



**UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER**

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**“AMEBAS DE VIDA LIBRE EN LAS POZAS DE LOS BAÑOS  
TERMALES DE CHURÍN”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA  
MÉDICA EN LABORATORIO CLINICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA**

Presentado por:

**AUTOR:** MINETTO PERALTA, MARYNN YAHARA.

LIMA GARCÍA, RICHARD HUMBERTO.

**ASESOR:** Mg. BENITES AZABACHE JUAN CARLOS.

**LIMA – PERÚ**

**2016**



## **DEDICATORIA**

Dedicamos este trabajo a Dios y a nuestros padres por su apoyo y su amor constante, a nuestras familias, amigos y mentores, y finalmente a nuestra alma mater por inculcarnos valores y conocimientos que llevaremos a lo largo de nuestras vidas profesionales.

## **AGRADECIMIENTO**

Un agradecimiento especial a la Dra. Yrma Espinoza Blanco supervisora y financiadora de este proyecto así como el Lic. TM William Roldan y La Sra. Técnica en laboratorio Susana Jiménez por su apoyo invaluable durante la preparación de materiales y observación de resultados, Además al Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la UNMSM por el uso de sus instalaciones durante la ejecución de esta tesis.

**ASESOR**

Mg. Juan Carlos, Benites Azabache

**JURADO:**

**Presidente:** Dra. Tania Ivette Alvarado Santiago

**Secretario:** Lic. Cesar Augusto Plascencia Vega

**Vocal:** Lic. Yovana Milagros De La Roca Salazar

## INDICE

<b>DEDICATORIA</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTO</b>	<b>4</b>
<b>ASESOR</b>	<b>5</b>
<b>JURADO</b>	<b>6</b>
<b>INDICE</b>	<b>7</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS/GRAFICOS</b>	<b>9</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO I: EL PROBLEMA</b>	<b>12</b>
1.1. Planteamiento del problema	12
1.2. Formulación del problema	13
1.3. Justificación	13
1.4. Objetivo	14
1.4.1. General	14
1.4.2. Específicos	15
<b>CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO</b>	<b>16</b>
2.1. Antecedentes	16
2.2. Base teórica	24
2.3. Terminología básica	45
2.4. Hipótesis	46
2.5. Variables	46

<b>CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO</b>	<b>47</b>
<b>3.1. Tipo y nivel de investigación</b>	<b>47</b>
<b>3.2. Población y muestra</b>	<b>47</b>
<b>3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos</b>	<b>48</b>
<b>3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico</b>	<b>49</b>
<b>3.5. Aspectos éticos</b>	<b>49</b>
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>50</b>
<b>4.1. Resultados</b>	<b>50</b>
<b>4.2. Discusión</b>	<b>58</b>
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>62</b>
<b>5.1. Conclusiones</b>	<b>62</b>
<b>5.2. Recomendaciones</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>64</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>74</b>

## ÍNDICE DE TABLAS/GRAFICOS

<b>Tabla N° 1:</b> Resultado de examen directo según temperatura del agua en las pozas de los baños termales de Churín.....	50
<b>Tabla N° 2:</b> Resultado de cultivo a 37° C según temperatura del agua en las pozas de los baños termales de Churín.....	52
<b>Tabla N° 3:</b> Resultado de examen directo según zona de muestreo de las pozas de los baños termales de Churín.....	54
<b>Tabla N° 4:</b> Resultado de cultivo a 37° C según zona de muestreo de las pozas de los baños termales de Churín.....	56
<b>Grafico N° 1:</b> (%) examen directo en relación a la temperatura de las pozas.....	51
<b>Grafico N° 2:</b> (%) cultivo a 37° C en relación a la temperatura de las pozas.....	53
<b>Grafico N° 3:</b> (%) examen directo en relación a la zona de muestreo de las pozas.....	55
<b>Grafico N° 4:</b> (%) cultivo a 37° C en relación a la zona de muestreo de las pozas.....	57

## RESUMEN

**Introducción:** Las amebas de vida libre (AVL) han sido asociadas con infecciones oportunistas, en la actualidad existe el riesgo de infección amebiana en fuentes de agua. El objetivo de esta investigación fue determinar la presencia de amebas de vida libre en fuentes de agua termales del pueblo de Churín. Con la finalidad de establecer si estas pozas se encuentran contaminadas y así brindar datos estadísticos de la situación real de las pozas. **Material y Métodos:** Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo, transversal. Se recolectaron muestras de agua de pozas en Churín. Las 60 muestras fueron estudiadas mediante examen directo en fresco y cultivo a 37° C en agar MYAST con E.coli inactivada. **Resultados:** Del total de muestras analizadas 14 (23,3%) fueron positivas para AVL. De las muestras positivas 13 (92,85%) fueron encontrados en forma de quiste compatibles al género *Naegleria*. La mayor proporción de positividad se encontró en pozas con temperatura de 27° C. En cultivo en medio MYAST a 37° C se identificaron a 4 positivos para AVL. **Conclusión:** Se demostró la presencia de amebas en las pozas con agua termal en Churín, lo cual demuestra que ellas contienen el hábitat necesario para su desarrollo y proliferación. La existencia de *Naegleria spp.* alerta a los visitantes en estos centros de esparcimiento debido a que pueden infectarse con este protozoo.

**Palabras claves:** Amebas de vida libre, Temperaturas, Agua termal, Pozas.

## SUMMARY

**Introduction:** Free-living amoebae (AVL) have been associated with opportunistic infections; at present there is a risk of amoebic infection in water sources. The objective of this research was to determine the presence of free-living amoebae in thermal water sources in the city of Churín. In order to establish whether the wells are contaminated and provide statistical data on the actual situation of the wells.

**Material and Methods:** A descriptive, prospective, cross-sectional study. Water samples were collected wells in Churín. The 60 samples were studied by direct examination of fresh and culture at 37 ° C in MYAST agar with E. coli inactivated.

**Results:** Of the total samples analyzed 14 (23,3%) They were positive for AVL. Of the positive samples 13 (92,85%) They were found in cyst form compatible to the genus *Naegleria*. The higher proportion of positivity was found in wells with temperature of 27 ° C. MYAST in medium culture at 37 ° C were identified 4 positive for AVL. **Conclusions:** The presence of amoebae was demonstrated in the wells with thermal water in Churín. Which that they contain the necessary habitat for their development and proliferation. The existence of *Naegleria spp.* alert visitors in these recreation centers because they can be infected with this protozoon.

**Keywords:** Free-living amoebae, temperatures, thermal water, wells.

## CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

### 1.1. Planteamiento del problema

Por mucho tiempo las amebas de vida lida libre (AVL) eran consideradas como protozoarios sin importancia clínica, hasta que en el año 1965 se reportó en Australia el primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP), que afecta al hombre.<sup>1</sup> Son tres los géneros que destacan según su importancia: *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, de este grupo de amebas *Naegleria* desarrolla 3 estadios: trofozoíto; etapa utilizada por este protozoario para alimentarse y reproducirse, quiste; etapa que la protege del medio hostil y la fase flagelar que es temporal.<sup>2</sup>

*Acanthamoeba spp.*, y *Balamuthia mandrillaris* pueden causar infecciones granulomatosas diseminadas que involucran a la piel, pulmones y senos nasales; sin embargo, *Naegleria fowleri* es considerada la especie más virulenta, debido a la transmisión de trofozoitos por aspiración nasal (instilación) de aguas contaminadas.<sup>3</sup>

Existen factores que propician la infección en el hospedero, como la temperatura corporal, la respuesta inmune a nivel de mucosas y la presencia de alguna deficiencia inmunológica, en la ameba la dosis infectiva y su virulencia;<sup>2, 10</sup> y el medio: pozas, piscinas y aguas termales constituyen en conjunto un ambiente propicio de infección.

En el Perú existen centros de esparcimiento con aguas naturales temperadas (baños del inca, baños medicinales de Churín, etc.) que podrían albergar este tipo de protozooario, sin embargo no existen estudios realizados en este tipo de ambientes.

Las pozas de los baños termales de Churín, reciben diariamente en sus instalaciones visitantes de todas las edades provenientes de distintos lugares del Perú, con el propósito del alivio de sus padecimientos debido a las propiedades medicinales que presentan sus aguas.

Estas pozas se encuentran expuestas al medio ambiente y son de fácil acceso a las personas, y debido a las características de sus aguas, nos planteamos la interrogante de si se encontrarán amebas de vida libre en las pozas de los baños termales de Churín.

## **1.2. Formulación del problema**

¿Se encontrarán amebas de vida libre en las pozas de los baños termales de Churín?

## **1.3. Justificación**

De las AVL identificadas que provocan infecciones en humanos, se han encontrado a: *Naegleria (fowleri)*, *Acanthamoeba (castellanii; polyphaga; culbertsoni; rhysodes; hatchetti; palestinesis; griffini; astronixis; mauritaniensis; royreba; divionensis; healyj; terricola; lenticulata; jacobsi)*, *Balamuthia (mandrillaris)* y últimamente *Sappinia*

*diploidea* como causante de encefalitis amebiana y queratitis.<sup>4</sup> En el Perú se presentaron alrededor de 50 casos con más del 50 % debidos a *B. mandrillaris*, con lesiones asociadas en la piel, sobre todo a nivel de rostro y en menor proporción se reportó a *Naegleria fowleri* causante de meningoencefalitis amebiana primaria.<sup>5</sup>

Si bien los casos reportados de MEAP a causa de *Naegleria fowleri* son poco frecuentes cabe mencionar que el hábitat donde se desarrollan estos organismos (centros de recreación e hidroterapia natural), se mantiene latente en todas las temporadas del año, convirtiéndolos en una fuente de transmisión constante en personas sanas y grupos de riesgo (niños, embarazadas y adultos mayores), así como individuos inmunocomprometidos (pacientes con VIH, con historial de trasplantes, injertos etc.).<sup>2</sup> Por ello mediante la presente tesis buscamos determinar la presencia de amebas de vida libre en las pozas de los baños termales de Churín con el fin de obtener información necesaria para la vigilancia epidemiológica de este sector.

## **1.4. Objetivo**

### **1.4.1. General**

Determinar la presencia de amebas de vida libre en las pozas de los baños termales de Churín.

#### **1.4.2. Específicos**

- Determinar la presencia de amebas de vida libre mediante el examen directo según la temperatura de las aguas en las pozas de los baños termales de Churín.
- Determinar la presencia de amebas de vida libre mediante cultivo según la temperatura de las aguas en las pozas de los baños termales de Churín.
- Determinar la presencia de amebas de vida libre mediante examen directo según la zona de muestreo de las pozas de los baños termales de Churín.
- Determinar la presencia de amebas de vida libre mediante cultivo según la zona de muestreo de las pozas de los baños termales de Churín.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes

Las amebas de vida libre (AVL) por su capacidad de sobrevivir a medios agrestes y también como endoparásitos han recibido la denominación de anfizoicas,<sup>6</sup> su hábitat en temperaturas elevadas favorecen su proliferación (4° C hasta más de 45° C), por lo que se les encuentra con frecuencia en aguas termales naturales y en aguas contaminadas térmicamente por descargas industriales.<sup>7, 10</sup>

El diagnóstico de meningoencefalitis y queratitis por amebas de vida libre suele confundirse con infecciones de meningitis bacteriana, por ello los datos epidemiológicos de exposición al agua de los pacientes infectados pueden ser útiles para orientar el diagnóstico. Usualmente la evolución de esta patología es progresiva a mortal y el diagnóstico se obtiene en muchas ocasiones post mortem; sin embargo, en un estudio exhaustivo de la clínica y el aislamiento e identificación del protozooario en líquido cefalorraquídeo (LCR), raspado corneo y muestras ambientales del lugar o medio de contagio pueden salvar la vida del paciente, por ello la vigilancia de las aguas termales ubicadas en centros de esparcimiento es crucial para la prevención y control de estas infecciones.

Reyes L, y Col. 2016, Colombia, en su estudio “**Amebas de vida libre aisladas en aguas superficiales del municipio de Turbaco, Bolívar-Colombia**”.<sup>8</sup> Con el objetivo de evaluar la presencia de AVL en

fuentes de agua natural. Recolectaron 54 muestras de agua no tratadas de uso personal y recreacional para la población, las muestras fueron tomadas de los arroyos de Matute, Mameyal y Cucuman ubicados en el municipio de Turbaco - Colombia, para realizar su estudio recolectaron 200 ml de agua de la zona de fondo, superficie y del borde de los arroyos lo hicieron por duplicado y en tres segmentos diferentes, los estudios la realizaron el mismo día de la recolección empleando el sedimento previa centrifugación, para posteriormente realizar la observación microscópica en fresco (directo) en busca de géneros de AVL. Del total de muestras que se observaron, se encontraron trofozoito y quiste de AVL, 44.4% fueron compatibles con el género *Naegleria spp.*, y 7.4% compatibles al género *Acanthamoeba spp.*, la positividad de las muestras recolectadas según zona de muestreo resultó mayor en la zona de la superficie para *Naegleria* y en la zona del fondo para *Acanthamoeba*, los arroyos de Mameyal y Cucuman presentaron mayor proporción de AVL. En este estudio se demostraron la presencia de AVL de los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba*, las muestras positivas fueron encontradas de la zona superficial y del fondo del arroyo, sabiendo que estos lugares son utilizadas por persona como fuentes de baño y las AVL encontradas producen enfermedades de curso rápido y letal en el hombre, es necesario realizar la vigilancia de este sector.

Zapata X, 2011, Colombia, en su trabajo “**Determinación de *Acanthamoeba spp.* En piscinas Públicas del municipio de Chinchana (caldas)**”.<sup>9</sup> Con el objetivo de asilar e identificar AVL del genero

*Acanthamoeba*, recolectaron 54 muestras de agua de 6 piscinas en 3 momentos diferentes ubicadas en el municipio de Chinchana (Caldas), obtuvieron 4 muestras para el estudio de la siguiente manera: zona superficial, profunda, raspado y una para los análisis de pH y temperatura, el sembrado de la muestra la realizaron a partir del sedimento obtenido en agar no nutritivo (ANN) al 2%, luego estas se incubaron a 37° C y se observaron cada 24 horas durante 15 días. En (36/54) muestras que se estudiaron encontraron AVL con diferentes características morfológicas, (23/36) resultaron compatibles morfológicamente con el género de *Acanthamoeba spp.*, el mayor número se aislaron de las muestras tomadas de raspado de la pared de la piscina, la temperatura de las aguas fluctuaron entre 21° C a 29° C y el pH varió entre 7 y 8. En todas las piscinas se aislaron AVL, obteniéndose resultados esperados, incluso superando hallazgos de otros estudios, el mayor porcentaje se halló en las paredes de las piscinas y la temperatura de las aguas resultó ser adecuado para el desarrollo de estas AVL.

Castillo de Mena ME y Col. 2011, El Salvador, en su trabajo **“Amebas de vida libre en pozas, piscinas y lagos de el Salvador”**.<sup>11</sup>

Teniendo por objetivo la búsqueda de AVL en aguas utilizadas por la población salvadoreña. Recolectaron 60 muestras de agua realizadas de manera aleatoria en distintos lugares del territorio salvadoreño en donde se encuentran los reservorios de agua como pozas, lagos, piscinas con aguas clorada y no clorada, las muestras se obtuvieron de la zona profunda y

superficial, el estudio se realizó el día siguiente de la recolección, para ello tomaron el sedimento y se estudió mediante examen directo y cultivo, para el cultivo las muestras se incubaron a 37° C y 42° C, los cultivos positivos fueron purificados y lavados con solución de Pagés. En 3(10%) de las muestras fueron positivos para AVL, dos se obtuvieron de la zona del fondo en piscinas cloradas y uno de la zona de fondo en aguas de piscinas naturales no cloradas. Se demostró la presencia de AVL en estadio de trofozoito, el tratamiento con cloro no asegura la inexistencia de estos protozoos de vida libre en las aguas de estas piscinas, de manera que es un peligro latente para la población salvadoreña que acude a estos centros de recreación.

Gertiser ML y Col. 2010, Buenos Aires – Argentina, en su trabajo **“*Acanthamoeba spp.* En piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina”**.<sup>12</sup> Teniendo como objetivo el aislamiento, identificación y caracterización de protozoos del género *Acanthamoeba*; Recolectaron un total de 84 muestras de agua de 7 piscinas durante las cuatro estaciones del año, se tomaron 4 muestras en frascos estériles de 470 ml en las zonas del fondo, superficie y raspado más uno para el bacteriológico (pH y concentración de cloro) además realizaron la medición de temperatura ambiental y del agua, los estudios se realizaron el día siguiente de la recolección previo reposo del agua de 24 horas, para ello decantaron el sobrenadante y centrifugaron la muestra con el fin de obtener el sedimento, la observación se realizaron por microscopia directa,

para los cultivos se inocularon las muestras en agar no nutritivo (ANN) al 2% y se incubaron a 37° C y 42° C por 15 días con el finalidad de aislar cepas termotolerantes, también determinaron la calidad bacteriológica del agua. En (5/7) muestras obtenidas de piscinas se aislaron AVL principalmente en placas incubadas a 37° C, En 22(26%) de estos medios de cultivo fueron positivas para *Acanthamoeba*, sin embargo en el examen directo todas resultaron negativas, en 6(27%) de los cultivos fueron obtenidas en muestreo de la zona del fondo, 8(36.5%) de la superficie y 8(36.5%) mediante raspado de la pared de la piscina. La estación de mayor porcentaje de muestras positivas correspondió a las que fueron tomadas en la estación de invierno y primavera. La temperatura del agua en las piscinas fue encontrada entre 25° C y 40° C y del ph entre 6 a 8.2. En este estudio demostraron la presencia de AVL correspondiente al género *Acanthamoeba*, todas mediante cultivo y en placas incubadas a temperatura de 37° C, la temperatura del agua y la incubación del medio de crecimiento resultaron favorables para el crecimiento de estas AVL.

Jiménez LF y Col. 2009, la sonora - México, en su estudio **“Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle de Mayo, Sonora”**.<sup>13</sup> Con el objetivo de aislar e identificar géneros de AVL y búsqueda intencionada de *Naegleria fowleri*, recolectaron muestras de agua en 10 puntos diferentes, a estas muestras se le realizaron la medición de temperatura, pH y salinidad, para el aislamiento de las muestras emplearon agar no nutritivo (NNE) y se sometieron a incubación de 20° C,

37° C y 45° C por 1 a 2 días, las muestras sospechas con amebas en forma de trofozoitos se le realizaron prueba de transformación flagelar, a todos los aislados a 45° C se le practicaron técnica de PCR para la búsqueda intencionada de *Naegleria fowleri*. Aislaron 91 cepas en total para el estudio, las cepas aisladas a 45° C demostraron ser termotolerantes, las cepas aisladas a 37° C no todas crecieron a 45° C, las cepas que fueron incubadas a 20°C no toleraron crecer a 45° C, en el examen directo para la identificación morfológica en la muestras aisladas a 45°C encontraron especie de *Naegleria*, en las de 37° C destaca la presencia de *Acanthamoeba*, los resultados mostrados mediante la técnica de PCR descarto la presencia de AVL pertenecientes a la especie de *N. fowleri*. Se demostraron la presencia de AVL termofilicas, demostrándose el aislamiento hasta 45° C de temperatura de incubación, no todas las cepas toleraron el cambio de aumento de temperatura de incubación, la prueba de PCR descarto la presencia de *Naegleria fowleri*.

Naquira C y Col. 2009, Lima - Perú, en su estudio “**Amebas de vida libre en aguas superficiales de la ciudad de Lima**”.<sup>14</sup> Teniendo como objetivo del entrenamiento en las técnicas de búsqueda e identificación de AVL. Recolectaron muestras de aguas superficiales de los ríos surco, chillón y en las lagunas de los pantanos de villa, en la recolección de las muestras tomaron coordenadas de latitud, longitud, temperatura y PH, obtuvieron el sedimento y cada muestra recolectada y se sembraron en dos medios de cultivo: medio PPYG (21° C) y medio MYAST a (37° C),

emplearon 3 lecturas para la búsqueda de AVL. La media de temperatura y pH fueron de 34° C y pH 7. Llegaron a identificar una AVL en estadio de trofozoito perteneciente al género *Naegleria*, cultivado en medio MYAST e incubado a 37° C, la muestra perteneció a la recolectada en los pantanos de villa, en el resto de muestras solo encontraron parásitos intestinales de interés en salud pública. Demostraron la presencia de una ameba de vida libre cultivada en un medio a 37° C proveniente de agua estancada, además se evidenció la existencia de otros importantes microorganismos que afectan la salud en el hombre.

Garaycochea MC y Col. 2008, Lima - Perú, en su estudio **“Patogenicidad de las amebas de vida libre aisladas de fuentes de agua en Lima”**.<sup>15</sup> Teniendo como objetivo determinar la presencia AVL y evaluar la capacidad patogénica en ratones. Para este estudio recolectaron 83 muestras de agua procedente de ríos, lagos, piscinas y pozos de la provincia de Huarochirí, Yauyos, Oyón, Huaura y Lima del departamento de Lima; para el aislamiento de las AVL emplearon agar no nutritivo al 2% e incubado a 37° C, para la búsqueda de AVL observaron las placas cada 4 días macro y microscópicamente, además se realizaron coloraciones para la observación de quiste y trofozoito, también determinaron la patogenicidad empleando suspensiones amebianas e inoculación vía intranasal a los ratones Balb-c. Del total de muestras estudiadas en (40/83) encontraron AVL mediante observación directa y cultivos, en solo una piscina encontraron este protozoo, el resto se hallaron en pozas y lagos de la

provincias de Huarochirí y Yauyos, en los cultivos se aislaron 26 cepas de amebas pertenecientes a siete géneros: *Hartmannella*, *Acanthamoeba*, *Mayorella*, *Naegleria*, *Vahlkampfia*, *Vannella* y *Saccamoeba*, con predominancia de *Acanthamoeba*; en los estudios de patogenicidad encontraron amebas en cerebro, hígado y corazón en ratones inmunosuprimidos. En este estudio demostraron la presencia y patogenicidad de amebas de vida libre mediante inoculación en ratones, las muestras presentaron tendencia de positividad a *Acanthamoeba*, aunque también encontraron amebas de género *Naegleria* demostrándose el riesgo latente para la población.

Ávila I y Col. 2006, Maracay - Venezuela, en su estudio **“Amebas de vida libre potencialmente patógenas en las aguas del parque las cocuizas, Maracay, Venezuela”**.<sup>7</sup> Con el objetivo de determinar la presencia de AVL y la calidad microbiológica del agua en el parque las cocuizas. Para este estudio recolectaron 30 muestras de aguas de 500 ml captadas en diferentes lugares de los cauces que atraviesan el parque las cocuizas, obtuvieron 6 muestreos durante 5 semanas en 9 sitios, para realizar el estudio las muestras fueron centrifugadas a 60 g durante 1 a 3 minutos, la búsqueda de AVL se realizaron con los sedimentos obtenidos mediante examen en fresco (directo), frotis para las coloraciones de hematoxilina férrica y giemsa modificada; los análisis bacteriológicos de coliformes totales y fecales se realizaron e identificaron mediante pruebas bioquímicas . En (15/30) muestras estudiadas se encontraron parásitos,

(8/15) resultaron compatibles con AVL del género *Naegleria spp.* en estadios de trofozoito y quiste, en los restantes encontraron parásitos provenientes del tracto gastrointestinal humano y animal, las AVL compatibles con el género *Naegleria* se encontraron en fuentes de agua tibia (24-29° C) y fría (19-23° C), se encontraron además bacterias *E.coli*. Demostraron la presencia de AVL, Los resultados muestran el riesgo latente y potencial de estas aguas, la alta contaminación por microorganismos *E.coli* favorece la proliferación de estas AVL, el uso de estas aguas constituye un potencial riesgo de infección para los usuarios del parque las cocuizas.

## **2.2. Base teórica**

### **2.2.1. Antecedentes históricos**

Las infecciones producidas por amebas de vida libre han sido descritas desde 1890 en diferentes lugares del mundo.<sup>10</sup> A mediados del siglo XX, fueron denominadas "amebas del suelo", conocidos como protozoos no patógenos, ubicuos en suelos y agua, además de ser usados como modelos celulares por biólogos. En 1958, Culbertson demostró el potencial patógeno de *Acanthamoeba spp.*, y en el año 1965 Fowler y Carter reportaron el primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) causado por *Naegleria fowleri* en Australia; también, en Checoslovaquia se identificó, en un estudio retrospectivo, un brote de 16 casos de MEAP en un grupo de jóvenes pertenecientes a un equipo de natación, esta

infección fue adquirida en una alberca calentada artificialmente (1962 - 1965). Desde entonces y hasta 1997 se habían reportado 81 casos sólo en Estados Unidos y para 2002 un total aproximado de 200 casos de MAP en el mundo.<sup>16</sup>

De las AVL, *Naegleria fowleri* es potencialmente patógeno para el hombre y las especies de *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris*, son denominadas organismos emergentes, causantes de enfermedades en la piel y al SNC. Presentan formas de trofozoito y quiste, y ambas suelen ser infectantes.<sup>2</sup>

En el Perú 2006 en un estudio realizado por Carlos Galarza y Col, presentan un reporte de 4 casos producidos por AVL en lesiones cutáneas, donde describen que son pacientes adultos con diagnóstico en 3 de ellos de VIH y uno inmunocompetente provenientes de la ciudad de Lima, Madre de Dios y Arequipa. Estos presentaban lesiones ulcerativas a nivel de miembros inferiores y dorso torácico, se le practicaron biopsias de las lesiones ulcerativas en la zona de lesión encontrándose amebas de vida libre del género *Acanthamoeba spp.* Dos de los casos fallecieron a los días de hospitalizados.<sup>17</sup>

En Venezuela 2006 se reportaron 2 casos de MAP en un niño y en un adulto con antecedentes de haber ingresado en un estanque, ambos presentaron sintomatología típica por amebiasis, en el primer

caso falleció a las 72 horas, en el estudio post mortem se encontraron trofozoitos de *Naegleria fowleri* en la corteza cerebral ; El segundo caso falleció a las 40 horas de ingreso al hospital, también se le realizaron estudio histológicos donde se observó trofozoito de *Naegleria* en las meninges y en los espacios perivasculares, más adelante, la identificación se corroboró mediante el estudio de inmunofluorescencia indirecta.<sup>18</sup>

En el año 2013 en Colombia se reporta un caso en el servicio de pediatría del hospital Pablo Tobón Uribe, en un paciente de 14 años con antecedente de inmersión en agua estancada, se le realizó una punción lumbar para estudiar el líquido cefalorraquídeo y determinar la causa de meningitis, además, de realizarle cultivo de LCR, en este estudio se aisló a *Naegleria fowleri*.<sup>19</sup>

En Perú el año 2014 se reporta un caso de encefalitis granulomatosa en un paciente varón de 13 años procedente de la selva alta, más adelante fue derivado al hospital del Callao donde fallece a los pocos días tras una segunda intervención quirúrgica, en la biopsia post mortem de tejido cerebral se observó la presencia de quistes y trofozoito de *Acanthamoeba spp.*<sup>20</sup>

En el año 2015 en Perú en un estudio retrospectivo realizado por Orrego-Puelles en el Hospital Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN) durante los años 1994 - 2000, se realizó el

reporte de 6 casos de encefalitis amebiana en pacientes varones provenientes de la costa del Perú, los pacientes afectados fallecieron dentro de los 15 días. En los estudios anatomopatológicos se demostró la presencia de *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris*.<sup>21</sup>

### **2.2.2. Naegleria fowleri**

Las amebas se encuentran dentro del reino Protozoa y las que infectan a humanos pertenecen al reino de los Percolozoa y Rhizopoda. El Phylum incluye la clase: Heterolobosea; Orden: Schyzopyrenida Familia: Vahlkampfiidae Género: Naegleria y Especie: fowleri.

*Naegleria* es un protozoo de vida libre presente en todo el mundo, se ha demostrado su peligrosidad al hombre comportándose como parásitos oportunistas,<sup>22, 23</sup> por ello reciben el nombre de anfizoicas ya que pueden existir como organismos de vida libre y parásito.<sup>15</sup>

En 1965 Fowler y Carter reportaron el primer caso de meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) en Australia, causada por amebas del género *Naegleria*.<sup>16, 24</sup>

Este género consta con más de 40 especies y *Naegleria fowleri* es la única que infecta a los humanos, Es considerado como un ameboflagelado porque desarrolla un estadio flagelar transitorio, además de las etapas ameboidea y quiste.

### **2.2.2.1. Estadios**

#### **Estado vegetativo - trofozoito**

El trofozoito mide aproximadamente de 15 - 25  $\mu\text{m}$ , presenta forma alargada, ectoplasma claro y endoplasma de granulación fina en el que se aprecian vacuolas digestivas, contráctil, mitocondrias, tiene un núcleo central con halo claro y un nucléolo esférico denso y prominente que refringe a la observación microscópica. Además emiten pseudópodos anteriores de movimiento rápido y de extremo romo llamados (lobópodos). Su alimentación es a base de bacterias y se reproducen por pro-mitosis.<sup>25</sup>

Los trofozoitos *Naegleria* son termofílicos y pueden desarrollarse y multiplicarse por división binaria a temperaturas de 40° C a 45° C en el medio ambiente y en cultivos celulares de laboratorio.<sup>26</sup>

#### **Etapas flagelar**

La forma flagelada mide 8 a 12  $\mu\text{m}$  de diámetro y se observa en el medio ambiente, su forma es usualmente piriforme, con un solo núcleo y un gran nucléolo, además no se le atribuye un citostoma lo que impide su alimentación, presenta 2 flagelos, pero puede tener 10 o más flagelos;<sup>27</sup> En el laboratorio se puede someterse a la transformación de la fase flagelar a trofozoito mediante lavados sucesivos en agua destilada, solución salina o medio Page.<sup>3</sup>

## **Etapas Quiste**

Es uninucleado, mide aproximadamente de 8 a 12  $\mu\text{m}$ , y es de forma esférica provisto de 2 paredes: una de pared interna gruesa y la otra externa de consistencia lisa y delgada, la zona extremo es operculado (poros con tapones mucosos), con granulaciones escasas. Este estadio se genera cuando se presentan condiciones adversas o cuando el suministro alimenticio escasea.<sup>16, 28</sup>

### **2.2.2.2. Patología**

#### **Meningoencefalitis amebiana primaria**

La meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) es una enfermedad de curso mortal y tiene por agente causal a *Naegleria fowleri* una ameba de vida libre que puede adaptarse a condiciones termo tolerantes, encontrándose en muchas ocasiones en el agua, suelo, etc. Aparece principalmente en las temporadas de verano, esta enfermedad presenta un cuadro de proceso agudo y fulminante afectando a personas sanas, el periodo de incubación varía entre los 3 a 7 días después del contacto con aguas contaminadas de piscinas, estanques o ríos, e inclusive en piscinas temperadas.

El trofozoito (forma infectante) ingresa a la cavidad nasal penetrando el neuroepitelio olfatorio originando una meningoencefalitis necrosante y purulenta semejante a una

meningitis bacteriana aguda, provocando daño a nivel de la base del cerebro, tronco cerebral y cerebelo; en estudios con cortes histológicos solo se han observado trofozoitos principalmente perivascular.<sup>6, 29</sup>

### **2.2.2.3. Epidemiología**

La MEAP causada por *Naegleria fowleri* es una patología que ocurre en todo el mundo y tiene mucha importancia en salud pública por el alto número de individuos al que parasita.<sup>31, 32</sup> Un considerable número de casos de MEAP se reportaron en EEUU. 200 aproximadamente, 176 en los estados de Virginia, Florida y California con un considerable número de infecciones ocurridas durante los meses de verano.<sup>31, 33</sup> Son 200 casos presentados en la literatura en todo el mundo hasta 1990; pero ahora el número es probablemente cercano a los 250, aunque algunos de ellos aún no han sido publicados.<sup>30</sup>

En su mayoría las infecciones que afectan al hombre son adquiridas luego de baños en agua contaminada provenientes de aguas termales naturales, aguas de piscinas temperadas, o aguas estancadas que incrementan su temperatura durante los meses de verano. Por esta razón se ha asumido que los trofozoitos del agua son los responsables de las infecciones humanas.<sup>3</sup>

#### 2.2.2.4 Patogenia

*Naegleria fowleri* al ingresar al sistema nervioso central genera una enfermedad llamada meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP) de curso rápido y fulminante.<sup>34</sup>

*Naegleria* penetra la mucosa olfatoria, transita por los nervios olfatorios a través de la placa cribosa y se aloja en los bulbos olfatorios.<sup>26, 34</sup> Una vez ubicado en el parénquima cerebral se prolifera generando una reacción inflamatoria agresiva para luego producir en el huésped secreción mucosa como respuesta primaria a la invasión. Los trofozoitos luego de ingresar al neuroepitelio olfatorio, penetran la placa cribiforme del hueso etmoides y llegan al espacio Subaracnoideo; en donde se multiplican y proliferan por acción de la proteína formadoras de poro; produciendo necrosis hemorrágica y edema.<sup>35</sup>

En el estudio de post mortem del cerebro se observa compromiso de materia gris con meningoencefalitis aguda, o encefalitis necrotizante hemorrágica. Además de observarse la presencia los trofozoitos en el espacio perivascular.

Al examen macroscópico se evidencia presencia de edema cerebral marcado, hipertensión endocraneana, congestión severa y compromiso de las meninges en los lóbulos temporal, frontal e hipotálamo. *Naegleria fowleri* tienen un efecto citopatogénico in

vitro sobre células del SNC generando desmielinización por acción de un efecto fosfolipolítico que actúa directamente sobre la mielina.<sup>6</sup>

#### **2.2.2.5. Cuadro clínico**

La Meningoencefalitis amebiana primaria ocurre principalmente en individuos sanos, niños o adultos jóvenes con contacto previo de lagos o piscinas.<sup>36</sup> El periodo de incubación dura 3 a 7 días, aunque en algunos casos es mayor a dos semanas. Los síntomas comienzan intempestivamente, con fiebre leve y malestar general, algunas veces acompañados de rinitis y odinofagia; estos síntomas progresan rápidamente, con acentuada cefalea y fiebre, seguido por vómitos, rigidez de nuca y signos de irritación meníngea. Hacia el final del tercer día de evolución, el paciente presenta una marcada desorientación. Pueden presentarse algunos síntomas leves de compromiso respiratorio superior. Al ingreso al hospital, el diagnóstico es generalmente de meningitis piógena; en el hospital, el cuadro clínico es de continuo deterioro, con somnolencia, y algunas veces con convulsiones. La punción lumbar muestra un fluido turbio con presión elevada. Otros síntomas y signos neurológicos están ausentes. El paciente fallece de insuficiencia respiratoria en menos de 10 días de iniciados los síntomas.<sup>37</sup> Unos pocos pacientes han sido aparentemente

tratados en forma exitosa, pero la identificación del parásito en algunos de estos casos ha sido cuestionada.<sup>6</sup>

#### **2.2.2.6. Diagnóstico**

Aun no se establecido criterios para el diagnóstico de MEAP por *Naegleria fowleri*; sin embargo, las pruebas de laboratorio son herramientas indispensables que podrían ayudarnos a determinar el diagnóstico de esta patología.

En las muestras sanguíneas se observa un incremento de leucocitos polimorfonucleares. Así mismo el estudio bioquímico de líquido cefalorraquídeo (LCR) presenta una elevación de proteínas, células mononucleares, hematíes; sin embargo, estas características pueden ser confundidas con meningitis bacteriana, el uso de tomografías computarizadas muestran un proceso meníngeo con obliteración de los espacios alrededor del cerebro medio o sólo edema difuso inespecífico.

Si el diagnóstico es sospechado clínicamente, las amebas deben ser investigadas en muestras frescas de LCR para ser fijadas y teñidas. La identificación de las amebas en preparados frescos de líquido cefalorraquídeo es difícil, se requiere del conocimiento y experiencia para observar las características morfológicas. Si el LCR es centrifugado y el sedimento resuspendido en agua, las amebas son transformadas a un estado flagelado, característica

que debe ser tenida en mente y explorada en el laboratorio en todos los casos en que se sospeche un caso de infección por *Naegleria*. El sedimento del LCR debe ser teñido con giemsa, hematoxilina y eosina, o una tinción tricromica. Los parásitos teñidos son reconocidos con mayor facilidad que los no teñidos.<sup>6,</sup>

25

### **2.2.3. Acanthamoeba**

Puschkarew en el año 1913 aisló del polvo una ameba la cual denominó *Amoeba polyphagus*, luego Page la denomina *Acanthamoeba polyphaga*,<sup>38</sup> más adelante *Castellani* reportó el hallazgo de una ameba que contaminó los cultivos con *Cryptococcus pararoseus* en 1930.

En 1958 Culberson después de haber realizado la inoculación en animales de experimentación con organismos contaminantes provenientes de cultivos celulares destinados para la producción de la vacuna contra la polio, cree haber encontrado un nuevo virus que origina la muerte por encefalitis, posteriormente establece que estas amebas de vida libre podrían generar enfermedades similares en humanos.<sup>39</sup>

### **2.2.3.1. Clasificación**

En principio fue clasificada en el género *Hartmanella*, Page en 1967 lo agrupa en el género de *Acanthamoeba* cuyo creador es VOLKONSKY en 1931.

Eucariota: Amoebozoa

Stereomyxida: Acanthamoebidae

En la actualidad se han descrito 24 especies de *Acanthamoeba* en base a parámetros morfológicos, sin embargo estos principios son poco fiables ya que los quistes pueden modificar su morfología en los medios de cultivo.<sup>38</sup>

### **GRUPOS**

En 1997 Pussard y Pons dividió al género *Acanthamoeba* en tres grupos de acuerdo a la diferenciación de tamaño y características morfológicas, y para efecto de la identificación taxonómica las denominó de la siguiente manera.

**I GRUPO:** Se encuentran especies caracterizadas por grandes quistes y trofozoito con endocisto en forma estrellada y ectocisto que pueden ser lisos o rugosos. En este grupo se encuentran *A. tubiashi*,<sup>40</sup> y *A. byersi*,<sup>41</sup> con un diámetro promedio del quiste  $\geq 18$   $\mu\text{m}$ .

**II GRUPO:** Este grupo presenta amebas aisladas con mayor frecuencia, y contiene amebas con quistes <18. En donde el ectocisto es rugoso, mientras que el endocisto puede ser poligonal, triangular, ovalado o redondeado.

En esta clasificación encontramos a: *A. hatchetti*,<sup>40</sup> y *A. micheli* sp.<sup>42</sup>

**III GRUPO:** En este grupo, el diámetro promedio de los quistes es < 18 y el ectocisto es delgado y ondulado mientras que el endocisto es generalmente redondo.

En el grupo III encontramos a; *A. healyi*,<sup>40</sup> y *A. jacobsi*.<sup>43</sup>

#### **2.2.3.2. Estadios**

##### **Vegetativa o trofozoito**

En esta fase *Acanthamoeba* se alimenta de bacterias y detritus que se hallan en el medio ambiente y la realizan por fagocitosis por medio de sus pseudópodos (acantopodios) mientras que la absorción de líquidos lo realiza por pinocitocis.<sup>44</sup> Su reproducción es por fisión binaria. Estos trofozoitos miden aproximadamente entre de 15 a 45  $\mu\text{m}$ , dependiendo de las especies.<sup>45</sup>

Entre las características generales son que poseen un solo núcleo con un nucléolo céntrico de tinción densa; sin embargo, se han encontrado amebas multinucleadas en suspensión de cultivos.<sup>46</sup> El

citoplasma tiene una granulación fina y numerosos mitocondrias así como de ribosomas, y una vacuola contráctil que realiza la regulación osmótica expulsando el agua.<sup>47, 38</sup>

### **Quiste**

Los quistes miden 5 - 25  $\mu\text{m}$  son de forma esférica, con doble pared.<sup>38, 44, 45</sup> La pared externa o exocisto es lisa (compuesta de proteínas y lípidos) variando las forma de la pared interna o endocisto que es de forma poligonal, estelar o globular (provista de carbohidratos como la celulosa lo que da una reacción positiva a la coloración PAS); además, presentan poros con núcleo de características semejantes a las de los trofozoito. El exterior de la pared del quiste u ectocisto presenta arrugas con pliegues y ondulaciones que contiene proteínas y lípidos.

Cada quiste está provisto de poros u ostiolo que son cubiertos por tapones u opérculos de forma cóncava u convexa y se encuentra ubicado entre el exocisto y endocisto. Al retornar las condiciones propicias al medio la forma latente o trofozoito abandona el quiste por medio del opérculo.

#### **2.2.3.3. Queratitis amebiana**

Las infecciones oculares producidas por *Acanthamoeba* se presentan en pacientes jóvenes saludables frecuentemente en usuarios de lentes de contacto que se infectaron en fuentes

acuosas contaminadas con *Acanthamoeba*.<sup>12</sup> Se han descrito cerca de 750 casos alrededor del mundo hasta 1996, En el Perú Garaycochea M. 2008 demostró que las aguas provenientes de lagos y ríos usados para actividades agrícolas e inoculados en animales de experimentación demostraban la sintomatología concordante a infecciones por *Acanthamoeba* .

Esta patología involucra múltiples factores como el uso a largo plazo de lentes de contacto y exposición a aguas contaminadas,<sup>48</sup> Además contaminación de arrastre con el suelo, aplicación de soluciones salinas casera, lentes de contacto rehusados, limpieza de los lentes de contacto con agua mineral, sumersión en baños de hidromasaje.<sup>39</sup>

Como todas las enfermedades producidas por AVL el diagnóstico es complicado y usualmente en confundido con otro tipo de infecciones, como por ejemplo de la queratitis bacteriana y herpética.<sup>45</sup>

#### **2.2.3.4. Cuadro clínico**

Luego del contacto con medios contaminados, los trofozoitos se adosan a la superficie de la córnea y generan enzimas colagenolítica y proteolíticas, luego el PUM (lectina expresada en la superficie de esta AVL) se une a las glicoproteínas de la manosa ubicada en la área superficial de la córnea y destruye los

leucocitos polimorfonucleares que migran e infiltran produciendo fotofobia en el paciente, este acontecimiento genera un paso de entrada a *Acanthamoeba* y necrosis estromal produciendo ceguera.<sup>38, 48</sup>

#### **2.2.3.5. Diagnóstico**

Los trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba* pueden obtenerse de un raspado corneal o biopsia, el diagnóstico se realiza mediante la visualización de amebas a través de un análisis microscópico así como cultivo de tejidos afectados como la observación directa de la córnea a través de microscopia confocal para el diagnóstico de queratitis.

#### **Encefalitis granulomatosa amebiana (EGA)**

La (EGA) es una enfermedad que afecta al sistema nervioso central (SNC) y su sintomatología no establecida suele ser confundida con meningitis bacteriana, meningitis tuberculosa, encefalitis viral, toxoplasmosis, neurocisticercosis o tumor cerebral. La (EGA) a diferencia de las otras afecta en cualquier estación del año;<sup>38</sup> Existen factores concomitantes que aumentan la probabilidad de padecer esta dolencia como la insuficiencia renal, diálisis, terapia con radiación, embarazo, pacientes con SIDA, drogadictos, pacientes con trasplante de órganos.<sup>38, 49</sup> La

primero infección se produce en los pulmones o por el neuroepitelio olfatorio que luego de disemina por vía hematológica al SNC.<sup>44, 46</sup>

### **Cuadro clínico**

El proceso de la enfermedad es lento e irreversible produce una afección crónica por periodos de semanas a meses. El paciente manifiesta cefaleas intensas, fiebre, rigidez de nuca, náuseas, vómitos, alteraciones de conducta letargo, ataxia cerebral, diplopía, hemiparesis, periodos convulsivos, disminución de conciencia y coma. Al examen físico se encuentra parálisis de nervios craneales, signos meníngeos, o hemiparesia. En el cuadro final se produce un incremento de presión intracraneal con herniación cerebral, generando un paro cardiopulmonar y edema pulmonar.<sup>50, 60</sup>

### **Diagnóstico**

En el estudio de punción lumbar de líquido cefalorraquídeo (LCR) muestran la presencia de pleocitosis con predominio de 20 – 100 % de linfocitos y un recuento normal de células polimorfonucleares con glucosa normal o limite lo que puede diferenciar a una meningitis bacteriana, además de proteínas elevadas, en el diagnóstico de imágenes con TAC se halla la disminución de espacio ventricular y oclusiones arteriales. Los estudios patológicos muestran la presencia de daño tisular con presencia

de granulomas viejos con histiocitos y células gigantes que engloban en su interior trofozoitos y quistes, cabe resaltar que no se hallan en la zona de necrosis.<sup>25</sup>

#### **2.2.4. Balamuthia**

De acuerdo a la clasificación taxonómica *Balamuthia* pertenece al grupo Amoebozoa (Acanthamoebidae).<sup>51</sup>

*Balamuthia* es un patógeno protista que se encuentra en el medio ambiente y afecta a personas inmunocompetentes, no puede obtenerse del agua pero si puede usarla como vehículo de transmisión. En 1990 se realizó el primer aislamiento de *Balamuthia mandrillaris* luego que un mandril (*Papio sphinx*) proveniente del zoológico WILD ANIMAL PARK de San Diego adquirió una extraña enfermedad cerebral que causo su deceso.<sup>52</sup> El primer aislamiento ambiental de *B. mandrillaris* se obtuvo del suelo de una maceta en la casa de un niño infectado;<sup>53</sup> sin embargo, el primer caso de infección humana por *B. mandrillaris* se reportó en 1991 en un paciente con sida.<sup>54</sup> Además existen reportes provenientes de Sudamérica en países como Argentina, Venezuela, Brasil, y escasos casos en Perú de personas infectadas.<sup>55</sup>

*B. mandrillaris* causa infecciones cutáneas graves y encefalitis mortal que afectan el SNC. En la actualidad se han reportado más de 200

casos en todo el mundo y no existe un tratamiento exitoso para su recuperación.<sup>56, 57</sup>

#### **2.2.4.1. Estadios**

Al igual que *Acanthamoeba*, tiene sólo dos etapas del ciclo de vida, trofozoito y quiste.

##### **Trofozoito**

Es pleomórfico con una medida aproximada entre de 12 a 60  $\mu$ m. En su mayoría poseen un solo núcleo; sin embargo, pueden verse las formas binucleadas. El núcleo es grande ubicado en posición central posee un nucléolo y ocasionalmente ha sido observado en tejido infectados la presencia de trofozoitos con 2 a 3 nucléolos. Además tienen amplios pseudópodos y estructuras filamentosas.<sup>58</sup>

##### **Quiste**

Son de tipo uninucleado, de forma esférica con un tamaño de 12 a 30  $\mu$ m. Los quistes, poseen 2 capas o paredes una exterior ondulada que contiene proteínas y lípidos y una interior lisa que contiene celulosa, por lo tanto es ácido periódico de Schiff-positivo, estas capas se separan con una estructura amorfa, fibrilar y con la presencia de un poro. Estos quistes pueden existir por desecación por más de 20 años.<sup>59</sup>

#### **2.2.4.2 Diagnóstico**

El examen de LCR es una herramienta imprescindible, el estudio microscópico revela pleocitosis linfocítica con leve a severa elevación de la proteína y glucosa normal o baja. El hallazgo tanto *Acanthamoeba spp.* y/o *B. mandrillaris* de muestras cerebrales o biopsias de piel son una procedimiento de diagnóstico importante.

*Acanthamoeba spp.* y/o *B. mandrillaris* son difíciles de diferenciar en secciones de tejido mediante microscopía de luz, porque su morfología es similar; sin embargo, pueden ser diferenciados por el análisis de inmunofluorescencia del tejido utilizando secciones de anticuerpos de conejo anti-*Acanthamoeba* o anti-*B. mandrillaris*.<sup>61</sup>

#### **2.2.5. Sappinia**

Esta ameba de vida libre ha sido aislada de las heces de vaca y otros herbívoros. La diferencia que radica entra las otras especies es el tipo de reproducción sexual, hay dos especies conocidas de Sappinia: *Sappinia diploidea* y *Sappinia pedata*.<sup>62</sup>

##### **2.2.5.1. Estadios**

###### **Trofozoito**

El trofozoito mide aproximadamente de 40 - 80 mm presenta gran vacuola en el citoplasma, dos nucléolos estrechamente adosados,

la pared de la membrana nuclear aplanada en el sitio de contacto de ambos núcleos y cariosoma grandes.

### **Quiste**

Son binucleados y tiene una pared lisa sin poros. Solo ha sido documentado un caso causado por *Sappinia pedata* de encefalitis.<sup>63</sup>

### 2.3. Terminología básica

**Trofozoito:** Forma vegetativa, se alimenta y se mueve. Presenta (Membrana, citoplasma, núcleo y pseudópodos).

**Quiste:** Forma de resistencia, poseen: Pared quística, vacuola de glucógeno y cromatoidales (ADN, ARN).

**Amebas de vida libre (AVL):** las amebas de vida libre (AVL) son protozoos cosmopolitas que habitan en ambientes húmedos como el suelo y el agua, aunque también pueden encontrarse en el aire, vehículo que utilizan como medio de dispersión.

**Temperatura:** La temperatura es una magnitud física que refleja la cantidad de calor, ya sea de un cuerpo, de un objeto o del ambiente. Dicha magnitud está vinculada a la noción del frío (menor temperatura) y caliente (mayor temperatura).

**Aguas termales:** Las aguas termales son aguas con una elevada cantidad de minerales que brotan del suelo de manera natural y a una temperatura que supera en 5° C la temperatura registrada en la superficie.

**Pozas:** Charca o concavidad donde hay agua estancada.

## 2.4. Hipótesis

Por ser un estudio descriptivo no corresponde el planteamiento de hipótesis.

## 2.5. Variables

Operacionalización de variable (ver anexo 1)

- **Variable independiente:** aguas de las pozas de los baños termales de Churín.
  - Zona de la poza donde se extrae la muestra.
  - Temperatura medida en grados centígrados.
- **Variable dependiente:** Amebas de vida libre
  - Examen directo
  - Cultivo

## CAPITULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

### 3.1. Tipo y nivel de investigación

Se trata de un estudio No Experimental con las siguientes características:

- Descriptivo: La información se recolecto sin cambiar el entorno.
- Prospectivo: Se diseña y comienza a realizarse en el presente, pero los datos se analizaron en un determinado tiempo en el futuro.
- Transversal: Todas las variables de la población fueron medidas en una sola ocasión.

### 3.2. Población y muestra

#### **Población:**

Pozas de los baños termales que se encuentren en el centro del pueblo de Churín y que cuenten con los criterios de la investigación.

#### **Muestra:**

60 muestras de aguas temperadas, que se recolectaron mediante el Tipo de muestreo No Probabilístico de conveniencia, el cual se obtuvieron de 6 pozas ubicadas en tres complejos termo medicinal del pueblo de Churín.

Las muestras se obtuvieron de la zona superficial y de la zona profunda de las pozas.

### **3.2.1. Criterios de inclusión**

- Agua procedente de las pozas de los baños termales de Churín que oscilan entre las temperaturas de 25° C a 45° C.
- Agua procedente de pozas de los baños termales de Churín con presencia de biopelículas y que oscilan entre las temperaturas de 25° C a 45° C

### **3.2.2. Criterios de exclusión**

- Agua de las pozas de baños termales de Churín en las que se evidencia contaminación fecal en el momento del muestreo.

### **3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

Se clasificaron y ordenaron las muestras en relación a la poza y zona de muestreo en la sección de parasitología del Instituto de Medicina Tropical Daniel Alcides Carrión de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la siguiente manera: (POZA 1 al 6); superficie (S1 al S5) y profundidad (P1 al P5). Después del reposo de 24 horas se procedió a eliminar el sobrenadante e inmediatamente se inoculó el sedimento en el medio MYAST agregando luego la solución amebo salina y la solución de E.coli inactivada; Con el resto de muestra se

realizó la búsqueda e identificación de amebas de vida libre mediante examen directo.

Las AVL identificadas mediante el examen directo y cultivo se realizaron basándose en las características morfológicas de la clave de Page (Page, 1988) luego los datos fueron registrados en un programa Excel, los reportes se realizaron de la siguiente manera: POSITIVO o NEGATIVO a AVL.

#### **3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico**

Para el análisis de datos, se empleó el programa de Microsoft Excel (Microsoft 2010) para el almacenamiento de los datos. Se realizaron tablas de contingencia evaluando examen directo y cultivo con la temperatura de las pozas y la zona de muestreo respectivamente, utilizándose el programa estadístico SPSS 20.0

#### **3.5. Aspectos éticos**

En la presente investigación no se vulneró el aspecto ético, debido a que no se trabaja con personas y las aguas en estudio están a disposición de la comunidad.

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Resultados

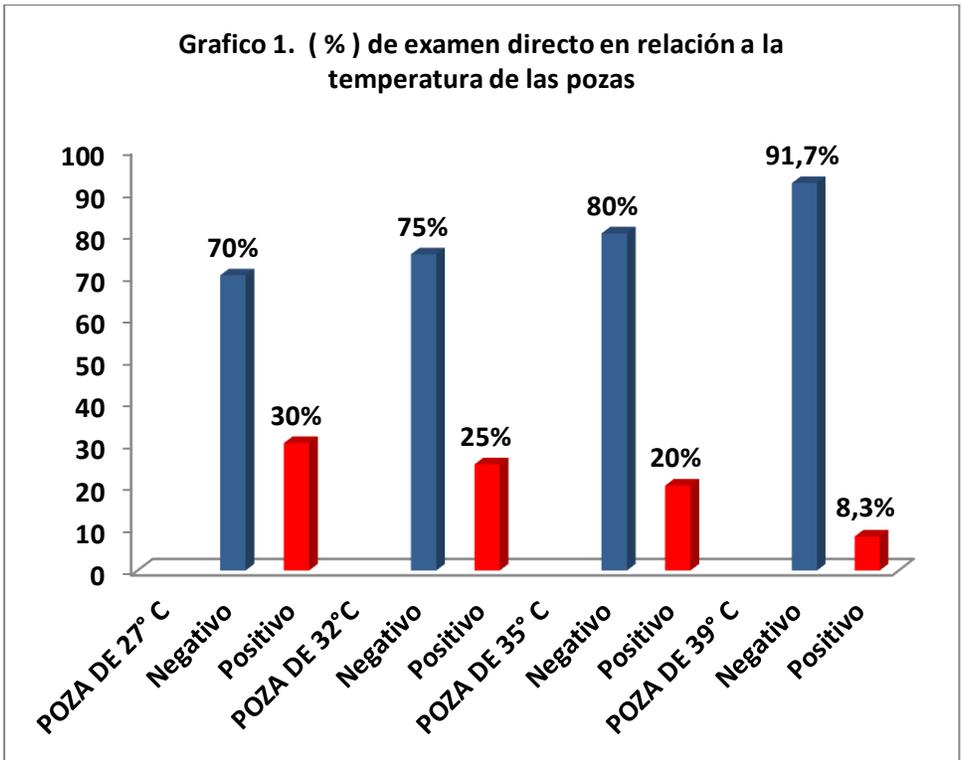
#### 4.1.1. Resultados del examen directo según Temperatura de las aguas en las pozas de los baños termales de Churín.

Se recolectó 60 muestras (n=60) de las cuales 14 fueron positivas en el examen directo. De acuerdo a la temperatura del agua en las pozas 9 (30,0%) fueron positivos en poza de 27° C, 2 (25,0%) en poza de 32° C, 2 (20,0%) en poza de 35° C y 1 (8,3%) en poza de 39° C. De los cuales 13 eran compatibles con formas en estadio de Quíste de *Naegleria spp.* y 1 compatible con forma en estadio de trofozoito de *Naegleria spp.* (Ver tabla 1)

**Tabla 1. Resultado de examen directo según temperatura del agua en las pozas**

		Temperatura de las pozas			
		27° C (%)	32° C (%)	35° C (%)	39° C (%)
Examen directo	NEGATIVO	N° de muestra 21 (70,0%)	6 (75,0%)	8 (80,0%)	11 (91,7%)
	POSITIVO	N° de muestra 9 <b>(30,0%)</b>	2 <b>(25,0%)</b>	2 <b>(20,0%)</b>	1 <b>(8,3%)</b>
	TOTAL (%)	30 (100,0%)	8 (100,0%)	10 (100,0%)	12 (100,0%)

**Grafico 1. ( %) de examen directo en relación a la temperatura de las pozas**

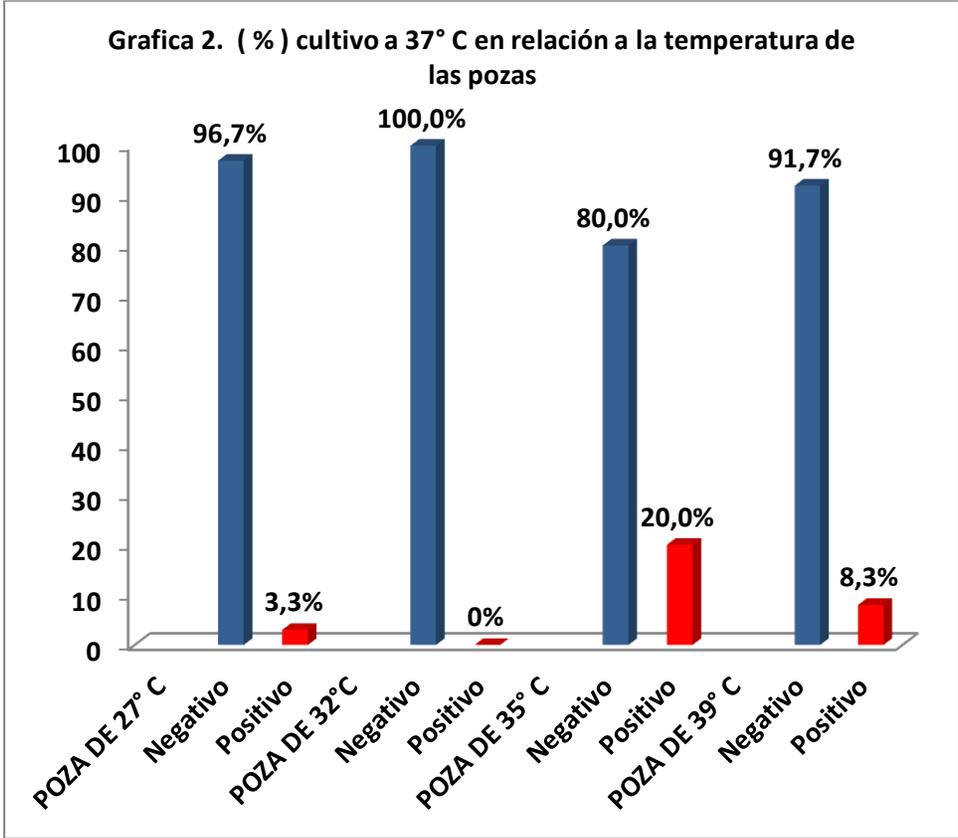


#### 4.1.2. Resultado de cultivo según la Temperatura de las aguas en las pozas de los baños termales de Churín.

Las 60 (n=60) muestras recolectadas se cultivaron en medio MYAS a 37° C de los cuales se identificaron 4 cultivos positivos compatibles con AVL del genero *Naegleria spp.* En 2 (20,0%) representan a las pozas con temperatura de agua de 35° C, 1(3,3%) a 27° C y 1(8,3%) a 39° C respectivamente. (Ver Tabla 2)

**Tabla 2. Resultado de cultivo a 37° C según temperatura del agua en las pozas**

		Cultivo a 37° C		TOTAL (%)
		NEGATIVO (%)	POSITIVO (%)	
Temperatura del agua en las pozas	N° de muestra con temperatura de agua de 27° C	29 (96,7%)	1 (3,3%)	30 (100,0%)
	N° de muestra con temperatura de agua de 32° C	8 (100,0%)	0 (0,0%)	8 (100,0%)
	N° de muestra con temperatura de agua de 35° C	8 (80,0%)	2 (20,0%)	10 (100,0%)
	N° de muestra con temperatura de agua de 39° C	11 (91,7%)	1 (8,3%)	12 (100,0%)

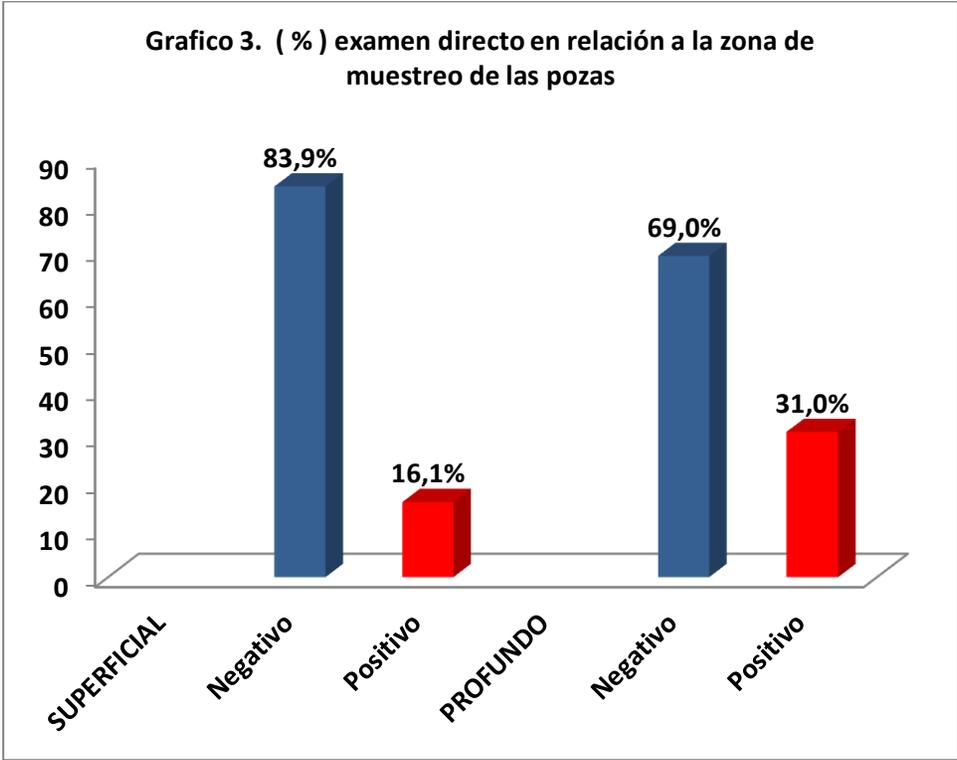


#### 4.1.3. Resultado del examen directo según la zona de muestreo de las pozas de los baños termales de Churín.

De las 60 muestras (n=60) recolectadas 14 fueron positivas en el examen directo, de acuerdo a la zona de muestreo se distribuyeron así: En el nivel superficial se identificó 5 (16,1%) y nivel profundo 9 (31,0%) respectivamente. (Ver tabla 3)

**Tabla 3. Resultado de examen directo según zona de muestreo de las pozas**

		Zona de muestreo	
		SUPERFICIAL	PROFUNDO
Examen directo	<b>NEGATIVO</b>	N° de muestra 26 83,9%	20 69,0%
	<b>POSITIVO</b>	N° de muestra 5 16,1%	9 31,0%
	<b>TOTAL (%)</b>	N° de muestra 31 100,0%	29 100,0%

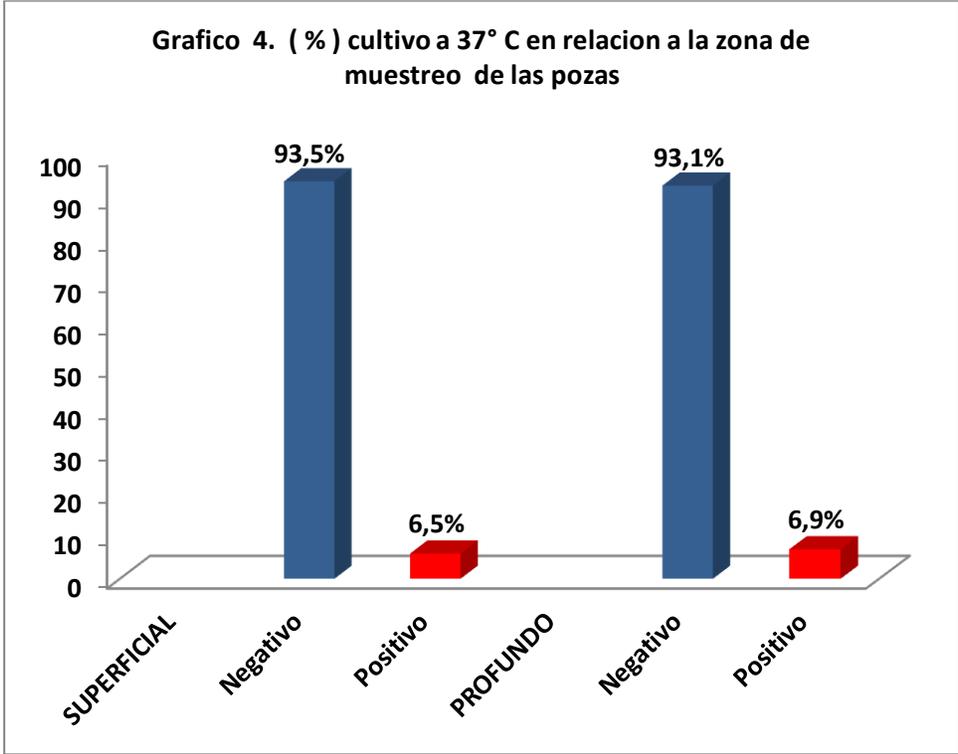


#### 4.1.4. Resultado de cultivo según la zona de muestreo de las pozas de los baños termales de Churín.

Las 60 muestras recolectadas se cultivaron en medio MYAST a 37° C de los cuales se identificaron 4 cultivos positivos compatibles con AVL del genero *Naegleria spp.*, de acuerdo a la zona donde se obtuvo la muestra estos se distribuyen así: 2 (6.5%) representa a las muestras obtenidas de la zona superficial y 2 (6.9%) obtenidas de la zona profunda. (Ver tabla 4)

**Tabla 4. Resultado de cultivo a 37° C según zona de muestreo de las pozas**

		Cultivo a 37° C		Total (%)	
		NEGATIVO (%)	POSITIVO (%)		
Zona de muestreo	SUPERFICIAL	N° de muestra	29	2	31
			93,5%	6,5%	100,0%
	PROFUNDO	N° de muestra	27	2	29
			93,1%	6,9%	100,0%



## 4.2. Discusión

En el examen directo de las aguas en estudio, se encontró AVL con formas compatibles al género *Naegleria spp*, los estadios encontrados fueron trofozoito y quiste. La presencia de AVL en estas aguas constituye una peligrosa fuente de infección en grupo de riesgo y personas sanas, que acuden al centro de esparcimiento de Churín.

En la presente tesis se estudiaron 60 muestras de aguas provenientes de las pozas de los baños termales de Churín, las muestras fueron recolectadas de aguas con temperatura de 27° C, 32° C, 35° C y 39° C. En (14/60) muestras resultaron positivas para AVL compatibles con el género *Naegleria*, (13/14) 92,85% fueron encontradas en forma de quiste y (1/14) 7.15% en forma de trofozoito, el mayor porcentaje 9 (30,0%) se encontró en pozas con temperatura de 27°C; en relación a las pozas con otras temperaturas ;cabe mencionar que las zonas donde se presentó un mayor porcentaje de positivos se hallaban tapizadas con biopelículas, material que provee de alimento a las AVL, usamos la misma metodología de raspado de la zona profunda como lo hizo Gertiser ML y Col. 2010, Buenos Aires – Argentina, en su trabajo **“*Acanthamoeba spp*. En piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina”**<sup>12</sup> y Zapata X, 2011, Colombia, en su trabajo **“Determinación de**

***Acanthamoeba spp.* En piscinas Públicas del municipio de Chinchana (caldas)**<sup>9</sup> donde obtuvieron resultado positivos, Sin embargo nuestros resultados obtenidos están acorde a lo reportado por (Reyes L y Col, 2016)<sup>8</sup>, en su estudio “**Amebas de vida libre aisladas en aguas superficiales del municipio de Turbaco**” en fuentes de agua de uso personal y recreacional para la población donde de 54 muestras analizadas hallaron AVL compatibles con el género *Naegleria spp.*

Las 60 muestras fueron inoculadas en un medio de cultivo MYAST usado por excelencia para el aislamiento de AVL e incubadas a 37° C debido a que si bien estos protozoos pueden desarrollarse en temperatura ambiente también pueden llegar a ser patógenos para el ser humano con ello demostramos que las amebas de vida libre pueden desarrollar alguna forma de su ciclo evolutivo en este tipo de medio. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de AVL. En (4/60) fueron positivos para AVL en concordancia con Castillo de Mena y Col. 2011<sup>11</sup> y Naquira C y Col 2009<sup>14</sup>, donde hallaron AVL compatibles con genero *Naegleria* en cultivos a 37° C; sin embargo, en un estudio realizado por Jiménez LF y Col 2009<sup>13</sup>, aislaron AVL en temperaturas de incubación de hasta 45° C, por lo tanto, existe la posibilidad de aislar a estos microorganismos a temperaturas por encima de 37° C, del mismo modo también podrían encontrarse

estos microorganismos en aguas termales con estas características en el interior de nuestro país.

De las 14 muestras positivas en examen directo, 5 (16,1%) fueron obtenidas en la zona superficial y 9 (31,0%) de la zona profunda de la pozas ;el hallazgo de AVL en las 2 zonas de la pozas, puede ser debido a que en las paredes de las pozas se encuentran biopelículas, sin embargo resaltamos que existe mayor proporción de este tapiz orgánico en la sección profunda lo que concuerda con el mayor índice de positividad en esta zona, el resultado que obtuvimos es acorde a lo encontrado por Castillo de Mena y Col, 2011 en su trabajo **“Amebas de vida libre en pozas, piscinas y lagos de el Salvador”**.<sup>11</sup> sin embargo (Reyes L y Col, 2016)<sup>8</sup>, en su estudio **“Amebas de vida libre aisladas en aguas superficiales del municipio de Turbaco”** encontró un mayor (%) de positivos para AVL compatibles con el género *Naegleria spp.* en la zona de superficie.

Se presentó ciertas limitaciones en el trabajo realizado que se debe de tener en cuenta para próximos estudios primero se observó contaminación de los cultivos con hongos debido a la misma flora existente, segundo las muestras no fueron cultivadas a rangos de temperaturas de obtención, debido a ello no hubo crecimiento en todos los medios de cultivos.

No existe evidencia alguna de investigaciones similares realizadas en las aguas termales del pueblo de Churín, siendo este el primer reporte de presencia de amebas de vida libre, los resultados demostraron que las aguas de las pozas de los baños termales constituye un hábitat para las amebas de vida libre.

Sin embargo, es necesario realizar pruebas complementarias *in vitro* e *in vivo* de mayor sensibilidad y especificidad para demostrar su patogenicidad.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

- Se demostró la presencia de AVL compatibles con el género *Naegleria spp.* en las pozas de los centros de esparcimientos de los baños termales de Churín.
- En examen directo en relación a la temperatura de la poza se encontraron AVL compatibles con el género *Naegleria spp.* el mayor (%) de positivos se obtuvieron de las muestras extraídas de la poza de 27° C en relación a las otras pozas.
- En cultivo a 37°C en medio MYAST en relación a la temperatura de las pozas se observó la presencia de AVL compatibles con el género *Naegleria spp.* en las pozas de 27° C, 35° C y 39° C, encontrándose un mayor (%) de positivo en la poza de 35° C.
- En el examen directo en relación a la zona de muestreo se obtuvo 9 (30,0%) de muestras positivas en la zona profunda de la poza compatibles con AVL del género *Naegleria spp.*
- En el cultivo a 37°C en medio MYAST en relación a la zona de muestreo se encontraron 4 positivos (2) de la zona superficial y (2) de la zona profunda de las pozas con características compatibles a AVL del género *Naegleria spp.*

## 5.2. Recomendaciones

Debemos tener en cuenta que no han sido rastreadas todas las aguas de las pozas de los baños termales de Churín; por lo tanto, no sabemos en qué condiciones se encuentran; sin embargo, las pozas en estudio se encontró presencia de biopelículas, por lo que deducimos que el nivel de limpieza no es continuo en estos lugares, por ello el presente trabajo de investigación aporta datos e información necesaria para que se apliquen lo siguiente:

- Se recomienda realizar un rastreo a todas las pozas de los baños termales de Churín, con la finalidad de determinar si en todas las pozas se encuentran contaminadas con AVL.
- Recomendamos realizar pruebas moleculares a las muestras y/o cultivos positivos a AVL para determinar su especie y así confirmar la identificación.
- Es necesario informar a las autoridades sanitarias y a los administradores de las pozas de los baños termales de Churín, con el fin de realizar limpiezas profundas de las pozas de tal manera que se pueda evitar la formación de biopelículas y así minimizar los riesgos de infección a los visitantes.

## REFERENCIAS

1. Fowler M, Carter RF. Acute Pyogenic Meningitis Probably Due to *Acanthamoeba* sp.: a Preliminary Report. Br Med J. 1965; 2(5464): 734-2, 740-742.
2. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. FEMS Immunol Med Microbiol. 2007; 50(1): 1-26.
3. Urribaren T. NAEGLERIA, ACANTHAMOEBIA, BALAMUTHIA. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). 2015
4. Visvesvara GS, Maguire JH. Pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *sappinia diploidea*. Tropical Infectious Diseases. 2006; Vol. 2 (Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, eds), pp. 1114-1125. Churchill livingstone.
5. Schuster FL, Visvesvara GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol. 2004; 34(9): 1001-27.
6. Martinez AJ, Visvesvara GS. Free-living, amphizoic and opportunistic amebas. Brain Pathol. 1997; 7(1): 583-98.
7. Ávila I, Rodríguez M, Infante D, Llovera V, Álvarez O, Briceño M. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque "Las

- Cocuizas”, Maracay, Venezuela. Rev Cubana Med Trop. 2006; 58(1): 19-24.
8. Carbal L, Foen L, Morales-Aleans M, Orosco-Ugarriza M. Amebas de Vida Libre aisladas en aguas superficiales del municipio de Turbaco, Bolívar-Colombia. Rev Cubana Med Trop. 2016; 68(1): 59-69.
  9. Muñoz Zapata X, Quintero Ruíz G. Determinación de *Acanthamoeba* spp. en piscinas públicas del municipio de Chinchiná Caldas. [Tesis de bachiller]. Manizales, Colombia. Universidad Católica de Manizales. Facultad de Bacteriología. 2014. 42 pp.
  10. Gallegos-Neyra E. Amebas de vida libre potencialmente patógenas en cuerpos de agua de uso recreativo en el estado de San Luis Potosí [Tesis de Doctorado]. San Luis, México, FES Iztacala, UNAM. 1997. 132 pp.
  11. Castillo de Mena ME, Santos RG, Cerna de López MM, Torres de Castillo EG, Portillo de Juárez AM, Rosales RI. Amibas de vida libre en pozas, piscinas y lagos de El Salvador. Revista CREA CIENCIA. 2011; 6(11): 6-10.
  12. Gertiser ML, Visciarelli E, Basabe N, Perez MJ, Costamanga SR. *Acanthamoeba* spp. en piscinas cubiertas de la ciudad de Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. Acta Bioquim Clin Latinoam. 2010; 44(4): 697- 703.
  13. Lares Jiménez LF, Lares-Villa F. Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales. 2009; 5(2): 161-167.

14. Naquira C, Motta R, Echevoyen R, Encisa E, Gallardo L, De la Cruz L. Amebas de vida libre en aguas superficiales de la ciudad de Lima. Revista de la Facultad de Medicina Humana-Universidad Ricardo Palma. 2009; 2: 41-44.
15. Garaycochea MC, Beltran M, Morón C. Patogenicidad de las amebas de vida libre aisladas de fuentes de agua en Lima. Rev Perú Med Exp salud pública. 2008; 25(2): 204-207.
16. Jain R, Prabhakar S, Modi M, Bathia R, Sehgal R. Naegleria meningitis: a rare survival. Neurol India. Neurology (Indian) 2002; 50(4): 470- 2.
17. Galarza C y Col. Amebas de vida libre en lesiones cutáneas reporte de 4 casos. Dermatol Peru. 2006; 16(1): 36-40.
18. Petit F y Col. Meningoencefalitis Amebiana Primaria comunicación de dos nuevos casos venezolanos. Arq Neuropsiquiatr. 2006; 64(4): 1043-1046.
19. Vélez M, Zapata A, Ortiz D, Trujillo M, Restrepo A, Garcés C. Reporte de caso y revisión de la literatura de caso de paciente con meningoencefalitis por amebas de vida libre. Infectio. 2013; 17(3): 153-159.
20. Chambi-Torres J, Bonifácio-Morales. REPORTE DE UN CASO: ENCEFALITIS GRANULOMATOSA PRIMARIA EN UN HOSPITAL NACIONAL.CALLAO-PERU. CIMEL. 2014; 19(2): 79-83.
21. Orrego-Puelles E, Casavilca S, Rodríguez F, Pritt B, Castillo M, Castañeda C. AMEBIASIS DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

- REPORTE DE SEIS CASOS EN EL PERU. Rev Perú Med Exp Salud Pública. 2015; 32(3): 591-7.
22. Botero D, Restrepo M. Parasitosis humanas. 3ra edición. Medellín: Editorial Colombia de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB); 1998.
23. Mora de Patarroyo C. Acercamiento al estado actual de meningoencefalitis amebiana primaria en Colombia producida por *Naegleria Fowleri* [Tesis de Grado]. Bogotá, Colombia. Pontificia universidad javeriana. 2010. 40 pp.
24. Fowler N, Carter R. Acute pyogenic meningitis due to *Acanthamoeba* sp: a preliminary report. BR Med. S, Mora E, Cardozo. Meningoencefalitis amebiana Primaria: comunicación de dos casos venezolanos. Arq Neuro-Psiquiatria Sao Paulo dez 2006.
25. Oddó D. Infecciones por amebas de vida libre.: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. Revista chilena de infectología. 2006; 23(3): 200-214.
26. Antonio Atias. Parasitología médica. 2da Edit. Santiago de Chile: Publicaciones técnicas mediterráneo; 1999.
27. Torres V, Camacho F, Mihm M, Sober A, Sánchez C. Dermatología Práctica Ibero-Latinoamericana. México, D.F.; 2005. p. 283-4.
28. Gelman B, Popov V, Chaljub G, Nader R, Rauf S, Nuta H et al. .Neuropathological and ultrastructural features of amebic encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. J Neuropathol. 2003; 62: 990-998

29. Shakoor S, Asim-Beg M, Mahmood S, Bandea R, Sriram R, Noman F, et al. Primary Amebic Meningoencephalitis, Pakistan. *Emerging Infectious Diseases*. 2011; 17(2): 258-261
30. Gutiérrez Y. Free-Living Amebae. En: Y. Gutiérrez (Ed). *Diagnostic Pathology of Parasitic Infections with Clinical Correlations*. Ed. Oxford University Press. New York 2000; p 114-42.
31. Sierra L. Demostración del ameboflagelado *Naegleria fowleri* como agente etiológico de meningoencefalitis amébrica primaria en Santiago de Cuba. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas* 2011; 30(3): 318-331.
32. Parija SC, Jayakeerthee SR. *Naegleria fowleri*: a free living amoeba of emerging Medical importance. *J Commun Dis* 1999; 31: 153-9
33. Tiewcharoen S, Junnu V. Distribution of pathogenic *Naegleria* spp. in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2001; 32:172-8.
34. Cervantes-Sandoval L, Serrano-Luna J, Garcia-Latorre E, Tsutsumi V, Shibayama M. Characterization of brain inflammation during primary amoebic meningoencephalitis. *Parasitol Int*. 2008; 53(3): 307-13
35. Koshy AA, Blackburn BG, Singh U. Free living amebas. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases, 7th ed. Cap. 274. Filadelfia: Churchill Livingstone, Elsevier; 2009. p. 3427-36
36. John DT. Primary Amebic Meningo encephalitis and the Biology of *Naegleria Fowleri*. *Ann Rev Microbiol* 1982; 36: 101-23

37. Manual de Procedimientos Estandarizados para la Vigilancia Epidemiológica. Meningoencefalitis amebiana primaria. Amebas de vida libre. Vol 7. 2012. pag 11-28
38. Visvesvara GS y Col. Infections with free-living amebae. Hand Clin Neurol. 2013; 114: 153-168.
39. Culbertson C, Smith J, Minner J. Acanthamoeba: observations on animal pathogenicity. Science. 1958; 127:1506.
40. Leiva B. Ecología de Acanthamoeba spp. En Chile: identificación fenotípica y genotípica en agua, suelo y vegetales [Tesis doctoral]. Chile. Universidad de Zaragoza, 2016. 281 pp.
41. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodríguez-Zaragoza S, et al. J. The Evolutionary History of the Genus *Acanthamoeba* and the Identification of Eight New 18S Rrna Gene Sequence Types. J. Euk. Microbiol. 1998, 45(1): 45-54.
42. Qvarnstrom Y, Thomas NA, Govinda V. Characterization of a New Pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. The Journal of Eukaryotic Microbiology. 2013; 60: 626-633
43. Magnet A, Henriques-Gil N, Galván-Díaz AL, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C, Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. Parasitol Res. 2014; 113: 2845-2850.
44. Hewett MK, Robinson BS, Monis PT, Saint CP. Identification of a new *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence Type, corresponding to the

- species *Acanthamoeba jacobsi* Sawyer, Nerad and Visvesvara. 1992 (Lobosea: Acanthamoebidae). Acta Protozool. 2003; 42:325-329
45. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006; 30: 564-595.
46. Lorenzo-Morales J, Khan NA, Walochnik J. An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. Parasite. 2015; 22: 1-20.
47. Marciano-Cabral F, Cabral Guy. *Acanthamoeba* spp as Agents of Disease in Humans. Clinica Microbiology Reviews. 2003; 16: 273-307.
48. Nwachuku N, Schoeny R, Visvesvara G, Moura H, Martínez J, Jakubowski W, Alizadeh H, Niederkorn J. Health effects support document for *Acanthamoeba*. EPA-822-03-012. May 2003.
49. Siddiqui R, Khan NA. Review Biology and Pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasites & Vectors. 2012; 5:6.
50. Khanna V, Shastri BA, Anusha G, Mukhopadhyay Ch, Khanna R. *Acanthamoeba* meningoencephalitis in immunocompetent: A case report and review of literature. Trop Parasitol. 2014; 4(2): 115-118.
51. Mónica Peralta Amibas de vida libre en seres humanos; Salud Uninorte. Barranquilla (Colombia). 2009; 25 (2): 280-292.
52. Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. J Eukaryot Microbiol. 2005; 52:399-451.

53. Booton GC, Carmichael JR, Vivesvara GS, Byers TJ, Fuerst PA. Genotipado de *Balamuthia mandrillaris* basa en 18S nucleares y mitocondriales 16S rRNA genes. *Am J Trop Med Hyg.* 2003; 68: 65-9.
54. Schuster FL, Dunnebacke TH, Booton GC, Yagi S, Kohlmeier CK, Glaser C, et al. Environmental isolation of *Balamuthia mandrillaris* associated with a case of amebic encephalitis. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 3175-80.
55. Anzil AP, Rao C, Wrzolek MA, Visvesvara GS, Sher JH, Kozlowski PB. Amebic meningoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. *Leptomyxid Ameba. Arch Pathol Lab Med.* 1991:115.
56. Galarza C, Ramos W, Gutierrez EL, Ronceros G, Teran M, Uribe M, et al. Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *Int J Dermatol.* 2009; 48: 1324-9.
57. Bravo FG, mares C. *Balamuthia mandrillaris* encefalitis amebiana: una infección parasitaria emergente. *Curr Infect Dis Rep* 2012; 14: 391-6.
58. Cary LC, Mutilar E, Potter C, Wong P, Nelson PT, dado C, segundo, et al. *Balamuthia mandrillaris* meningoencefalitis: la supervivencia de un paciente pediátrico. *Pediatría.* 2010; 125: 699-703.
59. Jayasekera S, Matin A, J Sissons, Maghsood AH, Khan NA. *mandrillaris Balamuthia* estimula la liberación de interleuquina-6 en las células endoteliales microvasculares cerebrales primarios humanos a través de una vía de la fosfatidilinositol 3-quinasa dependiente. *Microbial Infect.* 2005; 7: 1345-1351.

60. Martínez AJ, Schuster FL, Viśveśvara GS. *Balamuthia mandrillaris*: su potencial patogénico. *J Eukaryot Microbiol.* 2001; (Suppl): 6S-9S.
61. Da Rocha-Azevedo B, Tanowitz HB, Marciano-Cabral F. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2009. doi: 10.1155/2009/251406.
62. Visvesvara GS, Roy S, Maguire JH. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia pedata* [Chapter 101]. En: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, editores, *Tropical infectious diseases: principles, pathogens, and practice.* (3rd ed.), Elsevier, Churchill Livingstone, Philadelphia, PA (2011), pp. 707–713
63. Walochnik J, Wylezich C, Michel R. The genus *Sappinia*: history, phylogeny and medical relevance. *Exp Parasitol.* 2010; 126(1):4-13

## MATRIZ DE CONSISTENCIA

### TITULO: “AMEBAS DE VIDA LIBRE EN LAS POZAS DE LOS BAÑOS TERMALES DE CHURÍN”

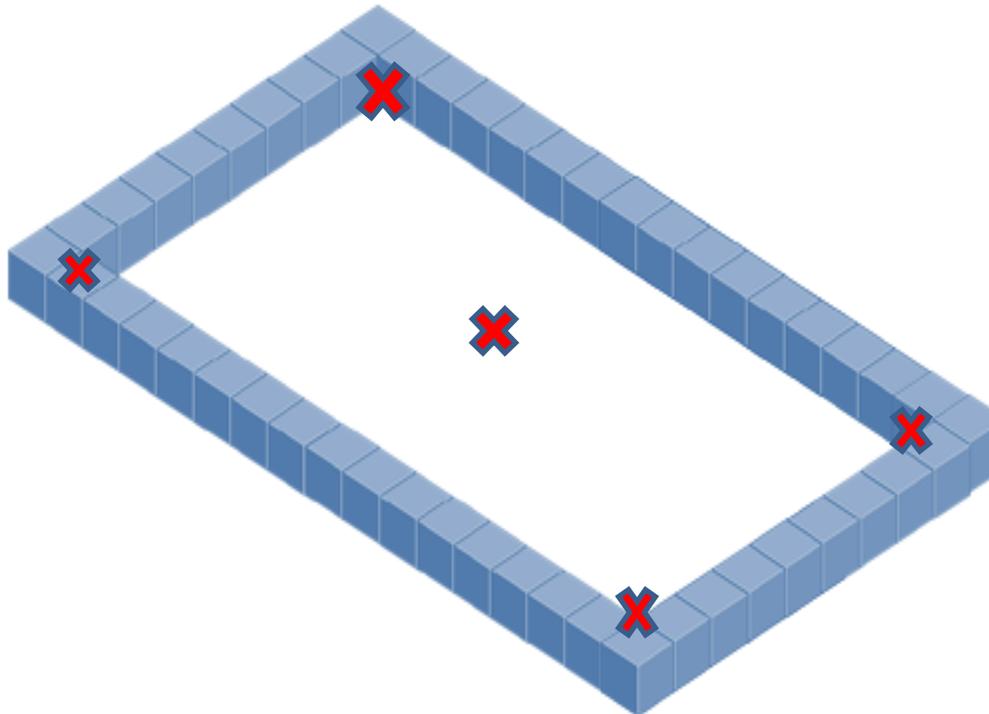
FORMULACION DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	VARIABLES	DIMENSIÓN	INDICADORES Y VALOR	METODOLOGIA	POBLACIÓN/MUESTRA
¿Se encontraran amebas de vida libre en las pozas de los baños termales de Churín?	GENERAL: Determinar la presencia de amebas de vida libre en las pozas de los baños termales de Churín.	INDEPENDIENTE:  Aguas de las pozas de los baños termales de Churín.	Zona de muestreo	Zona de la poza donde se extrae la muestra VALOR: zona superficial y profunda	Diseño: debido a las características de estudio este responde a una investigación de tipo descriptivo, prospectivo, transversal. Descriptivo: Porque la información es recolectada sin cambiar el entorno. Prospectivo: Porque se diseña y comienza a realizarse en el presente pero los datos se analizaran en un determinado tiempo en el futuro. Transversal: Porque se examinaran las características de una población en una sola ocasión.	Población:  Pozas de los baños termales que se encuentren en los 3 complejos termo medicinales ubicadas en el centro del pueblo de Churín y que cuenten con las características de la investigación.  Muestra:  60 muestras de Aguas termales, que se recolectaran mediante el muestreo No Probabilístico de conveniencia obtenida de 6 pozas ubicadas en tres complejos termo medicinal del pueblo de Churín.
	ESPECIFICOS: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Determinar la presencia de amebas de vida libre mediante el examen directo según la temperatura de las aguas en las pozas de los baños termales de Churín.</li> <li>• Determinar la presencia de amebas de vida libre mediante cultivo según la temperatura de las aguas en las pozas de los baños termales de Churín</li> <li>• Determinar la presencia de amebas de vida libre mediante examen directo según la zona de muestreo de las pozas de los baños termales de Churín</li> <li>• Determinar la presencia de amebas de vida libre mediante cultivo según la zona de muestreo de las pozas de los baños termales de Churín</li> </ul>	DEPENDIENTE:  Amebas de vida libre	Temperatura de las aguas termales	Temperatura medida en grados centígrados VALOR: 27° C, 32° C, 35° C y 37° C		
			Microbiología	Examen directo: VALOR: - Positivo - Negativo  Cultivo: VALOR: - Positivo - Negativo		

## ANEXOS

**Anexo N° 1.** Cuadro de operacionalización de variables

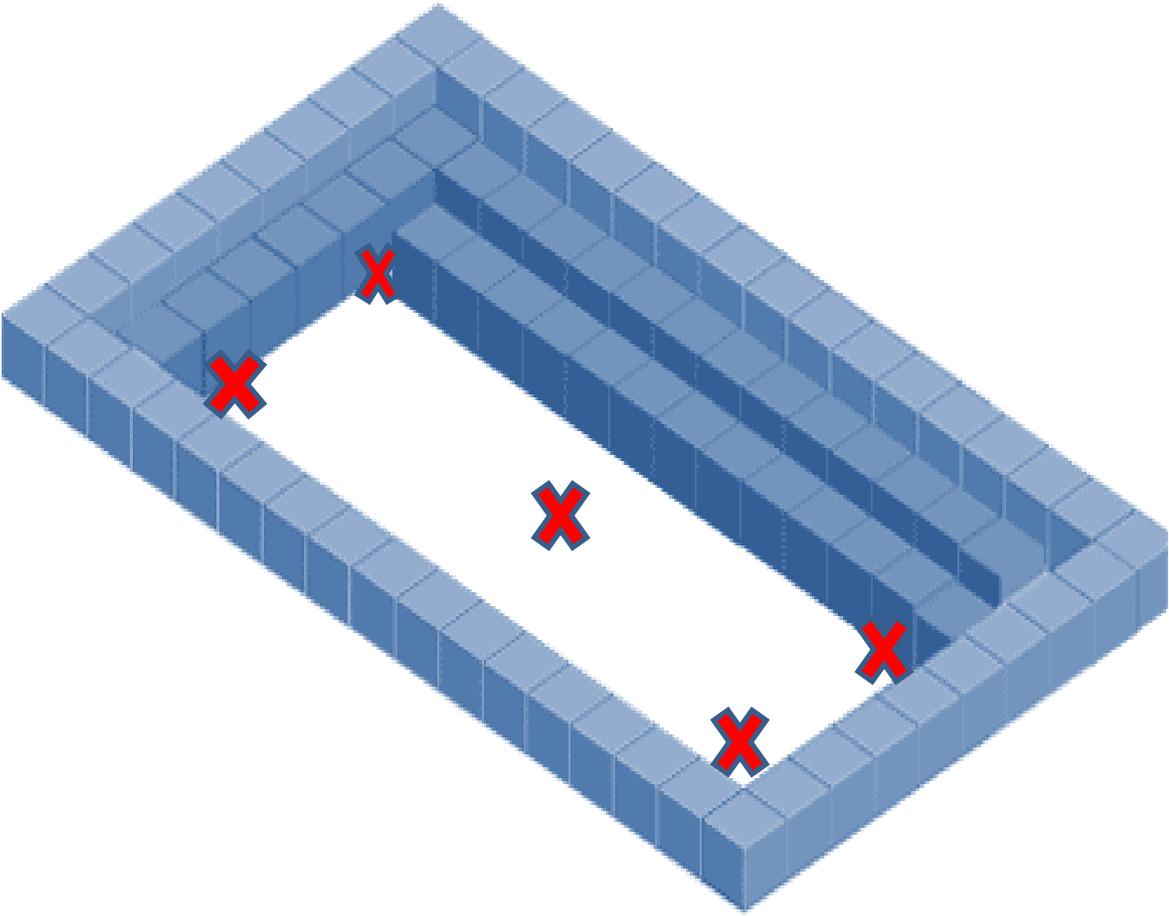
VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN	VALOR
➤ INDEPENDIENTE: Aguas de las pozas de los baños termales de Churín.	Cualitativa	• Zona de muestreo	• Zona de la poza de donde se extrae la muestra	Ordinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Superficial</li> <li>• Profundo</li> </ul>
		• Temperaturas de las aguas termales	• Temperatura medida en grados centígrados	Ordinal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 27° C</li> <li>• 32° C</li> <li>• 35° C</li> <li>• 39° C</li> </ul>
➤ DEPENDIENTE: Amebas de vida libre.	Cualitativa	• Microbiología	• Examen directo	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo</li> <li>• Negativo</li> </ul>
			• cultivo	Nominal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Positivo</li> <li>• Negativo</li> </ul>

**Anexo N° 2.** Obtención de muestra de zona superficial de la poza



OBTENCION DE MUESTRA SUPERFICIAL (S)

**Anexo N° 3. Obtención de muestra de zona profunda de la poza**



OBTENCION DE MUESTRAS PROFUNDAS (P)

## Anexo N° 4. Preparación de materiales y Medio MYAST



Preparación de pipeta pasteur con algodón, listó para la esterilización.



Tubos esterilizados con tapa de algodón listo para la inoculación del medio MYAST.



Medios, Balanza, Matraz, Probeta, Espátula, Agua destilada.



Ingredientes del medio de cultivo ya pesados listo para la preparación.

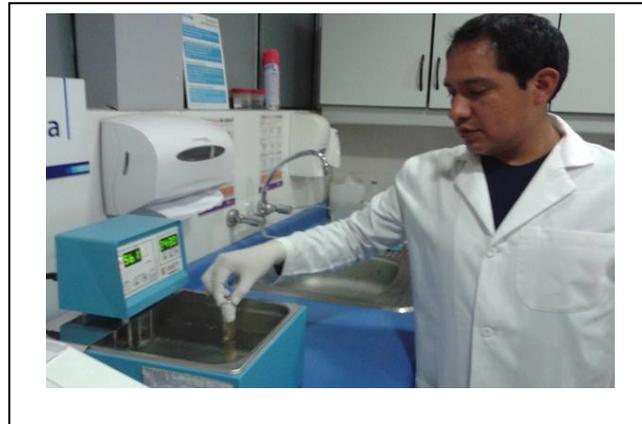


Medio en frascos listo para el autoclavado a 121° C, 15 libras, por 15 minutos.



Traspaso del medio en tubos listo para la inoculación de las muestras.

**Anexo N° 5. Inactivación de E.coli en baño maría**



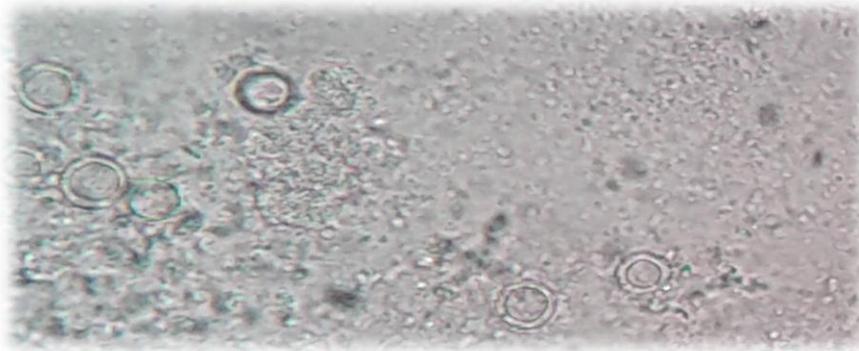
**Anexo N° 6. Recolección de muestra en las pozas de los baños termales**



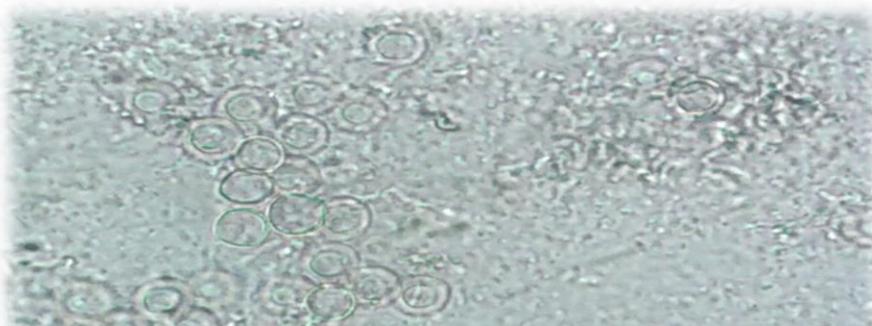
## Anexo N°7. Amebas de vida libre compatible con el género *Naegleria*



**Fig. 1** Trofozoito de ameba de vida libre encontrado en examen directo obtenido de una poza a temperatura de 35 ° C en la imagen podemos observar la presencia de un núcleo central prominente, vacuolas con ectoplasma claro y pseudópodos romos concordantes con el género *Naegleria* .



**Fig. 2** Quiste de AVL proveniente de cultivo en medio MYAST Incubado a 37° C primera lectura de morfología esférica con doble capa y presencia de granulación escasa características concordantes con el género *Naegleria*.



**Fig. 3** quistes de AVL provenientes de una muestra obtenida por raspado de la zona profunda en una poza de los baños termales de Churin, presenta morfología esférica con doble capa y presencia de granulación escasa características concordantes con el género *Naegleria*.



**Fig. 4** Quiste de ameba de vida libre compatible con el género *Naegleria* en proceso de desenquistación.