \pm 1.389$  °C) entre los distintos muestreos no demostró diferencias significativas ( $p=0.5788$ ), sin embargo, en la fuente del géiser se obtuvo una temperatura  $>55$  °C donde se logró aislar *A. castellanii* y *A. polyphaga* (Fig. 6) (Cuadro 1). Las medidas de la temperatura atmosférica demostraron diferencias entre los valores obtenidos en noviembre ( $p=0.018$ ) y febrero ( $p=0.009$ ) con respecto a las temperaturas de agosto, sin embargo, la variación en la temperatura es poco probable que influya directamente en la diversidad de AVL debido a que el principal medio donde habitan es en los cuerpos de agua, que demostraron tener una temperatura estable. Los valores de

oxígeno disuelto en el agua durante los muestreos no demostraron una diferencia significativa ( $p=0.101$ ). Los valores de pH obtenidos durante este muestreo demostraron una diferencia significativa entre febrero/agosto ( $p=0.0003$ ) y agosto/noviembre ( $p<0.05$ ), a pesar de la diferencia estadística encontrada entre los valores, la interpretación de la relación entre el pH y la diversidad de AVL no indica una correlación directa, los valores de conductividad fueron iguales entre los muestreos ( $p>0.9999$ ).

## DISCUSIÓN

Las AVL se han reportado en un gran variedad de ambientes (Rivera y col., 1979 y 1989), sin embargo, los hábitats preferenciales de las especies con potencial patógeno son cuerpos de agua con temperaturas elevadas ( $> 35^{\circ}\text{C}$ ) debido a que tienen la característica de ser organismos termotolerantes, y por ello han sido reportados comúnmente en aguas termales naturales (Kyle y Noblet, 1986). Los géneros de AVL encontrados en los diferentes muestreos en el balneario “El Géiser” coincidió con los resultados obtenidos en Hidalgo por Rivera y col., 1993 o en otros estados por Lares-Villa y col. en el 2001 y Lares-Jiménez y cols. 2018, quienes describieron a organismos pertenecientes al género *Acanthamoeba* como los más frecuentemente aislados en diversos cuerpos de agua recreativa. Además de *Acanthamoeba*, *Naegleria*, también fue uno de los géneros más frecuentemente reportados en estos estudios y se ha descrito previamente que representan un riesgo para los bañistas que visitan estos lugares, debido a que se han catalogado como patógenos para el ser humano (Lehman y col., 1988). Las especies más comúnmente aisladas fueron *A. castellanii* y *A. polyphaga*, ambas consideradas como potencialmente patógenas para el ser humano debido a que pueden infectar el sistema nervioso central causando encefalitis amibiana granulomatosa (EAG), y queratitis amibiana (QA). Además se ha descrito que *A. castellanii* puede afectar a otros órganos como pulmón, próstata, huesos, músculos y piel (Martínez, 1983; Janitschke y Martínez, 1985; Mathers y col., 2000).

Las diferencia en la cantidad especies de amibas pertenecientes al género *Acanthamoeba* reportadas en el segundo muestreo en comparación con las otras visitas, fue atribuida a la temporada, la cual coincidió con el periodo vacacional de verano en México, por lo tanto, el número de bañistas visitantes al balneario “El Géiser” fue elevado (Fig. 7) (Toscano-Aparicio, 2017) y una de las explicaciones probables acerca del aumento de la diversidad de AVL es que existe una mayor facilidad de la interacción del agua con el suelo que rodea a las albercas con los bañistas y por lo tanto facilitaría la contaminación con AVL de los cuerpos de agua. Otro factor determinante para explicar la presencia de las AVL en el agua fue el tiempo que tardó en hacerse el mantenimiento de las albercas, por lo general la limpieza se hace cada semana según lo reportado por los ejidatarios, sin embargo, cuando es temporada vacacional el tiempo de limpieza se demora y con esto las poblaciones amibianas podrían proliferar. Otra posible explicación del aumento de AVL durante el mes de agosto podría ser que debido a la mayor presencia de coliformes totales por el aumento en el número de usuarios (Fig. 5), exista un incremento en la cantidad de alimento disponible para las amibas debido a su preferencia trófica por las bacterias coliformes, lo que podría favorecer su proliferación.

Los diferentes aislados de *Acanthamoeba* que potencialmente pueden infectar al humano pueden ser capaces de sobrevivir a temperaturas de 37°C que corresponde a la temperatura del cuerpo humano. Existen diferentes especies de AVL termotolerantes, esta característica ha permitido la colonización de hábitats con temperaturas extremas para la mayoría de los seres vivos, además esta adaptación podría permitir que las AVL termófilas como *Acanthamoeba* puedan invadir a mamíferos de sangre caliente como el ser humano. Por ello todas las AVL con potencial patógeno son termófilas (Schuster y Visversvara, 2004 Adamska y col., 2014). Los resultados obtenidos de las pruebas de termotolerancia demostraron que tres especies del género *Acanthamoeba*, que han sido reportadas como patógenas, fueron capaces de crecer hasta los 45 °C.

La homogeneidad de la temperatura del agua ( $42.16 \pm 1.389$  °C) (Fig. 6) es debido a que el sistema es alimentado por una fuente geotérmica, pudo haber favorecido la presencia de organismos termófilos como es el caso de *Acanthamoeba* (Marciano-Cabral y Cabral, 2003). Se observó que los valores de pH registrados (~9.0) durante los diferentes muestreos se ajustan al ámbito de crecimiento y supervivencia de amibas según distintos reportes (Kyle y Noblet, 1986) y por ello no se consideró un parámetro que influyera en la distribución de *Acanthamoeba*. Así mismo los datos de las concentraciones de oxígeno disuelto indican que no fue un factor limitante para la presencia de AVL, sin embargo, estos valores pueden demostrar de manera indirecta en qué fase de su ciclo se encuentran (John, 1993), ya que Heredero-Bermejo y col. en 2015, realizaron un estudio donde sometieron a *Acanthamoeba* a diferentes concentraciones de oxígeno disuelto (OD) encontrando que a valores de 21% no sufren ninguna alteración los trofozoítos, pero a concentraciones de 5.2 % comienza a haber enquistamiento.

Otro aspecto importante sobre la administración del balneario ejidal “El Géiser”, es que abre todo el año y no cuenta con un horario establecido para la desinfección y tampoco tiene protocolos estandarizados para el trato sanitario de los cuerpos de agua como lo marca la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010 “Requisitos sanitarios y calidad del agua que deben cumplir las albercas con el fin de prevenir y minimizar los riesgos a la salud pública”. Durante los fines de semana, días festivos y periodos vacacionales la cantidad de turistas visitantes de toda la República Mexicana es considerable (Fig.7) (Toscana-Aparicio, 2017).

## CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron 151 aislados amibianos pertenecientes a cinco géneros en el balneario “El Géiser”, de los cuales el género más frecuente fue *Acanthamoeba* (65%).

Se identificaron siete especies pertenecientes al género *Acanthamoeba*: *Acanthamoeba astronyxis*, *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba culbertsoni*, *Acanthamoeba griffini*, *Acanthamoeba mauritaniensis*, *Acanthamoeba polyphaga* y *Acanthamoeba* sp. presentes en el agua a lo largo del sistema muestreado. Cinco de ellas se han reportado como patógenas para el ser humano, debido a que pueden infectar el sistema nervioso central (causando la EAG) y los ojos provocando la QA, además pueden afectar otros órganos como

son pulmón, próstata, huesos, músculos y piel. *Acanthamoeba castellanii* y *A. polyphaga*, fueron las más frecuentemente aisladas durante los tres muestreos.

En el muestreo realizado en el mes de agosto se encontró una mayor cantidad de amibas de vida libre potencialmente patógenas pertenecientes al género *Acanthamoeba*. Con respecto a la relación de la presencia de amibas del género *Acanthamoeba* con los factores fisicoquímicos del agua de temperatura, oxígeno disuelto, conductividad y pH, no se estableció una relación directa sobre el crecimiento de las amibas; por lo que este balneario posee un ambiente acuático estable que no se ve influenciado por los cambios ambientales externos en las diversas épocas del año que se muestrearon, lo que puede favorecer su proliferación en este tipo de ambientes.

Finalmente, la detección de AVL con potencial patógeno como son las especies pertenecientes al género *Acanthamoeba*, en este tipo de cuerpos de agua de uso recreativo y curativo que están en estrecha relación con el humano podría ser de gran significancia ecológica y médica, en primera la significancia ecológica podría ser que el contacto frecuente entre amibas y los humanos podría permitir la selección aquellas amibas que tengan las suficientes adaptaciones para poder establecerse en un hospedero y volverse patógenas, y segundo, para aquellos individuos inmunocomprometidos, como son las personas inmunocomprometidas, con alguna lesión cutánea, adultos mayores o aquellos que utilizan lentes de contacto y no mantienen la higiene adecuada.

La presencia de las especies de *Acanthamoeba* en el balneario “El Géiser” representan un problema de salud pública grave y podría ser un foco de infección para los turistas. Además no se cumple la Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010 que indica la necesidad de realizar tres muestreos durante el mes anterior al inicio de la temporada de mayor afluencia de visitantes, para poder determinar la cantidad de coliformes fecales y garantizar que el agua del balneario está libre de amibas pertenecientes a los géneros *Acanthamoeba* y *Naegleria*. Las autoridades o administradores del lugar deben de notificar a través de dispositivos de información, a los turistas de la zona de los posibles riesgos para la salud que implican realizar actividades acuáticas en el balneario, así como promover acciones de prevención como es la desinfección y la eliminación de biopelículas de las albercas artificiales, el uso de lentes de natación, narigueras y evitar nadar si tienen heridas o alguna condición de inmunosupresión.

### **Agradecimientos**

Este trabajo recibió financiamiento por parte del “Programa de Apoyo al Personal de Carrera (PAPCA) 2013-2014” de la Facultad de Estudios Superiores de la UNAM.

### **LITERATURA CITADA**

American Public Health Association (APHA), American Water Works Association, and Water Pollution Control Federation. 2005. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21 th edition, American Public Health Association, Washington, D.C. 309p.

Adamska, M., Leonska-Duniec, A., Lanocha, N & Skotarczak, B. 2014. Thermophilic potentially pathogenic amoebae isolated from natural water bodies in Poland and their molecular characterization. *Acta Parasitol.* 59(3):433-441

Amorn, L., Chantira, S., Somchai, B. & Yaowalark, S. 2005. Free-living ameba contamination in natural hot springs in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Pub. Health.* 36: 1-5.

Ayuntamiento de Tecozautla. 2016. *Plan Municipal de Desarrollo 2012-2016*. Consultado en mayo del 2016. Disponible en: <http://sepladerym.hidalgo.gob.mx/institucional/Programas/PlanesMunicipalesDesarrollo/IV%20Huichapan/TECOZAUTLA%20PMD.pdf>

Badirzadeh, A., Niyiyati, M., Babaei, Z., Amini, H., Badirzadeh, H. & Rezaeian, M., 2011. Isolation of free-living amoebae from Sarein hot springs in Ardebil province Iran. *Iranian J. Parasitol.* 6: 1-8.

Beaver, P.C., Jung, R.C. & Cupp, E. W. 1994. *Parasitología Clínica*. Edit. Salvat. Barcelona. 2da ed. 483p.

Booton, G. C., Joslin, C. E., Shoff, M., Ey, T. U., Kelly, D. J. & Fuerst, P. A. 2009. Genotypic identification of *Acanthamoeba* sp. isolates associated with an outbreak of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 28: 673–676

De Jonckheere J. F. 1981. Pathogenic and nonpathogenic *Acanthamoeba* spp. thermally polluted discharges and surface waters. *Rev. Protozool.* 28 (1): 56-59.

De Jonckheere, J. F. 1984. *Postgraduate Course on Biochemical Techniques for the Diagnosis of Primary Amoebic Meningoencephalitis*. UNAM. Mexico. 70p.

Fabres, L. F., Rosa Dos Santos, S. P., Benitez, L. B., & Rott, M. B. 2016. Isolation and identification of *Acanthamoeba* spp. from thermal swimming pools and spas in Southern Brazil. *Acta Parasitol.* 61(2): 221–227.

Gabriel, A. A. & Panaligan, D. C. 2020. Heat and chlorine resistance of a soil *Acanthamoeba* sp. cysts in water. *J. Appl. Microbiol.* 129 (2):453-464.

Gallegos-Neyra, E. 1997. *Amibas de Vida Libre Potencialmente Patógenas en Cuerpos de Agua de Uso Recreativo en el Estado de San Luis de Potosí*. (Tesis Doctoral). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 132p.

Gallegos-Neyra, E., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M. & Mayén-Estrada, R. 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. *Rev. Mex. Biodiv. Supl* 85: 510-525.

Gianinazzi, C., Schild, M., Zumkehr, B., Wuthrich, F., Nuesch, I., Ryter, R., Schurch, N., Gottstein, B. & Müller N. 2010. Screening of Swiss hot spring resorts for potentially pathogenic free-living amoebae. *Exp. Parasitol.* 126: 45-53.

Gobierno del Estado de Hidalgo. *Actualización del Plan Estatal de Desarrollo 2011-2016*. Consultado en junio del 2016. Disponible en: <http://sepladerym.hidalgo.gob.mx/PEDACT/documentos/Plan%20Estatal%20Desarrollo.pdf>

García, E. (1983). "Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Koppen, 1st ed. Instituto de Geografía UNAM., México.

Herederro-Bermejo, I., Criado-Fornelio, A., Soliveri, J., Díaz-Martín, J. A., Matilla-Fuentes, J., Sánchez-Arias, J. A., Copa-Patiño, J. L. & Pérez-Serrano, J. 2015. Development of a new oxygen consumption rate assay in cultures of *Acanthamoeba* (Protozoa: Lobosea) and its application to evaluate viability and amoebicidal activity *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 155:35-39.

Hsu, B. M., Lin, C. L. & Shih, F. C. 2009a. Survey of pathogenic free-living amoebae and *Legionella* spp. in mud spring recreation area. *Water Res.* 43: 2817-2828.

Hsu, B. M., Ma, P. H., Liou, T. S., Chen, J. S. & Shih, F. C. 2009b. Identification of 18S ribosomal DNA genotype of *Acanthamoeba* from hot spring recreation areas in the central range Taiwan. *J. Hydrol.* 367: 249-254.

Huang S. W. & Hsu B. M. 2010. Isolation and identification of *Acanthamoeba* from Taiwan spring recreation areas using culture enrichment combined with PCR. *Acta Tropica.* 115: 282-287.

Instituto Nacional para el Federalismo y el Desarrollo Municipal, Gobierno del Estado de Hidalgo. 2002. Consultado en agosto del 2002. Disponible en: [http://www.e-local.gob.mx/w2/ELOCAL/EMM\\_Hidalgo](http://www.e-local.gob.mx/w2/ELOCAL/EMM_Hidalgo).

Janitsschke, J. & Martinez, A. J. 1985 *Acanthamoeba*, an opportunistic microorganism; A review. *Infection.* 13:251-256.

John, D. T. 1993. Opportunistically pathogenic free-living amoebae. Págs: 143-246. In: Kreir J. P. y Baker A. (Eds.). *Parasitic Protozoa*. Academic Press, Nueva York.

Kao, P. M., Hsu, B. M., Chen, N. H., Huang, K. H., Huang, S. W., King, K. L., & Chiu, Y. C. 2012. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species from thermal spring environments in southern Taiwan. *Exp. Parasitol.* 130(4): 354-358.

Kiss, C., Barna, Z., Vargha, M., & Török, J. K. 2014. Incidence and molecular diversity of *Acanthamoeba* species isolated from public baths in Hungary. *Parasitol. Res.* 113(7): 2551-2557.

- Khan, N.A. 2006. *Acanthamoeba*: Biology and increasing importance in human health. *FEMS Microbiol. Rev.* 30: 564–595.
- Król-Turmińska, K. & Olender, A. 2017. Human infections caused by free-living amoebae. *Ann. Agric. Environ. Med.* 24(2):254-260.
- Kyle, D. E. & Noblet, G. 1986. Seasonal distribution of thermotolerant free-living amoeba. Williard's Pond. *J. Protozool.* 33(3):422-434.
- Lares-Jiménez, L. F., Borquez-Román, M. A., Lares-García, C., Otero-Ruiz, A., Gonzalez-Galaviz, J. R., Ibarra-Gómez, J. C., & Lares-Villa, F. 2018. Potentially pathogenic genera of free-living amoebae coexisting in a thermal spring. *Exp. Parasitol.* 195: 54-58.
- Liang, S. Y., Ji, D. R., Hsia, K.T., Hung, C. C., Shen, g W. H., Hsu, B. M., Chen, J. S., Wu, M.H., Lai, C.H. & Ji, D .D. 2010. Isolation and identification of *Acanthamoeba* species related to amoebic encephalitis and nonpathogenic free-living amoeba species from the rice field. *J. Appl. Microbiol.* 109: 1422–1429.
- Lorenzo-Morales, J., Khan, N. & Walochnik, J. 2015. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis pathogenesis and treatment. *Parasite.* 22: 1-10
- Martinez, A. J. 1983. Isolation pf the two strains of *Acanthamoeba culbertsoni* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol.* 18:1405-1412.
- Marciano-Cabral, F. & Cabral, G. 2003 *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clinical Microbiol. Rev.* 16: 273-307.
- Marciano-Cabral. F., Puffenbargaert, R & Cabral, G. A. 2000. The increasiong importance of *Acanthamoeba* infections. *J. Euk. Microbiol.* 47:29-36.
- Mathers W. D. Nelson S. E., Wilson M. E., Allen R. C. & Folberg R. 2000. Confirming of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch. Ophatlmol.* 118: 178-183.
- Mendoza M. J. 2014. *Aislamiento e Identificación de Acanthamoeba spp. Patógenas del Agua Potable de la Zona Metropolitana del Valle de México (ZMVM)*. Tesis de licenciatura (Biología) Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. 83p.
- Merkell, E. & Voge, M. 1989. *Parasitología Médica*. 6a Ed. Madrid. España. Interamericana. 1092p.
- Montalbano Di Filippo, M., Santoro, M., Lovreglio, P., Monno, R., Capolongo, C., Calia, C., Fumarola, L., D'Alfonso, R., Berrilli, F., & Di Cave, D. 2015. Isolation and molecular characterization of free-living amoebae from different water sources in Italy. *International J. Environ. Res. Pub. Health* 12(4): 3417-3427.

Norma Oficial Mexicana NOM-245-SSA1-2010. *Requisitos Sanitarios y Calidad del Agua que Deben Cumplir las Albergas*. Diario Oficial de la Nación. Consultado en: agosto del 2018 Disponible en : [www.salud.gob.mx/cdi/nom/compi/NOM-245-SSA1-2012\\_250612.pdf](http://www.salud.gob.mx/cdi/nom/compi/NOM-245-SSA1-2012_250612.pdf).

Oddó, D. 2006. Infecciones por amibas de vida libre. Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anatomo-clínicos. *Rev. Chil. Infect.* 23 (3): 200-214.

Page, F. C. 1966. *Taxonomical Criteria for Small Amoebae, with a Redefinition of the Genera Hartmanella and Acanthamoeba and Descriptions of Three New Species*. Tesis Doctoral en Ciencia y Teconologia, University of Wisconsin. 150 pp,

Page, F. C. 1975. Morphological variation in the cyst wall of *Naegleria gruberi* (Amoebida, Vahlkampfiidae) *Protistol.* 11: 195-204.

Page, F. C. 1976. *An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology*. Freshwater Biological Association Scientific Publication. Londres. 180pp.

Page, F. C. 1988. *A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae with Instructions for Culture*. Freshwater Biological Association; Scottish Marine Biological Association, Natural Environment Research Council. Londres, 122 p.

Pussard, M. & Pons, R. 1977. Morphologie de la paroi kistique et taxonomies du genere *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistol.* 13: 557-598.

Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, E. & Paz, M. E. 1979 A quantitative morphological and ecological study of protozoa polluting tap water in Mexico City. *Trans. Amer. Micro. Soc.* 98(3):465-469.

Rivera, F., Lares, F., Gallegos, E., Ramirez, E., Calderon, A., Martinez, J., Rodriguez, S., & Alcocer, J. 1989. Pathogenic amoebae in natural thermal waters of three resorts of Hidalgo, Mexico 50(2): 289-295.

Rivera, F., Ramirez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortíz, R., Zaldivar, B., Ramírez, P. & Durán, A. 1993. Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ. Res.* 62: 43-52.

Sabury, E., Rajaii, T., Behdari, A., Kohansal, M. H. & Vazini, H. 2017. Free-living amoebae in the water resources of Iran: a systematic review. *J. Parasitic Dis.* 41(4):919-928.

Schuster, F. L. & Visvesvara G. S. 2004. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International J. Parasitol.* 34: 1001-1027.

Siddiqui, R. & Khan, N. 2014. Primary amoebic meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*: An old enemy presenting new challenge. *Plos Neglected Trop. Dis.* 8(8): 1-8.

- Sleigh, M. 1989. *Protozoa and other Protists*. Roudledge, Chapman, Hall, New York. 320p.
- Smirnov, A. V. & Brown, S. 2004. Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *J. Protistol.* 3 (3): 148-190.
- Solgi, R., Niyati, M., Haghighi, A., Taghipour, N., Tabaei, S. J., Eftekhar, M., & Nazemalhosseini, M. E. 2012. Thermotolerant *Acanthamoeba* spp. isolated from therapeutic hot springs in Northwestern Iran. *J. Water Health*, 10(4): 650-656.
- Toscana-Aparicio, A. 2017. Balneario El Géiser: una experiencia de turismo comunitario en México. Cuadernos de Geografía. *Rev. Colombiana de Geografía* 26 (2): 279-293.
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellam,i H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F. & Ayadi, A. 2012. Pathogenic free-living amoebae: Epidemiology and clinical review. *Pathol. Biol.* 60: 399-405.
- Tsvtkova, N., Schild, M., Panaiotov, S., Kurdova, R., Gottstein, B., Walochnik, J., Aspöck, H., Siles, M. & Müller, N. 2004. The identification of free-living environmental isolates of amoebae from Bulgaria. *Parasitol. Res.* 92: 405-413.
- Visvesvara, G. S., Moura, H. & Schuster, F. L. 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 50: 1-26.
- Visvesvara, G. & Schuster, F. 2008a. Opportunistic free-living amebae, Part I. *Clinical Microbiol. Newsletter.* 30: 151-158.
- Visvesvara G. & Schuster, F. 2008b Opportunistic free-living amebae, Part II. *Clinical Microbiol. Newsletter.* 30: 159-166.