Identificación molecular de amibas de vida libre patógenas en diversos cuerpos de agua naturales y artificiales del estado de Chihuahua, México. Primera parte.

Manuel Alejandro Borquez-Román[1], Rebeca Estefanya Payán-Sánchez[1], Claudia Carolina Hernández-Peña[2*], Patricio Eduardo Byerly-Sosa[1], Luis-Fernando Lares-Jiménez[1], Libia Zulema Rodríguez-Anaya[3], José Reyes Gonzalez-Galaviz[3], Martín Renato Hernandez-Castaños[4], Jaime Raúl Adame-Gallegos[4], Fernando Lares-Villa[1*]

[1]Departamento de Ciencias Agronómicas y Veterinarias, Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, [2]Departamento de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Cd. Juárez, Chihuahua. [3]CONACYT-Instituto Tecnológico de Sonora, Ciudad Obregón, 85000 Sonora, México. [4]Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua, Chihuahua, Chihuahua.

Artículo recibido el 14 de noviembre de 2022 y aceptado el 12 de diciembre de 2022

Molecular identification of pathogenic free-living amoebae in various natural and artificial water bodies in the state of Chihuahua, Mexico. First part.

Abstract

Free-living amoebae (AVL) are protozoa widely distributed in nature, and some of them are capable of causing serious infections in humans and animals. The genera *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia*, *Vermamoeba, Vahlkampfia* y *Paravahlkampfia,* have gained relevance as they have species that behave as pathogenic and opportunistic parasites. To generate information on the geographic distribution and genetic diversity of pathogenic free-living amoebae in the northern region of Mexico, the findings of the sampling of various natural and artificial aquatic environments carried out in the state of Chihuahua are presented, particularly in the near the city of Chihuahua and Ciudad Juarez. Fourteen water samples were taken in one-liter containers, seven samples from the city of Chihuahua and its surroundings, and another seven samples from Ciudad Juarez and its suburbs, including the Rio Grande. Aliquots of 50 mL were duplicated after shaking the sampling bottle and centrifuged to concentrate the sample. Pellets were seeded on non-nutritive agar plates spiked with Escherichia coli and seeded at 37 and 42°C as isolation temperatures. 98 strains were isolated, 50 at 37°C and 48 at 42°C, keeping a total of 84 strains in culture. Once the morphological identification and PCR tests were carried out, *N. fowleri*, *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp., and other genera of uncertain identity were confirmed, which amplified with the universal primers and are awaiting the result of the sequencing. The presence of free-living pathogenic amoebas in the North and South of Chihuahua and unrelated aquatic environments that may be a source of contamination for diseases caused by free-living pathogenic amoebas is confirmed.

Key words: Naegleria, *Acanthamoeba,* surface waters, free-living amoebae, water pollution.

Resumen

Las amibas de vida libre (AVL), son protozoarios ampliamente distribuidos en la naturaleza, y algunas de ellas son capaces causar infecciones graves en el ser humano y en los animales. Los géneros *Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia, Sappinia, Vermamoeba, Vahlkampfia* y *Paravahlkampfia,* han cobrado relevancia ya que tienen especies que se comportan como parásitos patógenos y oportunistas.
Con la intención de generar información sobre la distribución geográfica y diversidad genética de amibas de

*Autor de correspondencia
Email: carolina.hernandez@uacj.mx; flares@itson.edu.mx
ISSN 2594-0384 (Electrónica)
DOI: https://doi.org.1033154/rlrn.2022.03.03

vida libre patógenas en la región norte de México, se presentan los hallazgos de los muestreos de diversos medios acuáticos naturales y artificiales realizados en el estado de Chihuahua, particularmente en las cercanías de la ciudad de Chihuahua y Ciudad Juárez. Se tomaron un total de 14 muestras de agua en recipientes de un litro, siete muestras en la ciudad de Chihuahua y sus alrededores, y otras siete muestras de Ciudad Juárez y sus suburbios, incluyendo al Río Bravo. Se tomaron alícuotas de 50 mL por duplicado, previa agitación del frasco de muestreo, y se centrifugaron para concentrar la muestra. Los sedimentos se sembraron en placas con agar no nutritivo adicionados de *Escherichia coli* y se sembraron a 37 y 42°C como temperaturas de aislamiento. Se aislaron un total de 98 cepas, 50 a 37°C y 48 a 42°C, manteniéndose en cultivo un total de 84 cepas. Una vez realizadas las pruebas de identificación morfológica y por PCR se confirmó la presencia de *N. fowleri*, *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp., y otros géneros de identidad incierta que amplificaron con los primers universales y están en espera del resultado de la secuenciación. Se confirma la presencia de amibas de vida libre patógenas en el norte y sur estado de Chihuahua y de medios acuáticos no relacionados que pueden ser fuente de contaminación para enfermedades por amibas de vida libre patógenas.

Palabras claves: Naegleria, Acanthamoeba, aguas superficiales, amibas de vida libre, contaminación del agua.

Introducción

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos, eucariontes, aerobios. También se les conoce como amibas anfizoicas porque tienen la dualidad tanto de vivir libremente en la naturaleza, como la capacidad de introducir enfermedades en el ser humano y en los animales (Page, 1988). Entre las AVL que se han reportado como patógenas para el ser humano se encuentran *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Sappinia pedata*, *Vermamoeba vermiformis*, *Vahlkamfia* spp., *Paravahlkampfia* spp. (Sousa-Ramos *et al*., 2022). *Naegleria fowleri* se encuentra en todo el mundo y se ha aislado del suelo y en agua dulce. Debido a que es una amiba termofílica y puede tolerar hasta 45°C, prolifera durante periodos cálidos cuando es probable que la temperatura ambiente sea más alta (De Jonckheere, 2011).

Acanthamoeba es uno de los protozoos más comunes siendo encontrado en superficies y lugares muy variados como agua (dulce y salada), aire, suelo, sistemas de ventilación, etc. También se ha localizado en una gran variedad de condiciones ambientales, desde tropicales hasta regiones árticas, lo que le proporciona una distribución alrededor del mundo (Khan, 2006).

La meningoencefalitis amibiana primaria (MAP), es una enfermedad aguda, fulminante y mortal, que se observa principalmente en niños, adultos jóvenes o animales previamente sanos, con un historial reciente de exposición de agua dulce tibia, ésta infección es causada por *N. fowleri* (Benterki *et al*., 2016). Por otro lado, existen enfermedades como encefalitis amebiana granulomatosa (EAG), la cual es descrita como rara pero grave enfermedad del ser humano con una tasa de mortalidad mayor al 98%. Esta, es ocasionada por dos protozoarios patógenos, *Acanthamoeba* spp. y *B. mandrillaris* (Visvesvara, Moura, Schuster, 2007).

Acanthamoeba spp. ocasiona queratitis amebiana (QA), es una infección de la córnea que amenaza la vista y cuyo número de casos ha ido aumentando en las últimas décadas. Los usuarios de lentes de contacto se consideran el principal grupo de riesgo para desarrollar esta enfermedad, debido a la susceptibilidad del lente y otros accesorios a la contaminación y a la aparición de microtraumatismos corneales que predisponen a la infección. En muchas situaciones, la similitud de la QA con otra queratitis microbiana retrasa el diagnóstico, lo que da como resultado una mala respuesta al tratamiento y, en ocasiones, exige un trasplante de córnea (Neelam y Niederkorn, 2017).

Las AVL se encuentran dispersas alrededor del mundo, principalmente en cuerpos de agua dulce templada donde se alimentan de las bacterias presentes en el medio ambiente y no requieren de un hospedador para sobrevivir, lo que las convierte en una causa poco común de enfermedades infecciosas en humanos (Bursle y Robson, 2016). Además, pueden desarrollarse en tuberías, calentadores de agua y sistemas de agua pública (Naqvi *et al*., 2016).

Actualmente, se han detectado más de 400 casos de MAP y alrededor de 350 casos de EAG en distinta distribución geográfica a la fecha (De Jonckheere, 2011).

Por otro lado, en México se han encontrado especies de estas AVL en distintos cuerpos de agua naturales y artificiales, sin embargo, en la región de Chihuahua hay pocos estudios realizados

(Hernández-Peña *et al*., 2019). Por lo anterior, surge la siguiente pregunta: ¿Cuál es la distribución de *N. fowleri* y *Acanthamoeba* spp, en cuerpos de agua naturales y artificiales del estado de Chihuahua.

Material y métodos

Muestreo

Se tomaron muestras de agua dulce en diversos medios acuáticos naturales y artificiales del estado de Chihuahua, particularmente en las cercanías de la ciudad de Chihuahua y Ciudad Juárez en septiembre de 2020 (Tabla 1). Se tomaron 14 muestras, siete en el área de la ciudad de Chihuahua y siete de los alrededores de Ciudad Juárez, utilizando botellas de plástico estériles. El volumen de las muestras fue de un litro y fueron tomados de la superficie, después de suspender previamente el sedimento para desalojar cualquier materia orgánica adherida. También se midieron el pH y la temperatura del agua (Lares-Villa y Hernandez-Peña, 2010).

Procesamiento de muestras

Las muestras se concentraron por centrifugación a 2000 rpm durante 15 min en centrífuga Labnet Hermle Z383K refrigerada (Woodbridge, NUEVA JERSEY). El sedimento se vertió en placas Petri con agar no nutritivo recubierto con *Escherichia coli* (NNE). La temperatura de incubación se fijó en 42 °C, con el fin de buscar a *N. fowleri* y otras amebas termófilas. En el caso de *B. mandrillaris* y *Acanthamoeba* spp., el procesamiento se realizó siguiendo la técnica del "Sándwich" (Lares-Jiménez *et al*., 2014) y la temperatura de incubación se fijó en 37 °C.

Aislamiento de amibas y prueba de transformación flagelar

Las amibas que crecieron a 37 y 42 °C, se resembraron hasta obtener cultivos puros y los que presentaron una morfología semejante a *Naegleria*, se les realizó la prueba de transformación flagelar agregando de uno a dos mililitros de agua destilada estéril a la placa de crecimiento, esto con la

Tabla 1. Ubicación de sitios de muestreo, características FQ del agua y número de aislamientos de AVL del estado de Chihuahua.

Muestra	Lugar	Coordenadas	Temp. del agua °C	pH del agua	No. de Amibas a 37°C	No. de Amibas a 42°C	Mapa, tipo de reservorio acuático y aspecto del agua
1	Presa el Rejón	28°36'41.7"N 106°07'54.4"W	26.4	6.7	4	2	https://goo.gl/maps/vs1Q8YNN6TLsz2Za7 Embalse artificial, agua color marrón
2	Presa el Rejón	28°36'43.4"N 106°07'50.6"W	25.0	7.2	4	6	https://goo.gl/maps/j2ztkZ13phzHfJEe9 Embalse artificial, agua color marrón
3	Presa Chuviscar	28°36'06.7"N 106°06'56.7"W	22.0	9.6	1	1	https://goo.gl/maps/FqFGwDoGjkf9sP5MA Embalse artificial, agua color verde
4	Presa Chuviscar	28°36'13.4"N 106°06'57.1"W	22.0	9.6	2	2	https://goo.gl/maps/hQS2yPU6zCqLZv5C6 Embalse artificial, agua color verde
5	Presa Chihuahua	28°34'31.3"N 106°10'13.3"W	23.6	8.5	1	1	https://goo.gl/maps/v9D3yr5kJ5RJHdGV8 Embalse artificial, agua cristalina
6	Presa Chihuahua	28°41'06.6"N 106°00'31.1"W	21.4	7.8	7	6	https://goo.gl/maps/PRE7up1EWvcAjJqZ9 Corriente superficial con aguas negras
7	Aldama, Chihuahua	28°48'28.5"N 105°55'44.7"W	24.8	8.6	3	1	https://goo.gl/maps/qs1b8fvNCsp6ja6K6 Corriente superficial con aguas limpias
8	Río Bravo	31°45'39.3"N 106°30'35.3"W	24.8	2.9	4	6	https://goo.gl/maps/zLVBm8Rq5yzS2qSg9 Corriente superficial con aguas negras
9	Río Bravo	31°46'17.3"N 106°30'58.9"W	25.1	2.7	6	4	https://goo.gl/maps/AgSbkPqNoDSzF9gJ9 Corriente superficial con aguas negras
10	Río Bravo	31°47'02.9"N 106°31'39.9"W	22.8	5.7	3	4	https://goo.gl/maps/ght34UNKjMnE5QSNA Corriente superficial con agua turbia
11	Presa Benito Juárez	31°45'47.6"N 106°32'56.0"W	19.3	3.5	3	4	https://goo.gl/maps/ZrXsLXKputxbFtsv8 Embalse artificial, agua color verde
12	Dique Soriana	31°39'31.5"N 106°26'46.2"W	24.5	5.2	4	3	https://goo.gl/maps/JegokHoqVNJ5SQkc7 Embalse artificial, agua drenaje pluvial
13	Valle de Juárez	31°29'55.3"N 106°14'26.7"W	33.8	6.5	3	6	https://goo.gl/maps/NhyGmAtcUdwTnJxU8 Balneario en desuso de aguas termales
14	Parque Oriente	31°36'12.9"N 106°20'15.1"W	23.7	5.9	5	2	https://goo.gl/maps/CNwwMwyy7YaxG85n7 Embalse artificial, para vida acuática

intensión de disminuir la concentración de nutrientes en el medio y proporcionar un medio de desplazamiento para las amibas. Las cajas se incubaron a 37 °C por 4 horas, y se realizaron observaciones cada hora. La prueba se consideró positiva al observar amibas moviéndose de un lado a otro con las características del estado ameboflagelar de *Naegleria*; mientras que, en la prueba negativa, las amibas no presentaron movimiento propio a través del líquido manteniéndose en estado de trofozoítos. Después de 4 h sin transformación la prueba se tomó como negativa. Los otros aislamientos se prepararon para extracción de DNA (Lares-Jiménez *et al*., 2015).

Cosecha, extracción y cuantificación de ADN

Se resembró cada cepa por duplicado en placas NNE, después se dejaron incubando a 37 °C durante 48 horas. Una vez que se observó la presencia masiva de trofozoítos, se cosecharon las amibas por medio de raspadores celulares y PBS. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS con una centrifugación a 2000 RPM por 10 minutos. Una vez finalizado se realizó la extracción de ADN con el kit de extracción para células de "DNeasy Blood & Tissue Kits" de QIAGEN®. Por último, se le midió a cada cepa la concentración de ADN por triplicado con el equipo "Nanodrop 2000c" (Thermo Scientific, USA).

Identificación

Los conjuntos de primers específicos de especie utilizados para la identificación de las amibas por PCR fueron, NFITSFW 5′-TGAAAACCTTTTTTCCATTTACA-3′ y NFITSRV 5′-AATAAAAGATTGACCATTTGAAA-3′ para *N. fowleri* (De Jonckheere, 2011). Los conjuntos de primers específicos de género para *Acanthamoeba* fueron JDP1 5′-GGCCCAGATCGTTTACC GTGAA-3′ y JDP2 5′-CTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA-3′ (Schroeder *et al*., 2001); y ITS1 5′-GAACCTGCGTAGGGATCATTT -3′/ITS2 5′-TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA -3′ (Pelandakis *et al*., 2000) para *Naegleria* spp.; ERIB1 5′-ACCTGGTTGATC CTGCCAG-3′ y ERIB10 5′-CTTCCGCTGGTTCACCTACGG-3′ Se utilizaron como primers universales para identificar otros géneros (Dyková *et al*., 2005).

Resultados

El muestreo se realizó en dos sitios de cada una de las presas que abastecen de agua a la ciudad de Chihuahua; Presa el Rejón, Presa Chuviscar y Presa Chihuahua (Tabla1), procurando que los puntos de muestreo estuviesen separados lo suficiente como para representar un ecosistema acuático particular. Las primeras cinco muestras provenían de aguas estancadas y las dos muestras restantes, 6 y 7 (Presa Chihuahua y Aldama), eran de corrientes de aguas superficiales. Las restantes siete muestras corresponden al área de Ciudad Juárez y suburbios, las tres primeras muestras, 8,9 y 10 corresponden a aguas superficiales del Río Bravo, que además de llevar poca agua, está contaminada con aguas negras de ambas ciudades de la frontera. Los cuatro restantes corresponden a aguas estancadas de una presa, un dique, un balneario de aguas termales en desuso y una laguna artificial (Tabla 1). En todas las muestras de aguas se aislaron amibas de vida libre. Originalmente se aislaron 50 cepas a 37°C y 48 a 42°C, pero con la falta de adaptación, y contaminaciones por hongos o bacterias difíciles de separar, se logró mantener en cultivo un total de 46 cepas de las que se aislaron a 37°C y solamente 38 a 42 °C de las aisladas originalmente, mismas a las que se les identificó por PCR como *Naegleria fowleri*, *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp., o como otras amibas de vida libre al dar positivo el PCR para los primers universales, pero negativo a los primers específicos empleados para *Naegleria* spp., *Acanthamoeba* spp. o *Naegleria fowleri*. La observación morfológica de quistes y trofozoítos previo al uso del PCR para *Acanthamoeba* spp., fue muy útil, así como la prueba de transformación flagelar para las cepas de *Naegleria* spp. Para llegar a la identificación genotípica final, se enviarán los productos de PCR a secuenciar y posteriormente las secuencias se compararán con las del Banco de Genes. En total se identificaron 9 cepas de *N. fowleri*, 25 cepas como *Naegleria* spp., 23 cepas como *Acanthamoeba* spp., y 27 cepas corresponden a otros géneros de amibas de vida libre (Tabla 2). Estas últimas cepas se identificaron morfológicamente, y entre los géneros distinguidos podemos mencionar a *Vermamoeba*, *Willaertia*, *Mayorella y Vahlkampfia*, quedando algunos como amibas de identificación incierta. El pH de las muestras de agua osciló entre 2.7 y 9.6, lo que refleja la influencia de los posibles contaminantes que son arrojados a los diversos cuerpos de agua, mientras que el resto de las temperaturas, excepto la del balneario en desuso de aguas termales, todas reflejan la temperatura de agua que se alcanzan a finales de septiembre en el estado de Chihuahua, fechas en la que se realizaron los muestreos.

Tabla 2. Número de muestras examinadas y amibas de vida libre identificadas por PCR, aisladas de aguas de reservorios naturales y artificiales del estado de Chihuahua, México.

Muestra	Cepas en cultivo aisladas a		*Naegleria fowleri*	*Naegleria* spp.	*Acanthamoeba* spp.	18S
	37°C	42°C				
1	3	1	0	1	1	2
2	6	4	3	5	1	1
3	1	1	0	0	1	1
4	1	2	1	1	1	0
5	1	1	1	1	0	0
6	7	2	2	1	1	5
7	3	2	0	4	0	1
8	3	5	0	1	2	5
9	6	5	1	2	7	1
10	1	2	0	2	1	0
11	2	1	1	0	0	2
12	4	4	0	1	1	6
13	3	6	0	5	1	3
14	5	2	0	1	6	0
Total	**46**	**38**	**9**	**25**	**23**	**27**

Discusión

La búsqueda de amibas de vida libre patógenas en diversos medios acuáticos naturales y artificiales del estado de Chihuahua, forma parte de un proyecto mayor en el que se incluyen todos los estados fronterizos con Estados Unidos de América, incluyendo a los estados de Baja California Sur y Durango, en los cuales, según la literatura, todavía no existen reportes (Gallegos-Neyra *et al*., 1914). En este estudio, además de demostrar la presencia de AVL patógenas en diversos medios acuáticos, existe un gran interés en conocer más sobre la biodiversidad de éstos microrganismos, que se encuentran distribuidos en el norte de México y para lo cual será necesario genotipificar los aislamientos, los resultados que serán publicados en la segunda parte del artículo. Este es apenas el sexto estudio sobre AVL que será publicado referente al estado de Chihuahua, alcanzándose un panorama más general sobre la biodiversidad de las amibas de vida libre aisladas bajo ciertos parámetros como la temperatura y la presencia de oxígeno (Gallegos-Neyra *et al*., 1914; Hernández-Peña *et al*., 2019). Llama la atención que bajo éstas características de aislamiento, el número de *Naegleria* spp. resultó mayor al de *Acanthamoeba* spp. cuando se considera a ésta amiba el protozoario de vida libre más abundante en la naturaleza (Page, 1988). Nosotros creemos que influye el sitio de muestreo, el tipo de agua y las restricciones para el aislamiento, al no considerar a las amibas que crecen por debajo de 37°C.

Cabe destacar que el número de aislamientos de amibas de vida libre fue mayor a la temperatura de 37°C que a 42°C, lo cual era de esperarse pues mientras más cercana sea la temperatura ambiental a la temperatura de aislamiento, mayor será el número de especies de amibas de vida libre en general. Igualmente es importante mencionar que existen especies con características termofílicas tanto del género *Naegleria* como de *Acanthamoeba* (Medeiros *et al*., 2013; Lares-Jiménez *et al*., 2018).

Los resultados revelan que 23 muestras de DNA amplificaron fuertemente con los primers JDP1 y JDP2 que correspondería a *Acanthamoeba* spp., quedando pendiente enviar a secuenciación los productos de PCR, para tratar de llevar la identificación a nivel de genotipo. En los resultados de observa también que los aislamientos de *Acanthamoeba* spp. provienen de 11 de los 14 sitios muestreados. En cuanto a los aislamientos de *Acanthamoeba* spp. en el estado de Chihuahua, encontramos un reporte de aislamiento de éstas amibas en fuentes de agua artificiales de Cd. Juárez, Chih. (Hernandez-Peña *et al*., 2019), y De Jonckheere (2007), quien reportó en su estudio de sitios naturales del estado de Chihuahua cepas de *Acanthamoeba* pertenecientes a los genotipos T4, T1 y T15, además de *Vahlkampfia ciguana*, especie previamente encontrada solo en España (Isla of Tenerife).

Los productos de PCR obtenidos de la amplificación del DNA con los primers ITS1 y ITS2, diseñados para identificar a las amibas del género *Naegleria*, indican la identificación de 34 cepas de *Naegleria* spp., provenientes de 13 sitios de los 14 muestreados. Los resultados nos hablan de la amplia distribución del género *Naegleria* y cómo sí la temperatura de aislamiento restringió el número de cepas aisladas e identificadas de éste amoeboflagelado. Aquí lo destacable es que entre

las cepas termofílicas (aquellas que crecen por arriba de 42°C), se encuentran las cepas patógenas para humanos y animales, particularmente *N. fowleri* que causa meningoencefalitis amibiana primaria en humanos y las especias de *N. australiensis* y *N. itálica* que son patógenas para ratón (De Jonckheere, 2002, 2011). Al igual que para el género *Acanthamoeba*, amibas del género *Naegleria* se aislaron de fuentes de agua artificiales de Ciudad Juárez, Chih. (Hernández-Peña *et al*., 2019). Al comparar los resultados de los aislamientos de *Acanthamoeba* spp. con los de *Naegleria* spp., encontramos que predominaron las especies de *Naegleria* y esto es debido seguramente a que la fecha de los muestreos (septiembre de 2020), correspondieron a la parte final del verano, cuando la temperatura ambiental en ese estado fronterizo es la mayor del año, y que es aprovechada por las amibas termofílicas para multiplicarse en los distintos cuerpos de agua (De Jonckheere, 2002, 2011).

Con el uso de los primers FW1 y RV1 específicos para *N. fowleri*, de identificaron 9 cepas de las 25 cepas de *Naegleria* spp. Este resultado es muy significativo ya que las cepas identificadas provienen de 6 sitios distribuidos entre el área de Chihuahua, Chih., y de Ciudad Juarez, Chih., representando posibles sitios de infección para adquirir la MAP en individuos que estén en contacto con esas aguas.

De las 84 muestras de DNA proveniente del mismo número de aislamientos de cepas de amibas de vida libre aisladas a 37°C y a 42°C de distintos cuerpos de agua del estado de Chihuahua, 27 muestras de DNA no amplificaron para los primers utilizados, por lo que el paso siguiente fue utilizar primers universales (Dyková *et al*., 2005), para identificar otros géneros de amibas de vida libre que compartían el mismo nicho ecológico de las cepas identificadas, y que aunque tentativamente fueron identificadas por morfología, deseamos esperarnos para confirmar su identificación por secuenciación de los productos del PCR.

Debido a que los valores de pH óptimos para el desarrollo de AVL son amplios, así como los límites de temperatura, resulta complicado demostrar una relación directa entre éstas variables fisicoquímicas del agua y la presencia de AVL (Gallegos-Neyra *et al*., 2018).

Conclusiones

El uso de primers específicos para identificar a las amibas de vida libre potencialmente patógenas mediante la prueba de PCR, JDP1 y JDP2 para *Acanthamoeba*, ITS1 e ITS2 para *Naegleria* spp., permitieron identificar 57 cepas de las 84 estudiadas. Con los primers FW1 y RV1 para *Naegleria fowleri*, se identificaron 9 cepas que nos lleva a concluir que las amibas de vida libre patógenas se encuentran distribuidas en distintos cuerpos de agua del estado de Chihuahua y que éstas comparten nicho con otras amibas de vida libre no identificadas aún.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada con fondos del Programa PROFAPI_2020_0049.

Referencias

Benterki, M.S., Atachi, A., Bennoune, O., Regoudis, E., Pelandakis, M. (2016). Meningoencephalitis due to the amoeboflagellate *Naegleria fowleri* in ruminants in Algeria. Parasite; 23:11. DOI: 10.1051/parasite/2016011

De Jonckheere J.F. (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus 522 Naegleria. Acta Protozool. 41: 309 – 342.

De Jonckheere, J.F. (2007). Recent interesting identifications of free-living amoebae from the Brussels laboratory (abstract). Japanese J Protozool. 40, 170.

De Jonckheere, J.F., (2011). Origin and evolution of the worldwide distributed pathogenic amoeboflagellate *Naegleria fowleri*. Infect. Genet. Evol. 11, 1520–1528 DOI: 10.1016/j.meegid.2011.07.023

Dykova, I., Nowak, B.F., Crosbie, P.B., Fiala, I., Peckova, H., Adams, M.B., Machackova, B., Dvorakova, H., 2005. *Neoparamoeba branchiphila* n. sp., and related species of the genus *Neoparamoeba* Page, 1987: morphological and molecular characterization of selected strains. J. Fish Dis. 28, 49–64. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2004.00600.x

Gallegos-Neyra, E.M., Lugo-Vázquez, A., Calderón-Vega, A., Sánchez-Rodríguez, M.R. y Mayén-Estrada, R., 2014. Biodiversidad de protistas amébidos de vida libre en México. Rev. Mex. Biodiv. 85:10-25. https://doi:10.7550/rmb.33691

Gallegos-Neyra, E. M., Becerra-Cigarroa, J. M., Figueroa-Méndez, M. G., Fuentes-Zuno, S. A., Hernández-Zamarripa, A. R., Mendoza-Romero, M. J., Avier-Venegas, D.I., Villa-Delavequia, G.S., 2018. Amibas de vida libre en playas de Tuxpan y Arrecife Ingeniero, Veracruz, México. Revista de Zoología, (29). Retrieved from: https://www.redalyc.org/jatsRepo/498/49855322001/html/index.html

Hernández-Peña, CC., Saénz-Montoya, G., Alvarado-Soto, S., Carrillo-Méndez, JD., Soto-Padilla, MY., Otero-Ruiz, A., Lares-Jiménez, LF. 2019. Identificación de Naegleria spp. y Acanthamoeba spp. en agua de fuentes de Ciudad Juárez, Chihuahua. Rev Latinoamer Rec Nat 15(3):88-96.

Khan, N.A., 2006. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiology Reviews, 30(4):564–595, https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00023.xL.

Lares-Jiménez, L.F.; Borquez-Román, M.A.; Lares-García, C.; Otero-Ruiz, A.; Gonzalez-Galaviz, J.R.; Ibarra-Gámez, J.C.; Lares-Villa, F. (2018). Potentially pathogenic genera of free-

living amoebae coexisting in a thermal spring. Exp Parasitol, 195, 54-58. DOI: 10.1016/j.exppara.2018.10.006

Lares-Jimenez, L.F., Booton, G.C., Lares-Villa, F., Velazquez-Contreras, C.A., Fuerst, P.A., (2014). Genetic analysis among environmental strains of Balamuthia mandrillaris recovered from an artificial lagoon and from soil in Sonora, Mexico. Exp. Parasitol. 145, S57eS61. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.007

Lares-Villa, F. y Hernández-Peña, C.C. (2010). Concentration of *Naegleria fowleri* in natural waters used for recreational purposes in Sonora, Mexico (November 2007-October 2008). Experimental Parasitology. 126(1):33-36 DOI: 10.1016/j.exppara.2010.04.011

Medeiros, M.L.Q., Araújo, M.F.F., Sodré-Neto, L., Amorim, A.S. (2013). Spatial and temporal distribution of free-living protozoa in aquatic environments of a Brazilian semiarid region. Ambi-Agua, Taubaté 8 (2), 46–56. 1129. https://doi.org/10.4136/ambi-agua.1129

Naqvi, A.A., Yazdani, N., Ahmad, R., Zehra, F., Ahmad, N., (2016). Epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis-related deaths due to Naegleria fowleri infections from freshwater in Pakistan: an analysis of 8-year dataset. Arch. Pharm. Pract. 7 (4), 119e129. https://doi.org/10.4103/2045-080X.191924

Neelam, S., Niederkorn, J. (2017). Pathobiology and immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis: insights from animal models. Yale J. Biol. Med. 90, 261-268. PMCID: PMC5482302

Page, F.C. 1988. A new key to freshwater and soil gymnamoebae. CCAP. Freshwater Biological Association. Pp 24-120

Pelandakis, M., Serre, S., Pernin, P., 2000. Analysis of the 5.8S rRNA gene and the internal transcribed spacers in Naegleria spp. and in N. fowleri. J. Eukaryot. Microbiol. 47, 116–121. https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2000.tb00020.x

Sousa-Ramos D, Reyes-Batlle M, Bellini NK, Rodríguez-Expósito RL, Martín-Real C. Piñero JE, Lorenzo-Morales J. (2022). Pathogenic free-living amoebae from water sources in Cape Verde. Parasitology Research 121:2399–2404 https://doi.org/10.1007/s00436-022-07563-y

Schroeder, J.M., Booton, G.C., Hay, J., Niszl, I.A., Seal, D.V., Markus, M.B., Fuerst, P.A., Byers, T.J., 2001. Use of subgenic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of acanthamoebae from humans with keratitis and from sewage sludge. J. Clin. Microbiol. 39 (5), 1903–1911. https://doi.org/10.1128/JCM.39.5.1903-1911.2001.

Visvesvara, G.S., Moura, H. y Schuster, F., 2007. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri* and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol, 50(1), 1-26. https://doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00232.x