



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
TECNOLOGÍA MÉDICA
ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**“DETECCIÓN DE AMEBAS DE VIDA LIBRE EN AGUAS DE
REGADÍO DE LA ZONA AGRÍCOLA DE CAÑETE”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO TECNÓLOGO
MÉDICO EN EL ÁREA DE LABORATORIO CLINICO Y ANATOMIA
PATOLOGICA**

RUBEN CLEVER ITURRIZAGA BLAS

ASESOR: ALFONSO MARTIN CABELLO VÍLCHEZ PhD

Lima, Perú

2015

HOJA DE APROBACIÓN

RUBÉN CLEVER ITURRIZAGA BLAS

**“DETECCIÓN DE AMEBAS DE VIDA LIBRE EN AGUAS DE
REGADÍO DE LA ZONA AGRÍCOLA DE CAÑETE.”**

**Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de
Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio
clínico y Anatomía Patológica por la Universidad Alas Peruanas.**

LIMA – PERÚ

2015

DEDICATORIA

Con todo mi cariño y mi amor para las personas que hicieron todo en la vida para que yo pudiera lograr mis sueños, por motivarme y darme la mano cuando sentía que el camino se terminaba, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Alfonso Martin Cabello Vílchez,
por su asesoría y ayuda constante en
la realización del presente trabajo.

Al Lic. Jorge Fernández Baldeon ,por su
orientación y asesoría para el desarrollo
de esta tesis

Al instituto de medicina tropical
ALEXANDER VON HUMBOLDT, por las
Facilidades prestadas para el desarrollo de
esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN	06
SUMMARY	07
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	
Planteamiento del Problema.....	08
Formulación del Problema.....	09
Problema General.....	09
Problemas Específicos.....	10
Objetivo General.....	10
Objetivos Específicos.....	10
Justificación.....	11
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	
Bases Teóricas.....	12
Antecedentes.....	19
Antecedentes Internacionales.....	19
Antecedentes Nacionales.....	20
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	
Diseño del Estudio.....	23
Muestra.....	24
Operacionalización de Variables.....	24
Procedimientos y Técnicas.....	25
Plan de análisis de Datos.....	27
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	
Resultados.....	28
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN	
Discusión.....	33
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES	
Conclusiones.....	40
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES	
Recomendaciones.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
ANEXOS	51
MATRIZ DE CONSISTENCIA	53

RESUMEN

Objetivo: Aislar e identificar la presencia de amebas de vida libre en muestras ambientales de la provincia de Cañete-Lima Perú. **Material y Métodos:** Se analizaron 18 muestras tomadas en la rivera del río Cañete, las muestras de suelo y agua fueron de la rivera del río cañete fueron procesadas y fueron sembradas en medio ANN para el aislamiento e identificación morfológica de amebas de vida libre identificándolo a nivel de género. **Resultados:** Estas se procesaron para el aislamiento de ameba de vida libre. El 77.7% de las muestras mostró ser positivo a la presencia de amebas de vida libre. El 66.6% de las muestras mostro *Acanthamoeba sp*, y el 50 % de las muestras se observaron estructuras compatibles con *Naegleria sp.* y 16% (3) *Leptomyxa sp.* **Conclusiones:** Estos hallazgos deben de ser considerados importantes debido a la probabilidad de que algún poblador se infecte por exposición a las fuentes de agua o suelo. La presencia de *Acanthamoeba sp*, supone un riesgo potencial para la salud y por ello debería de realizarse más investigación al respecto.

PALABRAS CLAVE: amebas de vida libre, suelo, amebas patógenas, protistas potencialmente patógenos.

SUMMARY

Objective: Isolate and identify the presence of free-living amoebae in environmental samples from the province of Cañete-Lima Perú. **Material and Methods:** 18 samples collected from the banks of the river were analyzed in Cañete, samples of soil and water were the banks of the river cañete were processed and were seeded on ANN medium for the isolation and morphological identification of free living amoeba to level genus. **Results:** These were processed for isolation of free-living amoeba. 77.7% of the samples proved to be positive for the presence of free-living amoebae. 66.6% of the samples showed *Acanthamoeba sp*, and 50% of the samples were observed with compatible structures *Naegleria sp.* and 16% (3) *Leptomyxa sp.* **Conclusions:** These findings should be considered important because of the probability that a resident was infected by exposure to water sources or soil. The presence of *Acanthamoeba sp*, poses a potential health risk and therefore more research should be done about it.

KEYWORDS: free-living amoebae, soil, pathogenic amoebae, potentially pathogenic protists.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del Problema:

Las infecciones parasitarias ocasionadas por protistas dan origen a diversos procesos infecciosos que suelen ir acompañados en algunos casos por diarreas acuosas o sanguinolentas, dolor abdominal y fiebre. Lesiones cutáneas, úlceras cutáneas y cuadros que comprometen el encéfalo como meningitis, son poco conocidas a excepción de algunos especialistas. Los parásitos del medio ambiente, no se le suele dar mucha importancia, sin embargo en los últimos años ha sido interesante el rol ecológico de algunos protistas como las amebas de vida libre, debido a una entidad clínica (meningitis) pocas veces observada en los países de la región latina en general, su alta tasa de letalidad con baja frecuencia la convierte en una enfermedad rara (1). El ciclo de vida de estos parásitos se inicia a través de la ingesta, colonización, o ingreso por material contaminados; pueden ser transmitidos en forma vegetativa (trofozoítos) o quística, siendo el Trofozoíto la forma infectante para el hombre (1). Generalmente el agua suele ser el vehículo más importante para los agentes patógenos causales de diversas enfermedades en el humano. Pero también puede ser el polvo ambiental, pero y también interviene en la ecuación de los cambios climáticos.

Las amebas de vida libre (AVL) son ubicuas en la naturaleza, encontrándose en aire, suelo, lodo, agua de mar, ríos, lagos, fuentes, piscinas y sedimento marino etc. alimentándose de bacterias pero, comportándose en algunas

ocasiones como parásitos oportunistas (1). Por estas características se les denomina también amebas anfizoicas, aludiendo a su capacidad de sobrevivir en el medio ambiente (vida libre) como invadir algún hospedero, pudiendo ocasionar meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), encefalitis granulomatosa amebiana (EGA) o queratitis amebiana (KA) (1,2).

Las infecciones a humanos por AVL son poco frecuente, sin embargo la tasa de letalidad esta alrededor del 98% (3), también se han reportado un incremento de casos en asociación al VIH/SIDA, estos cursan cuadros clínicos con EGA, los pacientes inmunosuprimidos son particularmente susceptibles a estas infecciones (1, 3, 4).

Este estudio pretende determinar la presencia de amebas de vida libre en muestras ambientales, estas muestras entran en contacto con humanos en la zona de cañete, no hay reportes de infecciones en esta zona de Lima, sin embargo es posible detectar los potenciales riesgos para la salud identificando estos protistas.

1.2. Formulación del Problema:

1.2.1. Problema General:

¿Existen amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete?

1.2.2. Problemas Específicos:

- ¿Cuáles son los morfotipos de amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete?
- ¿En qué canal de regadío de la zona agrícola de Cañete, hay presencia de amebas de vida libre?
- ¿En qué punto de los canales de regadío de la zona agrícola de Cañete, hay presencia de amebas de vida libre?

1.3. Objetivos:

1.3.1. Objetivo General:

Determinar la presencia de amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete.

1.3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar los morfotipos de amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete.
- Determinar en qué canal de regadío de la zona agrícola de Cañete, hay presencia de amebas de vida libre.
- Determinar en qué punto de los canales de regadío de la zona agrícola de Cañete, hay presencia de amebas de vida libre.

1.4. Justificación:

Existen muy pocos estudios para establecer la presencia de AVL en el ambiente en nuestro país, el presente trabajo de investigación se basa en conocer el estado del agua en zonas ambientales de la provincia de cañete. Esta evaluación es para determinar los morfotipos de AVL en estas localidades, pero además es una exploración ambiental para establecer la presencia de *Acanthamoeba*, *Naegleria* y posiblemente *Balamuthia*.

Actualmente, no se conoce la presencia de amebas de vida libre potencialmente patógenas en las zonas de cañete.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Bases Teóricas:

Los protistas son organismos eucariotas por lo general unicelulares, pero algunos con más de dos núcleos, son de tamaño variable, de 0.02mm a 100mm. Por su forma, pueden ser esféricos, ovoides, de simetría, bilateral o polimorfos, como las amebas en estadio de trofozoíto, que no tienen forma consistente debido a su citoplasma en movimiento constante (5).

Los protistas presentan estructuras de locomoción como, flagelos, cilios, pseudópodos y membrana ondulante. Existe el estadio de trofozoíto el cual es el infeccioso, y también pueden presentar estadio de quiste, que es su forma de resistir las condiciones adversas. La reproducción en los protistas puede ser asexual y sexual. La primera es la más simple y se produce por fisión binaria longitudinal (*Trypanosoma*) o transversal (*Balantidium*), tras división del núcleo por mitosis, amitosis o formas intermedias. Las amebas se dividen por fisión binaria, pero en algunas ocasiones hay divisiones múltiples. Recientemente se ha especulado la posibilidad de reproducción sexual en amebas de vida libre (6).

Algunas de las amebas de vida libre (AVL) son un grupo de protistas anfitriónicos causantes de enfermedades en el ser humano de curso diverso, que afectan preferentemente al sistema nervioso central (SNC) neurotrópicos, también causan infecciones cutáneas en individuos sanos e

inmuno-suprimidos (1,3,6) y más recientemente rinosinusitis ha sido descrito (7,8,9). Los géneros conocidos causantes de enfermedades en humanos y animales son: *Acanthamoeba sp.*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia pedata* (1,3). Ha habido múltiples criterios de clasificación, pero en esta ocasión seguiremos el esquema de Adl et al., 2005 (10)

Los Protistas estaban agrupados en cuatro grupos: Sarcodina (amebas); Mastigóforos (flagelados); Sporozoa (además de las formas esporas protozoos parásitos); y Infusoria (ciliados). Pero recientemente, la Sociedad Internacional de Protozoología abandonó a la taxonomía clásica y creó un nuevo sistema basado sobre los enfoques morfológicos actualizados empleando vías bioquímicas y filogenética molecular (Adl et al 2005) (10). De acuerdo con este nuevo esquema, los eucariotas se han clasificado en seis grupos o 'Super Grupos': Amoebozoa, Opisthokonta, Rhizaria, Archaeplastida, Chromalveolata y Excavata. **Acanthamoeba y Balamuthia mandrillaris** se incluyen en el Super Grupo Amoebozoa (Acanthamoebidae); **Naegleria fowleri** bajo Súper Grupo Excavata (Heterolobosia, Vahlkampfiidae) y Sappinia bajo Súper Grupo Amoebozoa (flabellinea, Thecamoebidae) (Smirnov et al., 2005) (11).

Order Centramoebida Rogerson and Patterson, 2002 em. Cavalier-Smith, 2004 Family Acanthamoebidae Sawyer and Griffin, 1975. Acanthamoeba, Protacanthamoeba Family Balamuthiidae Cavalier-Smith in Cavalier-Smith et al., 2004. Balamuthia (12, 13)
--

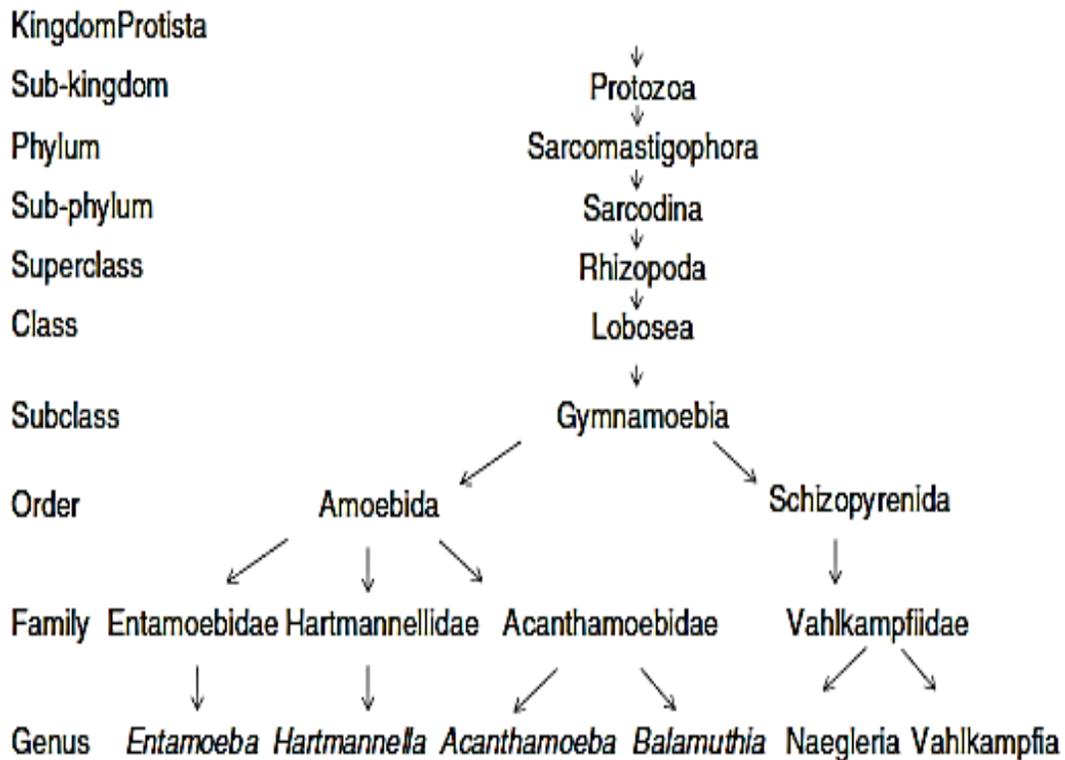


Fig N° 1: Clasificación actualizada de las amebas patógenas para humanos, Tomado de: Smirnov et al., 2005

Las Amebas se caracterizan porque se mueven por medio de prolongaciones citoplasmáticas (pseudópodos), que se proyectan y retraen en respuesta de estímulos externos (11). Los parásitos comensales obtienen beneficios del huésped que aloja proporcionándoles alimento, y permitiéndoles reproducirse, pero no perjudican ni ayudan al huésped. Las amebas de vida libre son parásitos facultativos, o sea que no necesitan para vivir la presencia obligada de un huésped. Se las encuentra distribuidas por todo el mundo y

en su forma libre habitan en aguas dulces, salobres, termales y agua de mar, además del sedimento de mar. (14).

El género *Acanthamoeba* sp. se compone de diversas especies, algunas son patógenas a humanos y animales, pueden ser considerados oportunistas cuando infectan personas inmunosuprimidas (SIDA o pacientes crónicos), cepas como: *A.castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis*, y *A. divionensis* (15); sin embargo recientemente se ha clasificado a las *Acanthamoeba* por genotipado molecular, hoy en día existe el genotipo T1- T20 (15,16, 17).

Sólo algunos de ellos han sido relacionados a enfermedades en humanos. Algunos genotipos pueden producir queratitis (compromiso de la vista, por destrucción de la córnea), la dermatitis amebiana, infección producida por abrasiones cutáneas en contacto con aguas o suelos contaminadas, otros casos afectan pacientes inmuno-suprimidos llegando a provocar una infección crónica afectando el SNC conocida como meningoencefalitis granulomatosa amebiana MEG (4); y muy recientemente descrita es la rinosinusitis (18, 19).

Naegleria fowleri, los trofozoítos corresponden a estructuras ameboideas que en preparaciones frescas miden 10 a 15 μ de diámetro mayor, tienen un abundante citoplasma vacuolados o granular, y un gran núcleo central, claro y redondo con un nucléolo esférico y refringente; el movimiento, se realiza a través de seudópodos redondeados o lobopodios, de tamaño variable. se halla en ambientes de aguas dulces como predador de bacterias (14). En los

cuerpos de agua que están entre temperaturas aproximadas de 20-27°C de lagos, piscinas y estanques podrían contener la forma vegetativa de *N. fowleri*. Los hábitats mejor conocidos para las amebas son: **El suelo**, puede ser un excelente medio para la conservación de estos protistas, nutrientes del suelo favorecen la supervivencia las amebas son la humedad, la consistencia, pH, temperatura y composición (humus, arcilla, etc.); **El agua**, puede actuar como vehículo para muchos tipos de parásitos, y es necesaria para que los parásitos completen su ciclo biológico por alojar y/o desarrollar huéspedes intermediarios. En el caso de las amebas de vida libre, este es el medio donde suelen vivir mucha parte del su ciclo biológico, por ello son habitantes innatos de los cuerpos de agua; **Condiciones geográfico-climáticas**, la humedad, las lluvias, la temperatura, la vegetación, la latitud, la altitud, etc. pueden favorecer o reducir el desarrollo de amebas de vida libre, puede determinarse en algunos casos la distribución geográfica de los protistas como las amebas, pero recientemente se ha identificado que son capaces de sobrevivir en las condiciones más desfavorables (14).

Enfermedades infecciosas provocadas por amebas de vida libre.

Las infecciones producidas por AVL están circunscrito a cuatro géneros: *Acanthamoeba sp.*, *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris* y *Sappinia sp.* En todos los casos, la infección se debe al contacto con suelos o agua contaminada por estos protozoos. Como es habitual en las infecciones parasitarias, las manifestaciones de la infección dependen del estado de

inmunocompetencia del hospedador. Así las amebas patógenas de este grupo (excepto *Naegleria fowleri*) ocasionan en el paciente inmunodeprimido una meningoencefalitis con peculiaridades dependiendo del género implicado (afectación cutánea o sinusal, presencia o no de granulomas). En el paciente inmunocompetente, los dos cuadros clínicos más característicos son la queratitis asociada a lentes de contacto (por *Acanthamoeba sp.*) y la meningoencefalitis amebiana primaria por *Naegleria fowleri* (en buceadores) (1,)

Acanthamoeba: Una de las amebas de vida libre más abundantes en el ecosistema y que con frecuencia es posible aislarla de casi cualquier hábitat, es causante de una serie de 5 presentaciones clínicas bien definidas: queratitis, diseminación sistémica, lesión por compromiso cutáneo, rinosinusitis y Meningoencefalitis granulomatosa, este último es una entidad rara pero con una alta letalidad. Los genotipos capaces de producir Infecciones en humanos son los de *Acanthamoeba* (genotipos T1,T2a,T4,T5,T10,T12). Perú, describe solo algunos casos limitados a la costa (20).

Los casos de MEG suelen ser fatales muchas veces, los pacientes se infectan del medio ambiente, ya sea por nadar o estar expuesto al polvo, y algunas veces el sistema inmune podría encontrarse en un estado no óptimo. Cualquiera sea el mecanismo empleado por la *Acanthamoeba*, es muy difícil de identificar la infección debido a que suele parecer casi cualquier

enfermedad, pocos test de identificación existe comercialmente y el clínico debe ser muy perspicaz.

Los pacientes debutan con cefalea intensas y sin origen claro, entran en estado de estupor y ***N. fowleri*** Es causante de un cuadro clínico extremadamente severo y mortal conocido como meningoencefalitis amebiana primaria (MAP), el cual consiste un daño del SNC con necrosis y hemorragia cerebral multifocales, produciendo la muerte en niños y jóvenes adultos sanos (21), que están asociados a la natación y baños. Este ingresa por la cavidad nasal y por conducción del nervio olfatorio llega al SNC produciendo MAP (22); los primeros síntomas son cefaleas intensas, rigidez de nuca, vómitos, fiebre alta y posteriormente anormalidades neurológicas como fotofobia, letargia, convulsiones, confusión y luego de 5-7 días en promedio desde la aparición de los síntomas se produce la muerte fulminante (22).

Balamuthia mandrillaris es una AVL patógena emergente de humanos y animales (1,3,6), causante de graves infecciones cutáneas centro faciales (24) y meses después se desarrolla una EGA similar a la producida por *Acanthamoeba sp.* (24,25) en personas sanas e inmunosuprimidas asociados a la interacción con lagos y ríos con quistes o trofozoítos que ingresan presumiblemente por la cavidad nasal o la piel (20, 25).

Es muy importante establecer lugares y centros donde podría existir un considerable número de protistas altamente patógenos.

2.2. Antecedentes:

2.2.1. Antecedentes Internacionales:

El número de casos reportados de MEG por *Acanthamoeba* a nivel mundial se estima aproximadamente en 200 casos para infección sistémica y más de 3000 casos reportados para queratitis amebiana (1,3). En centro América se han aislado amebas de vida libre en pozas, piscinas y lagos de El Salvador (26), se encontraron AVL en dos muestras de agua tomadas del fondo de piscinas con agua clorada, y en una muestra tomada del fondo de otra piscina de agua no clorada (26). Al sur del continente, Astorga et al., 2011, reportan el primer informe de los genotipos T3, T4 y T11 de *Acanthamoeba* en unidades de aire acondicionado de Chile (27). Recientemente Argentina ha reportado solo dos casos por *Acanthamoeba* queratitis (28,29). Brasil dispone de mucha más información respecto a la presencia de *Acanthamoeba* en el medio ambiente (30, 31, 32, 33). Detección de Amebas patógenas del género *Acanthamoeba* por PCR en cuerpos de agua recreativos en el estado de San Luis Potosí, México, Ortíz et al., 2004., Colectaron 74 muestras se procesaron por los métodos convencionales para detectar organismos pertenecientes al género *Acanthamoeba*. Se identificaron amibas patógenas del género *Acanthamoeba* del ambiente. La presencia de amebas del género *Acanthamoeba* en los cuerpos de agua estudiados, representa un

riesgo potencial de salud pública (34).

La búsqueda de ambas de vida libre por parte de los grupos de investigación de México ha llevado a encontrar muchas hábitats de las amebas, los recientes trabajos de Ramírez et al., 2006, 2012 así lo ponen de manifiesto, pero muchos otros estudios de la república mexicana han demostrado la gran diversidad de estas amebas en el país centroamericano (35, 36, 37, 38).

En general, existe poca información y solo algunos países como Brasil y México disponen de información relevante tanto en casos clínicos como en la búsqueda del medio ambiente.

2.2.2. Antecedentes Nacionales:

En nuestro país, los casos por *Acanthamoeba* solo llegan a ser un puñado de casos reportados, Sin embargo la historia de los casos por *Balamuthia mandrillaris* en Perú, son llamativamente superiores respecto a otros países de la región sudamericana.

En el Perú se han presentado casos de infección por AVL desde 1957, cuando Delgado y Águila Pardo publican el primer caso de abscesos amebianos cerebrales y meningoencefalitis sin compromiso hepático ni pulmonar (39). Takano en 1976 reportó 3 casos observados de

encefalitis en 2 hospitales de Lima (Takano, 1976) (40). Posteriormente en 1979 el doctor Albuja P. reportó un caso de meningoencefalitis en Trujillo causado por *Acanthamoeba sp.* (41). En los años 90 siguieron apareciendo los casos: en 1996 se reportó 4 casos de acanthamoebiasis cerebral en el Servicio de Anatomía Patológica en el instituto de salud del niño por el Dr. Narváez (42).

El Dr. Galarza también reportó; en 1997 (43) ,un caso de amebiasis cutánea en el Hospital Nacional Dos de Mayo de Arequipa; en 1998, el caso de una niña de 9 años con desarrollo de una encefalitis por *Acanthamoeba sp.* y en el 2006, 4 casos de lesiones cutáneas causados por *Acanthamoeba sp.* (3 pacientes inmunosuprimidos y uno inmunocompetente) (44). En el 2003 se reportó el caso de un niño de 13 años con lesiones cutáneas y EGA probablemente por *Balamuthia mandrillaris* (Ballona et al., 203) (45). En el año 2006 se presentó el caso de una mujer de 21 años de Lima-Perú con lesiones cutáneas y afección del SNC con EGA por *B. mandrillaris* y se trató con fluconazol, miltefosine y albendazol resultando en la recuperación exitosa del paciente (44).

Recavarren et al., 1999, Campos et al., 1999, Gotuzzo et al., 2000, Bravo y Seas 2012, Describen casos de Balamuthia, muchos de estos casos han sido referidos al CDC en su momento y fueron

identificados como *Balamuthia* por Inmuno-histoquímica y PCR (46, 47, 48, 49)

Cabe resaltar que no se han descrito casos de MAP por *Naegleria fowleri* en el Perú.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

3.1. Diseño del Estudio:

Estudio descriptivo de tipo transversal.

3.2. Población:

Agua de 3 canales de regadío de la Provincia de Cañete; Perú: canal San Miguel, canal María Angola y canal Viejo de Nuevo Imperial; durante el mes de agosto del 2015.

3.2.1. Criterios de Inclusión:

- Agua de las orillas de los canales de regadío.

3.2.2. Criterios de Exclusión:

- Agua contaminada con productos químicos proveniente de relaves mineros.
- Agua contaminada con tierra, producto de desprendimientos por huaico.

3.3. Muestra:

Se recolectaron 18 muestras de agua (6 muestras de cada canal de regadío) de la Provincia de Cañete, durante el periodo descrito. Se empleó el muestreo no probabilístico por conveniencia.

3.4. Operacionalización de Variables:

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Escala de medición	Forma de registro
<u>Principal:</u> Amebas de vida libre	Organismos unicelulares	Microscopio	Binaria	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia • Ausencia
<u>Secundarias:</u> Tipos de Amebas de vida libre	Organismos unicelulares	Microscopio	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • Naegleria • Acanthamoeba • Balamuthia • Hartmannella • Leptomyxa
Canal de regadío	Canal de regadío de donde se obtuvo la muestra de agua.	Ficha de recolección de datos	Binaria	<ul style="list-style-type: none"> • Canal San Miguel • Canal María Angola • Canal Viejo de Nuevo Imperial
Lugar de muestreo	Punto del canal de regadío en el que se	Ficha de recolección de datos	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> • Inicio • Intermedio • Final

	tomará la muestra.			
pH	Medición de acidez o alcalinidad de una disolución.	Tira reactiva	Continua	<ul style="list-style-type: none"> • > 4,5 • ≤ 4.5
Temperatura (aire y suelo)	es la medida de la energía térmica de una sustancia	Macroscópica	Continua	<ul style="list-style-type: none"> • 0 - 25 • 25 - 32

3.5. Procedimientos y Técnicas:

A. Observación microscópica de las cepas: Se evaluó la presencia de quistes y/o trofozoítos compatibles a *Acanthamoeba sp* y *Naegleria sp*.

B. Siembra de las cepas en cultivos monoxénicos: Se sembraron las 9 muestras / cepas en cultivos frescos con *E. coli* (48 horas) en un agar no nutritivo.

C. Preparación de los medios de cultivo axénicos:

Se prepararon los medios de cultivo:

Agar no nutritivo:

La muestra que se colectaron del suelo, se sembraron directamente al medio de cultivo con una cantidad de 0.25gr de muestra de suelo y esta se incubó a 37°C cada 24hr se observaron la presencia de amebas de vida libre, así mismo de ser posible su visualización serán descritas.

Solución page:

Na Cl.....	120mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O.....	4mg
Na ₂ HPO ₄	142mg
KH ₂ PO ₄	136mg
CaCl ₂ x 2H ₂ O.....	4mg
H ₂ O DESTILADA.....	1000mL

La preparación de esta solución salina para amebas tiende a precipitar si no se disuelven correctamente los componentes. La solución se prepara en orden de lista en agua destilada en un frasco apropiado usando una barra magnética, aproximadamente 15 minutos entre cada componente, se esteriliza por autoclavado a 121°C por 15 minutos.

Luego de tener listo la solución Page se agregó 1.5% de agar para preparar las placas de agar no nutritivo. Paralelamente se sembro *Escherichia coli* ATCC 25922, la cual será fuente de alimento para las amebas.

Proteosa Peptona Yeast Extrac Glucose (PYG) para *Acanthamoeba* sp.

- Bacto Casitona: para el cultivo axenicos de *Naegleria sp* usando agua destilada estéril y 2% de digerido pancreático de caseína más 10 % de suero bovino fetal inactivado.

D. Descripción de morfotipos amebianos: Se describieron la presencia de amebas empleando el manual de Page de 1988 y 1991.

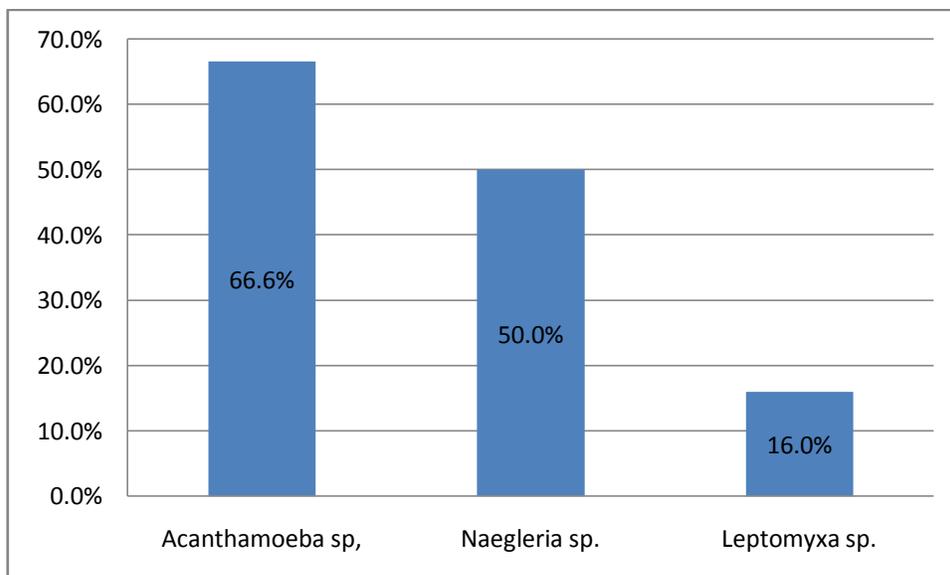
3.6. Plan de Análisis de Datos:

Los datos fueron recolectados en fichas pre-elaboradas y luego fueron ingresados en el programa Microsoft Excel, donde se elaboraron tablas comparativas de acuerdo a las variables de estudio. No fue necesario emplear un programa estadístico, debido a que en este estudio se describen los hallazgos en el estudio de 18 muestras de agua.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

Se analizaron 18 muestras tomadas en la rivera del río Cañete; correspondiente a 3 canales de regadío como son: Canal San miguel que esta a 28 m.s.n.m., Canal María Angola estando a 91 m.s.n.m., Canal viejo de Nuevo Imperial que esta a 154 m.s.n.m. y dentro de los puntos de recolección de muestras no presenta variación significativa teniendo en cuenta que la provincia de cañete esta ubicada en la zona costera al sur de Lima. Dichos puntos de toma de muestra son: 2 muestras de Montejato, 2 muestras de chilcal, 2 muestras de Las viñas, 2 muestras de Boca toma – La fortaleza, 2 muestras de Charapito-Imperial, 2 muestras de San Benito, 2 muestras de El túnel grande, 2 muestras de Roma , 2 muestras de Puente Negro-Quilmaná.

Gráfico N° 1: Frecuencia de amebas de vida libre en canales de regadío.



Estas se procesaron para el aislamiento de ameba de vida libre. El 77.7% de las muestras mostró ser positivo a la presencia de amebas de vida libre. El 66.6% de las muestras mostro *Acanthamoeba sp*, y el 50 % de las muestras se observaron estructuras compatibles con *Naegleria sp.* y 16% (3) *Leptomyxa sp.*

Tabla N°1: Hallazgos de las muestras de Cañete,

Muestras de Cañete	30 °C ANN	37°C ANN	42°C ANN	Acanthamoeba sp / Naegleria sp	Leptomyxa 30 °C	Otras amebas
San Miguel (SM)						
Canal de San Miguel 1(A)	-	-	-	-	-	-
Canal de San Miguel 1(L)	+	-	-	+/-	-	+
Canal de San Miguel 2(A)	+	+	-	-/+	-	+
Canal de San Miguel 2(L)	+	+	+	+/+	+	+
Canal de San Miguel 3(A)	+	+	+	+/+	-	+
Canal de San Miguel 3(L)	+	+	+	+/+	+	+
María Angola (MA)						
Canal María Angola 1(A)	+	-	-	+/-	-	+
Canal María Angola 1(L)	-	-	-	-	-	-
Canal María Angola 2(A)	+	+	+	+/-	-	+
Canal María Angola 2(L)	+	+	+	+/+	-	+
Canal María Angola 3(A)	+	-	+	+/-	-	+
Canal María Angola 3(L)	+	+	+	+/-	-	+
Nuevo Imperio(NI)						
Viejo Nuevo Imperial 1(A)	+	-	-	-/+	-	+
Viejo Nuevo Imperial 1(L)	+	+	-	-/+	-	+
Viejo Nuevo Imperial 2(A)	+	-	-	-/+	-	+
Viejo Nuevo Imperial 2(L)	+	-	-	+/-	-	+
Viejo Nuevo Imperial 3(A)	+	+	+	+/+	-	+
Viejo Nuevo Imperial 3(L)	+	+	+	+/+	+	+

Es de interés mencionar la presencia de estructuras típicas de *Vermamoeba (Hartmannella) vermiformis* en las muestras de agua, pero no en el lodo, sin embargo si se observó estructuras típica de *Leptomyxas* a los 30 días de cultivo y solo en muestra de Lodo.

Figura N° 1: Formas variadas de los quistes de Acanthamoeba sp.

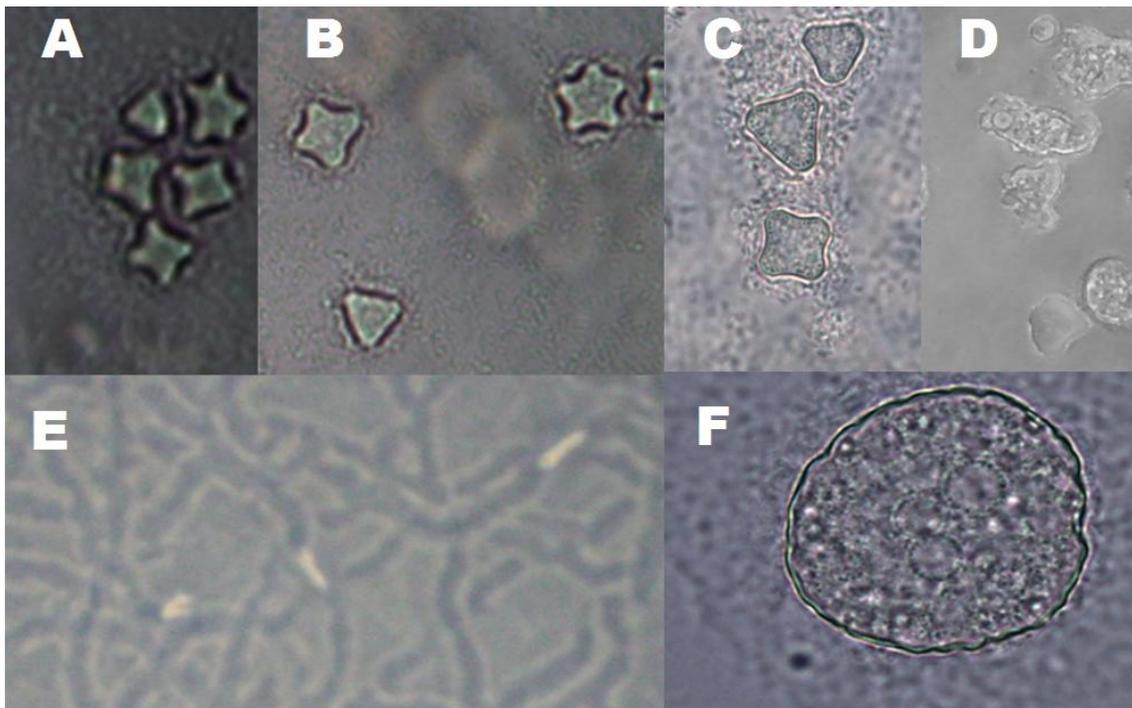


Figura N°1: Formas variadas de los quistes de Acanthamoeba sp. A y B) Quistes en forma de estrellas y triángulos (Canal de San Miguel 2(L)), C) Quistes de Canal María Angola 2(L), D) Trofozoíto de la muestra, E) trofozoíto en agar [cortesía del Dr. Cabello-Vílchez], F) quiste gigante de amoeba sp. *Insertae Sedis (taxonomía incierta)*

Las muestras fueron incubadas a 30, 37°C (a temperatura corporal), y 42°C para establecer si son potencialmente patógenas. 55.5% (10) fueron capaces de crecer a 37°C y el 50% a 42°C, principalmente las de la familia Vahlkampfiidae.

Tabla N° 2: Clasificación de amebas por sus morfotipos y la familia.

Clonas de AVL	ANN	Acanthamoeba Grupo Morfológico	Valkhamphiae
San Miguel 1(A)	0	0	0
San Miguel 2(A)	+	0	+
San Miguel 3(A)	+	II	+
San Miguel 1(L)	+	II	0
San Miguel 2(L)		I	+
San Miguel 3(L)	+	II	+

María Angola 1(A)	+	II	0
María Angola 2(A)	+	II	0
María Angola 3(A)	+	II	0
María Angola 1(L)	0	0	0
María Angola 2(L)	+	II	+
María Angola 3(L)	+	II	0
Nuevo Imperial 1(A)	+	0	+
Nuevo Imperial 2(A)	+	0	+
Nuevo Imperial 3(A)	+	I	+
Nuevo Imperial 1(L)	+	0	+
Nuevo Imperial 2(L)	+	II	0
Nuevo Imperial 3(L)	+	II	+

Acanthamoeba sp, 10 cepas correspondieron al grupo II y solo 2 cepas al grupo I.

Naegleria sp. 10 cepas corresponden al género *Naegleria sp*, por la presencia del estado biflagelados.

Leptomyxa sp, solo en 3 muestras observamos la presencia de amebas complejas como estas.

También se observó muchas otras amebas de tamaño variado desde 5-6µm hasta 10-12µm, estas podrían pertenecer a los grupos de Acrasida:

Order Acrasida (Schroeter 1886) Page and Blanton 1985 (50)

1. Family Acrasidae (Van Tieghem 1880) Olive 1970 (51), Genera: ***Acrasis***,

Pochenia

2. Family Guttulinopsidae Van Tieghem 1880, Genera: ***Guttulinopsis***, ***Rosculus***

3. Family Gruberellidae Page and Blanton 1985, Genera: *Gruberella*,

Stachyamoeba Aunque el número de estas amebas es bajo, han sido visualizados con un poco de cuidado

Figura N° 2: Quiste de *Leptomyxa* sp

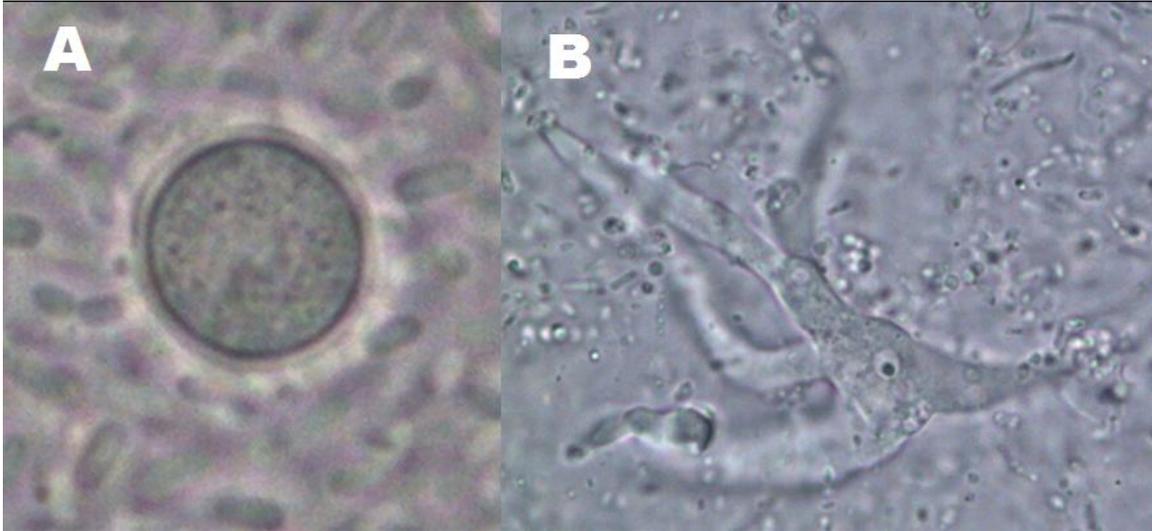


Figura N°2: A) Quiste de *Leptomyxa* sp cepa [VNI-15], B) Trofozoíto de *Leptomyxa* sp. Muestras correspondientes a canal Viejo nuevo Imperial 3(L).

Los quistes de *Leptomyxas* sp. son alrededor de 60 μ m de diámetro, los trofozoitos miden alrededor de 80-95 μ m. lo que es incompatible con *Balamuthia* mandrillaris.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

La cuenca del río Cañete, sobre la cual se ha llevado a cabo esta tesis, presenta un fuerte gradiente altitudinal que se origina del deshielo de los glaciares del nevado Ticlla, en la vertiente occidental de los Andes Centrales del Perú a 4830 m s.n.m., hasta su desembocadura en el Océano Pacífico. A lo largo de este gradiente, el río discurre por tres grandes ecorregiones, según Brack (1986): el desierto del Pacífico desde el nivel del mar hasta los 1000 m s.n.m., la serranía esteparia, entre los 1000 y los 3500 m s.n.m. y la puna, por encima de los 3500-3800 m s.n.m. Los sistemas fluviales son parte del área de estudio de esta tesis (52,53)

La búsqueda de microorganismos potenciales patógenos, como los protozoarios en el río Cañete nunca han sido estudiados. Las amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* miden de 10 a 40-45 μm de diámetro, son habitantes comunes de ambientes acuáticos, están entre los protozoos más prominentes en el suelo. El género contiene unas 24 especies, y se sabe que *A. castellanii*, *A. polyphaga* y *A. culbertsonii* son patógenas para el ser humano. No obstante, la clasificación taxonómica del género ha sufrido cambios substanciales con los nuevos conocimientos sobre la biología molecular de estos microorganismos. Las especies de *Acanthamoeba* presentan un trofozoíto con capacidad de alimentarse y replicarse, que en condiciones desfavorables, como en un medio anaerobio, se transforma en un quiste latente que puede soportar temperaturas extremas (de -20 a 56 °C), la desinfección y la desecación.

En nuestro estudio hemos encontrado la presencia de amebas de vida libre

como *Acanthamoeba sp.* en las muestras de suelo y agua del río Cañete. Los microorganismos del género *Acanthamoeba* y otras amebas están distribuidos ampliamente en el medio natural, de modo que son fuentes potenciales el suelo, el polvo atmosférico y el agua natural. Pueden encontrarse en muchos tipos de medios acuáticos, como aguas superficiales, agua de grifo, piscinas y soluciones de lentes de contacto. Diferentes especies de *Acanthamoeba* pueden proliferar en aguas a muy diversas temperaturas; la temperatura óptima para las especies patógenas es 30 °C. El agua puede contener trofozoítos con capacidad de replicarse, que se alimentan de bacterias, levaduras y otros microorganismos. Se suelen presentar las infecciones en la mayoría de las regiones templadas y tropicales del mundo.

En las muestras analizadas por nosotros encontramos una amplia gama de microorganismos de vida libre, desde amebas hasta flagelados, sin embargo el objetivo de nuestro estudio ha sido la búsqueda de amebas potencialmente patógenas.

En nuestro país existe muy pocos estudios referidos a la búsqueda de estos patógenos en el medio ambiente y en las zonas costeras del Perú.

La presencia de la familia Vahlkampfiidae en las muestras ambientales muestran una alta probabilidad de que sean del género *Naeglerias sp.* una de las dificultades en nuestro estudio ha sido la de establecer la diferencia entre *Vahlkampfia* y *Naeglerias sp.*, debido a la falta de herramientas moleculares para establecer su filogenia. En la fig N°4, observamos las formas típicas de *Willaertia sp.*, una ameba de vida libre de morfología muy similar a *Vahlkampfia* y *Naegleria sp.*, sin embargo las dimensiones son algo mayores (54, 55)

La familia Acanthamoebidae, en el cual es miembro Acanthamoeba sp, esta ameba como se aprecia en la Fig N° 3, posee varias formas en los quistes

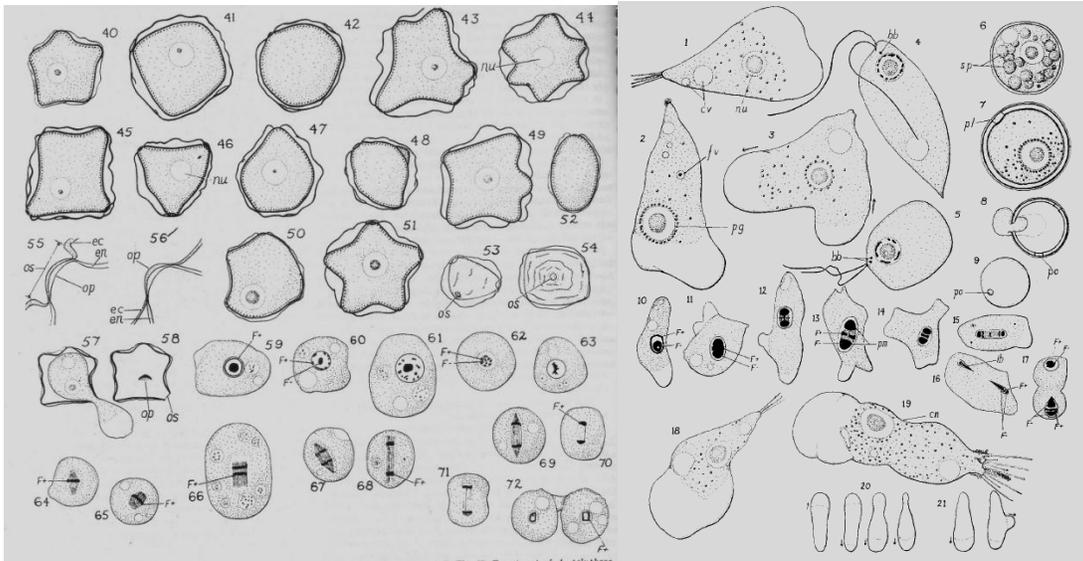


Figura N° 3: Formas de quistes de Acanthamoeba sp. y de trofozoítos y quiste de Naegleria sp. en cultivos, Tomado de Page F., 1967. (56)



Figura N°4: *Willaertia sp* Tomado de: De Jonckheere DG, et al. *Willaertia magna* gen. nov., sp. nov. (Vahlkampfiidae), a thermophilic amoeba found in different habitats. Protistologica 20: 5-13, 1984. (57)

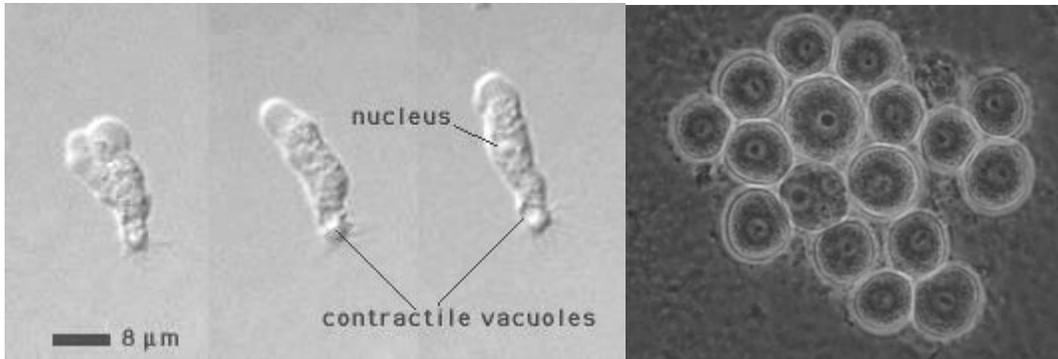


Figura N° 5: Otro miembro de la familia Vahlkampfiidae es *Vahlkampfia jugosa*, morfológicamente indistinguible de *Naegleria fowleri*, excepto por la alta patogenicidad de esta última en modelo animal tomado de Page 1988 ()

Como se observa en las imágenes es muy difícil establecer especies debido a que son indistinguibles morfológicamente a pesar de que pueden existir diferencias sutiles en los tamaños y vacuolas y algunas otras características como movimiento y tiempo de crecimiento.

La presencia de estructuras compatibles con *Leptomyxa sp*, han sido difícilmente descritas en el Perú, no existe grupos de investigación al respecto.

Es importante observar las formas típicas de *Leptomyxa* y diferenciarlas con respecto a *Balamuthia mandrillaris*.

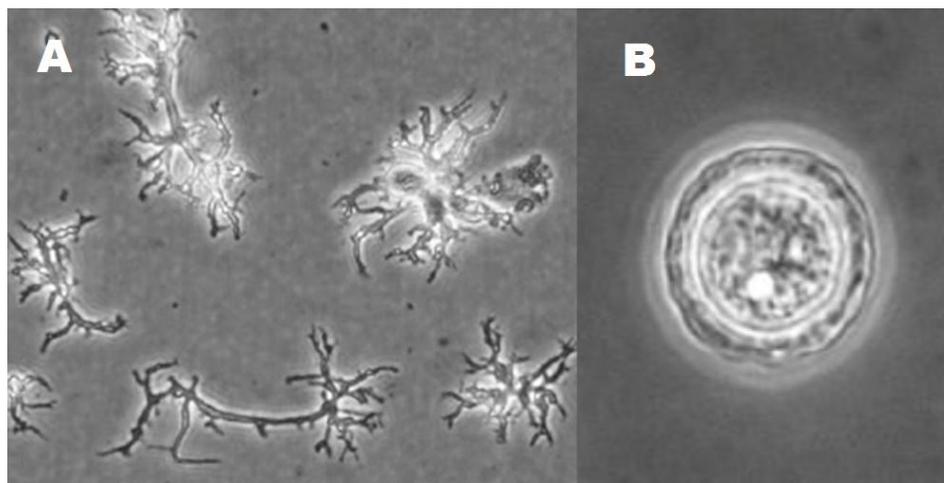


Figura N° 6: *Balamuthia mandrillaris* en cultivo axénico.

La importancia de esta ameba es que morfológicamente se parece a *Balamuthia mandrillaris*, una ameba de vida libre de importancia en el Perú debido a su tasa de letalidad que llega a ser más del 90% (58, 24, 25, 49).

Podemos hacer una comparación de las formas de estas amebas y sin embargo ambos géneros pueden confundirse, las herramientas moleculares nos ayudan significativamente en este campo de la protozoología clínica.

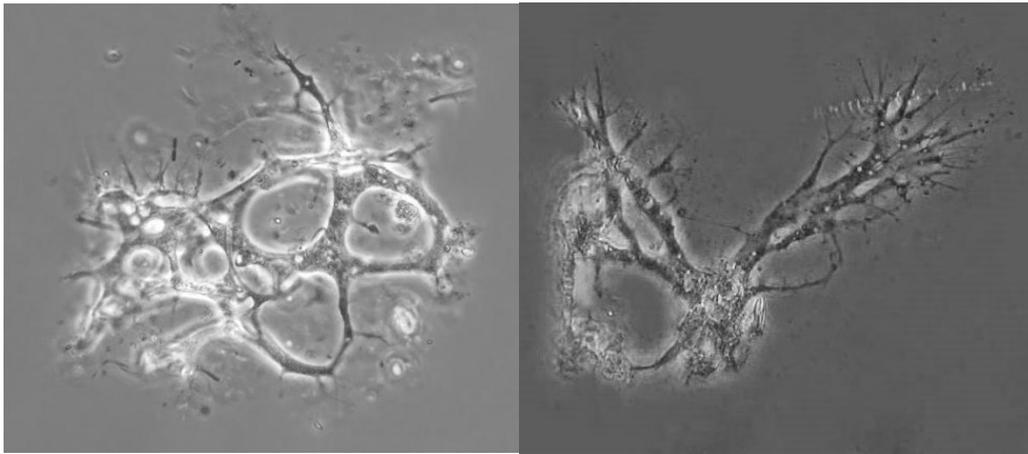


Fig N°7: *Leptomyxa reticulata* 400 μm – fotografía por Angie Opitz, Tirol, Austria.

***Acanthamoeba* sp:**

Las amebas del género *Acanthamoeba* tienen la capacidad de vivir como microorganismos de vida libre en la naturaleza y ocasionalmente invadir a un hospedero y vivir como parásitos dentro de él. Los tipos de infecciones más comunes producidas por *Acanthamoeba* spp. incluyen Encefalitis Amebiana Granulomatosa EAG, infecciones diseminadas (cutáneas y nasofaríngeas), *Acanthamoeba* diseminada, Rinosinusitis y Queratitis (59, 60, 61, 62).

La ruta de invasión al SNC en los casos de EAG es probablemente a través de las

vías respiratorias inferiores. Los síntomas clínicos característicos de esta patología, están las alteraciones en el estado mental, cambios en el comportamiento, convulsiones, cefalea, afasia, fiebre, rigidez de cuello, alteración de la visión, anorexia, náuseas y vómitos, ataxia, coma y muerte. La EAG está generalmente asociada a enfermos crónicos por tumores malignos, lupus, diabetes mellitus, falla renal, cirrosis, tuberculosis, entre otros. El pronóstico en estos pacientes suele ser muy pobre, la tasa de mortalidad bordea el 98% con o sin tratamiento, aún se desconoce una terapia que pueda ser recomendada.

Naegleria fowleri:

El género *Naegleria* está formado por ameboflagelados de vida libre ampliamente distribuidos en el medio ambiente. *N. fowleri* es la única especie infecciosa al humano. Las especies del género *Naegleria* tienen tres estadios: trofozoíto, flagelado y quiste. El trofozoíto (de 10 a 20 μm) se desplaza gracias a la emisión explosiva de pseudópodos, se alimenta de bacterias y se reproduce mediante fisión binaria. *Naegleria fowleri* causa meningoencefalitis amebiana primaria (MAP) en personas sanas. La ameba penetra en el cerebro atravesando la mucosa olfativa y la lámina cribosa. La enfermedad es aguda y los pacientes sucumben a los 5 a 10 días, muchas veces antes de que se pueda diagnosticar el agente infeccioso y en términos generales en las necropsias se identifica el agente causal. Perú no reporta casos de *N. fowleri*, se desconoce la razón, pero podría deberse a que los clínicos no realizan las necropsias y esto porque no hay políticas que permitan realizarlas sin que perjudique la práctica profesional del médico (63, 64, 65).

Balamuthia mandrillaris: Pocas enfermedades infecciosas del sistema nervioso central (SNC) portan tan pobre pronóstico y causan en el médico tal sensación de pesimismo e impotencia como las producidas por las amebas de vida libre (66). ***B. mandrillaris*** es otra ameba de vida libre que también causa encefalitis amebiana granulomatosa, con la diferencia de que la causa tanto en inmunodeficientes como en inmunocompetentes. Es más patógena y que puede ingresar al organismo de la misma forma que *Acanthamoeba*, ya sea por vía respiratoria, pulmonar o por vía cutánea, resultando en múltiples focos de infección. Los pacientes sucumben a la enfermedad entre 2 meses y 2 años, esto implica una infección crónica y de muy pobre pronóstico, en Perú se ha reportado como una de las amebas de mayor prevalencia a nivel continental después de EEUU.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES

1. Se ha detectado la presencia de amebas de vida libre en el 77,7% de las muestras de agua de regadío de la zona agrícola de Cañete.
2. El 66.6% de las muestras mostro *Acanthamoeba sp*, y el 50 % de las muestras se observaron estructuras compatibles con *Naegleria sp.* y 16% *Leptomyxa sp.*
3. Se ha detectado la presencia de amebas de vida libre en 3 canales de regadío de la Provincia de Cañete: canal San Miguel, canal María Angola y canal Viejo de Nuevo Imperial.
4. Se ha determinado mayor frecuencia de amebas de vida libre en el intermedio y final de los canales de regadíos de la zona agrícola de Cañete.

CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES

- Se recomienda tener en cuenta estos hallazgos, pues es importante para cuando se presenten posibles casos de encefalitis, deben ser estudiados con precaución y criterio.
- Se recomienda a las instituciones de salud y educación superior hacer inspecciones microbiológicas con el fin de evaluar posibles brotes o infecciones accidentales.
- Se recomienda tener en cuenta la presencia de estas amebas en las zonas agrícolas de cañete y alertar a los clínicos en caso se presente casos de encefalitis sin que se detecte el agente causal.
- Se recomienda implementar un programa de capacitación donde se brinde charlas a los pobladores aledaños a los canales de regadíos, con el fin de evitar posibles infecciones.
- Se recomienda realizar más investigaciones al respecto en la provincia de Cañete, debido a que no hemos podido establecer si estas amebas son altamente patógenas para humanos o si son no patogénicas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of human and animals. *Int J Parasitol.* 2004; 34(9): 1001-27
- 2.- Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16(2): 273-307.
- 3.- Schuster, F.L., Yagi, S., Gavali, S., Michelson, D., Raghavan, R., Blomquist, I., Glastonbury, C., Bollen, A.W., Scharnhorst, D., Reed, S.L., Kuriyama, S., Visvesvara, G.S., Glaser, C.A.,. Under the radar: balamuthia amebic encephalitis. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48, 879–887.
- 4.- El-Fakahany AF, Fahmy RR, Mohamed AS. Free living amoebaeas opportunistic parasites in immunocompromised hosts. *J Egyp Soc Parasitol.* 1997; 27(2): 515-27.
- 5.- Saredi, Nelida. Manual práctico de parasitología médica, 1ra. Edición, Editorial Talleres Gráficos Alfa Beta, 2002, Buenos Aires – Argentina
- 6.- Schuster FL, Visvesvara GS. Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resist Updat.* 2004; 7(1): 41-51
- 7.- Teknos TN, Poulin MD, Laruentano AM, Li KK. *Acanthamoeba* rhinosinusitis: characterization, diagnosis, and treatment. *Am J Rhinol.* 2000; 14(6): 387-9.
- 8.- Cugino L, Butcher J, Hoppes W, Doyle M, Bogden C. *Acanthamoeba* sinusitis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 795.
- 9.- Qvarnstrom Y, da Silva AJ, Schuster FL, Gelman BB, Visvesvara GS. Molecular confirmation of *Sappinia pedata* as a causative agent of amoebic encephalitis. *J Infect Dis.* 2009; 199(8): 1139-42.
- 10.- Adl Sina M. The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists. *J. Eukaryot. Microbiol.*, 2005;52(5) 399–451

- 11.- Smirnov AV, Ema Chaob, Elena S. Nassonovac and Thomas Cavalier-Smith A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa). *Protist*, 2011; 62, 545–570
- 12.- Rogerson A, Patterson DJ. The Naked Ramicristate Amoebae (Gymnamoebae). In Lee JJ, Leedale GF, Bradbury P (eds) *An Illustrated Guide to the Protozoa*. 2nd edition Society of Protozoologists, Lawrence, Kansas, 2002. pp 1023–1053
- 13.- Cavalier-Smith T, Chao EE, Oates B (2004) Molecular phylogeny of Amoebozoa and evolutionary significance of the unikont *Phalansterium*. *Eur J Protistol* 40:21–48
- 14.- Page FC (1988) *A new key to freshwater and soil gymnamoebae*. Ambleside, Cumbria, The Freshwater Biological Association
- 15.- Stothard, DR, Schroeder-Diedrich, JM, Awwad, MH, Gast, RJ, Ledee, DR, Rodriguez-Zaragoza, S. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 1998; 45: pp. 45-54
- 16.- Nuprasert, W, Putaporntip, C, Pariyakanok, L, Jongwutiwes, S. Identification of a novel T17 genotype of *Acanthamoeba* from environmental isolates and T10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48: 4636-4640
- 17.- Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. haracterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *J Eukaryot Microbiol*. 2013; 60(6):626-33

18.- Teknos TN, Poulin MD, Laruentano AM, Li KK. *Acanthamoeba* rhinosinusitis: characterization, diagnosis, and treatment. *Am J Rhinol.* 2000; 14(6): 387-9.

19.- Cugino L, Butcher J, Hoppes W, Doyle M, Bogden C. *Acanthamoeba* sinusitis in a patient with AIDS. *Clin Infect Dis.* 1995; 21: 795.

20.- Cabello-Vílchez AM, Martín-Navarro CM, López-Arencibia A, Reyes-Batlle M, González AC, Guerra H, Gotuzzo E, Valladares B, Piñero JE, Lorenzo-Morales J. Genotyping of potentially pathogenic *Acanthamoeba* strains isolated from nasal swabs of healthy individuals in Peru. *Acta Trop.* 2013;130C:7-10

21.- Yoder JS, Eddy BA, Visvesvara GS, Capewell L, Beach MJ. The epidemiology of primary amoebic meningoencephalitis in the USA, 1962-2008. *Epidemiol Infect.* 2010a;138(7):968-75

22.- Grate I Jr. Primary amebic meningoencephalitis: a silent killer *CJEM.*2006; 8: 365–369

23.- Bravo F, Cabrera J, Gotuzzo E. Cutaneous manifestations of infection by free living amebas, with special emphasis on *Balamuthia mandrillaris*. En: Tyring SK, Lupi O, Henage UR, eds. *Tropical Dermatology*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2006: 49-56.

24.- Bravo FG, P.J. Alvarez and E. Gotuzzo. *Balamuthia mandrillaris* infection of the skin and central nervous system: an emerging disease of concern to many specialties in medicine. *Curr Opin Infect Dis.* 2011; 24(2):112-7

25.- Seas C, MD, FIDSA, Bravo F, MD. Free-living amebas. *Up To Date* 2015

26.- Castillo de Mena, Santos H, Cerna de López, Torres de Castillo, Portillo de Juárez, Rosales Q. *Revista CREA CIENCIA.* 2011; 7,(11) 6-10, disponible en :

<http://www.redicces.org.sv/jspui/bitstream/10972/531/1/6-10.pdf>

27.- Astorga B, Lorenzo-Morales J, Martín-Navarro CM, Alarcón V, Moreno J, González AC, Navarrete E, Piñero JE, Valladares B. *Acanthamoeba* belonging to T3, T4, and T11: genotypes isolated from air-conditioning units in Santiago, Chile. *J Eukaryot Microbiol.* 2011; 58(6):542-4

28.- Menghi C, Caride MC, Gatta C. *Acanthamoeba* sp.: a case report in a non-contact lens wearer. *Rev Argent Microbiol.* 2012; 44(4):275-7

29.- Gertiser ML, Giagante E, Sgattoni E, Basabe N, Rivero F, Luján H, Occhionero M, Paniccia L, Visciarelli E, Costamagna SR. *Acanthamoeba* sp. keratitis: first case confirmed by isolation and molecular typification in Bahía Blanca, Buenos Aires Province, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2010;42(2):122-5

30.- Carlesso AM, Artuso GL, Caumo K et al (2010) Potentially pathogenic *Acanthamoeba* isolated from a hospital in Brazil. *Curr Microbiol* 60:185–190

31.- Caumo K, Rott MB. *Acanthamoeba* T3, T4 and T5 in swimming-pool waters from Southern Brazil. *Acta Trop.* 2011; 117:233–235

32.- Caumo K, Frasson AP, Pens CJ et al. Potentially pathogenic *Acanthamoeba* in swimming pools: a survey in the southern Brazilian

city of Porto Alegre. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009; 103:477–485

33.- Magliano ACM, Silva FM, Teixeira MMG et al. enotyping, physiological features and proteolytic activities of a potentially pathogenic *Acanthamoeba* sp. isolated from tap water in Brazil. *Exp Parasitol* 2009; 123:231–235

34.- Ortiz, R. Detección de amibas patógenas del género *Acanthamoeba* por PCR, en cuerpos de agua recreativos en el estado de San Luis Potosí. Tesis de Maestría en Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM. 2004

35.-Ramírez Flores, E., Robles Valderrama E., Ayala Patiño R., Martínez Rodríguez B., Calidad amebológica del agua de pozos utilizados para suministro de agua potable en el Estado de Hidalgo. *Ingeniería, Revista Académica de la FI-UADY*, 2012; 16-3:219-228,

36.- Bonilla P., Ramírez E., Ortiz R., Eslava C. (2004). La ecología de las amibas patógenas de vida libre en ambientes acuáticos, Capítulo 5. En “*Microbiología Ambiental*”, Rosas I., Cravioto A., Ezcurra E. (eds.), 67- 81. INESEMARNAT. México

37.- Ramírez E., Campoy E., Matuz D., Robles E. *Acanthamoeba* isolated from contaminated groundwater. “*Journal of Eukaryotic Microbiology*”. 2006; 53(S1), S10-S11.

- 38.- Ramírez E., Robles E., Sainz M.G., Ayala R., Campoy E. Calidad Microbiológica del Acuífero de Zacatepec, Morelos, México. "Revista Internacional de Contaminación Ambiental", 2009; 25(4), 247-255.
- 39.- Delgado J, y Aguila E. Abscesos amebianos cerebrales y meningoencefalitis. Arch Peru Patol Clin. 1957; 6(1-4): 21-26
- 40.- Takano-Morón J, Cabrera J, Franco FR, Martinot CL, Meningitis amebiana primaria subaguda. Patología (Mexico city) 1976; 14: 287-297
- 41.- Albújar P Meningoencefalitis por acanthamoeba : comunicación de un caso.Revista de Neuro-Psiquiatria 1979; XLII: (3-4)137-144
- 42.- Narváez J. Encefalitis amebiana primaria granulomatosa. Diagnóstico (Perú). 1996; 35(2): 13-19
- 43.- Galarza M., Carlos; Larrea, P.; Kumakawa S., Héctor, Primer caso reportado en el Hospital Nacional "Dos de Mayo", Lima-Perú Dermatol. Perú 1997; 7 (1):65-9
- 44.- Galarza C, Gutiérrez E, Uribe M, Ramos W, Ortega A, Ávila J, Hanco J, Espinoza Y, Espinoza M, Ñavimcopa M, Gámez D. Dermatol Perú 2006;16(1):36-40
- 45.- Ballona R y Aguije M. Compromiso cutáneo en encefalitis granulomatosa amebiana fatal causada por *Balamuthia mandrillaris* Folia Dermatol. 2003; 14(1):28-30
- 46.- Recavarren-Arce S, Velarde C, Gotuzzo E, Cabrera J. Hum Pathol. 1999; 30(3):269-73.

47.- Campos P, Cabrera J, Gotuzzo E, Guillén D. Neurological involvement in free living amebiasis. Rev Neurol 1999; 9: 316-8.

48.- Gotuzzo E, Cabrera J, Bravo F, Velarde C, Delgado W, Echevarria J, Chaparro E, Campos P, Cok J, Recavarren S, Visvesvara G. Infection by *Balamuthia Mandrillaris*. Report of 30 cases at the Hospital Nacional Cayetano Heredia, Lima, Peru. Abstract 18.005. 9th International Congress of Infectious Diseases, Buenos Aires, Argentina. April 2000.

49.- Bravo FG, Seas C. Balamuthia mandrillaris amoebic encephalitis: an emerging parasitic infection. Curr Infect Dis Rep. 2012; 14(4):391-6

50.- Page F.C. and Blanton, R.L. The Hetero lobosea (Sarcodina: Rhizopoda), a new class uniting the Schizopyrenida and the Acrasidae (Acrasida). Protistologica. 1985; 21: 121-132

51.- Olive LS (1970) The Mycetozoa: a revised classification. Bot Rev 36:59–87 [Schroeter 1886, Van Tieghem 1880, Van Tieghem 1880]

52.- Brack, A. Ecología de un país complejo, pp. 175-319. En: Gran Geografía del Perú. Naturaleza y Hombre. Volumen II. Manfer- Juan Mejía Baca, Barcelona, España.1986

53.- Bardgett, R. The biology of soil – A community and ecosystem approach. Oxford University Press 2005

54.- De Jonckheere JF. The phylogenetic position of the amoeboflagellate Willaertia deduced from SSUrDNA sequences. Eur J Protistol 1997; 33: 72–76

55.- Robinson BS, Christy PE, De Jonckheere JF. A temporary flagellate

(mastigote) stage in the vahlkampfiid amoeba **Willaertia** magna and its possible evolutionary significance. Biosystems. 1989; 23(1):75-86.

56.- Page FC. Re-definition of the genus Acanthamoeba with descriptions of three species. J Protozool.1967; 14(4):709–724

57.- De Jonckheere DG, et al. Willaertia magna gen. nov., sp. nov. (Vahlkampfiidae), a thermophilic amoeba found in different habitats. Protistologica 20: 5-13, 1984.

58.- Martínez DY, Seas C, Bravo F, Legua P, Ramos C, Cabello AM, Gotuzzo E. Successful treatment of *Balamuthia mandrillaris* amoebic infection with extensive neurological and cutaneous involvement. Clin Infect Dis. 2010 Jul 15;51(2):e7-11

59.- Visvesvara G S, Moura H, Schuster F L. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: Acanthamoeba spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol 2007; 50: 1-26.

60.- Martínez A J. Infection of the central nervous system due to Acanthamoeba. Rev Infect Dis 1991; 13 Suppl 5: S399-402.

61.- Martínez A J, Visvesvara G S. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol 1997; 7: 583-98

62.- Schuster F L, Visvesvara G S. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol 2004; 34: 1001-27

63.- Grace E, Asbill S, Virga K. Naegleria fowleri: A Review of the Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment Options. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Aug 10

64.- De Jonckheere JF. What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Exp Parasitol.* 2014;145 Suppl:S2-9

65.- Budge PJ, Lazensky B, Van Zile KW, Elliott KE, Dooyema CA, Visvesvara GS, Beach MJ, Yoder JS. Primary amebic meningoencephalitis in Florida: a case report and epidemiological review of Florida cases. *J Environ Health.* 2013 Apr;75(8):26-31

66.- Seas y Bravo. Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad fatal reconocida cada vez más frecuentemente en América Latina *Rev Chil Infect* 2006; 23 (3): 197-199

Anexos I





MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	VARIABLES DE ESTUDIO	DIMENSIONES E INDICADORES	INSTRUMENTO DE MEDICIÓN	METODOLOGÍA
<p><u>Problema General:</u> ¿Existen amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete?</p>	<p><u>Objetivo General:</u> Determinar la presencia de amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete.</p>	<p><u>Variable Principal:</u> Amebas de vida libre</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Presencia • Ausencia 	Microscopía	<p><u>Diseño de Estudio:</u> Estudio descriptivo de tipo transversal.</p> <p><u>Población:</u> Aguas de 3 canales de regadío de la Provincia de Cañete; Perú: canal San Miguel, canal María Angola y canal Viejo de Nuevo Imperial; durante el mes de junio del 2015.</p>
<p><u>Problemas Específicos:</u> ¿Cuáles son los morfotipos de amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete?</p>	<p><u>Objetivos Específicos:</u> Determinar los morfotipos de amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete.</p>	<p><u>Variables Secundarias:</u> Tipos de Amebas de vida libre</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Naegleria • Acanthamoeba • Balamuthia • Hartmannella • Leptomyxa 	Microscopía	<p><u>Muestra:</u> Se pretende recolectar 3 muestras de agua de cada canal de regadío de la Provincia de Cañete, durante el periodo descrito. Se empleará el muestreo no probabilístico por conveniencia.</p>
<p>¿En qué canal de regadío de la zona agrícola de Cañete, hay presencia de amebas de vida libre?</p>	<p>Determinar en qué canal de regadío de la zona agrícola de Cañete, hay presencia de amebas de vida libre.</p>	Canal de regadío	<ul style="list-style-type: none"> • Canal San Miguel • Canal María Angola • Canal Viejo de Nuevo Imperial 	Ficha de recolección de datos	
<p>¿En qué punto de los canales de regadío de la zona agrícola de Cañete, hay presencia de amebas de vida libre?</p>	<p>Determinar en qué punto de los canales de regadío de la zona agrícola de Cañete, hay presencia de amebas de vida libre.</p>	Lugar de muestreo	<ul style="list-style-type: none"> • Inicio • Intermedio • Final 	Ficha de recolección de datos	