



**Universidad
Norbert Wiener**

**Facultad de Ciencias de la Salud
Escuela Académico Profesional de Tecnología
Médica**

Aislamiento y caracterización morfológica de
amebas de vida libre patógenas en los baños
termales la calera, Cerro de Pasco, 2019

**Tesis para optar el título profesional de Licenciada
en Tecnología Médica en Laboratorio Clínico y
Anatomía Patológica**

Presentado por:

Rueda Grijalva, Paul Percy
Sulca Gonzales, Jheny Maria

Asesor: Dr. Alfonso Martin, Cabello Vilchez

Código ORCID: 0000-0003-2284-6042

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

A Dios por darme las fuerzas necesarias para vencer cada obstáculo presentado en mi camino.

A mis padres María y Nazario Por estar cada día en éste proceso de formación, por darme su apoyo incondicional, su amor, su tranquilidad, por haberme inculcado de tantos valores.

A mis hermanos Rene y José que en el día a día con su respaldo y cariño me impulsaron a seguir adelante.

A mis Amigos y compañeros por los buenos momentos que hemos compartido, todos hemos aprendido y aprendemos continuamente de nosotros mismos, tanto profesional como en lo personal.

Jheny Sulca .G

Dedico este trabajo a mi madre Angélica Grijalva Alfaro

Y a mis hijas por su paciencia Jadee Rueda López,

Belén Rueda López.

Paul Rueda G

AGRADECIMIENTO

Agradecimiento especial al Dr. Martin Cabello Vílchez, por haber confiado en nosotros para llevar a cabo este gran reto. Gracias por guiarnos en la realización de este trabajo, por todo su tiempo, esfuerzo, dedicación.

Índice

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
CAPÍTULO I	6
EL PROBLEMA	6
1.1. Planteamiento del problema.....	6
1.2. Formulación del problema	8
1.3. Justificación.....	8
1.4. Objetivos.	9
1.4.1. Objetivo general	9
CAPÍTULO II	10
MARCO TEÓRICO	10
2.1. Antecedentes	10
2.1.1. Antecedentes internacionales	10
2.1.2. Antecedentes nacionales	11
2.2. Bases Teóricas.....	12

2.3 Hipóstasis	24
2.4 Variable e indicadores	25
2.5 Definición operacional de términos	25
CAPÍTULO III	26
DISEÑO Y MÉTODO	26
3.1. Tipo de investigación.....	26
3.2. Ámbito de investigación	26
3.3. Población y muestra.....	27
3.4. Técnica e Instrumento de recolección de muestra.....	28
3.5. Plan de procedimientos de datos y análisis de datos.....	32
3.6. Aspectos éticos	33
CAPÍTULO IV	34
4.1. Resultado	34
4.2. Discusión	36
CAPITULO V	38
5.1. Conclusiones	39
5.2. Recomendaciones	39
REFERENCIA	39
ANEXO	47
ANEXO N°1: Matriz de consistencia	51
ANEXO N°2. Carta De Presentación.....	52
ANEXO N°3. Carta De Respuesta	53

ANEXO N°4. Baños termales LA CALERA	54
ANEXO N°5. Recolección de la muestra.....	54
ANEXO N°7. Amebas de vida libre vistas a través del microscopio.....	57

RESUMEN

El presente estudio “Aislamiento y caracterización morfológica de amebas de vida libre patógenas Baños Termales La Calera, 2019”, tuvo como objetivo general demostrar la presencia de amebas de vida libre patógenas en los Baños Termales la Calera – Cerro de Pasco, 2019. La metodología estudio fue de tipo observacional, descriptivo, con corte transversal y con un enfoque cuantitativo, a una muestra de agua de 4 pozas de los Baños Termales La Calera (Pasco), en 6 diferentes momentos, la muestra fue recolectada en función a 200 ml en frascos estériles de boca ancha y tapa hermética, en 2 lugares de la poza: la superficie y el raspado de pared, haciéndose un total de 24 muestras. El proceso fue de forma manual. Se concluyó que, si existe presencia de AVL no identificada en la zona de la superficie de la poza 2 en el momento 4, asimismo de la presencia de la AVL de tipo *Acanthamoeba spp* en la zona de la superficie de la poza 4 en el momento 2 del recojo de la muestra y por último la existe de AVL de tipo *Acanthamoeba spp*. en el raspado de la poza 1 en el momento 2 del recojo de la muestra.

Palabras claves: Ameba de vida libre, Baños termales Y patógenas.

ABSTRACT

The present study “Isolation and morphological characterization of pathogenic free-living amoebae La Calera Thermal Baths, 2019”, had the general objective of demonstrating the presence of pathogenic free-living amoebae in the La Calera - Cerro de Pasco Thermal Baths in 2019. The study methodology was observational, descriptive, with a cross section and with a quantitative approach, to a water sample from 4 pools from the La Calera Thermal Baths (Pasco), at 6 different times, the sample was collected based on 200 ml in sterile glass bottles with wide mouth and hermetic lid, in 2 places in the pool: the surface and the wall scraping, making a total of 24 samples. The process was manual. It was concluded that, if there is presence of unidentified AVL in the area of the well surface 2 at time 4, also of the presence of the AVL of the *Acanthamoeba* sp type in the area of the well surface 4 at the time 2 of the sample collection and finally there is one from AVL of the *Acanthamoeba* sp. in the scraping of the well 1 at the moment 2 of the collection of the sample.

Key words: Free-living amoeba, Thermal and pathogenic baths.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

Las amebas de vida libre (AVL), son denominados protozoos (del griego Proto: primero; Zoo: animal), se encuentran distribuidas en diversos ambientes de la naturaleza (pozas, baños termales, ríos, arroyos y lagos), tienen carácter anfizoíca. (1) es decir, la capacidad de sobrevivir en el medio ambiente y como un endoparásito, y ser resistente a diversas condiciones extremas desde 4°C hasta en 45°C (2).

Estas especies se dividen en dos estadios evolutivos conocidos como estadios infectantes; trofozoíto y quiste (3). En el estadio trofozoíto, este le permite alimentarse, moverse y reproducirse (4). En el estadio quiste, le permite tener resistencia a los ambientes adversos.

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta (CDC, Estados Unidos de América), considera que las AVL son protistas emergentes, causantes de enfermedades letales en humanos y animales (5) (6).

La *Acanthamoeba spp.* es el agente causal de la Queratitis amebiana ocular (QAO) que produce ceguera en individuos inmuno-competentes o usuarios de

lentes de contacto (7). *Balamuthia mandrillaris*, es un agente causal de encefalitis amebiana granulomatosa (EGA) (8). *Naegleria fowleri*, es un agente causal de la meningoencefalitis fulminante (Meningo-encefalitis amebiana primaria) (MEAP). (9) La *Vermamoeba vermiformis* es un agente causal de la Queratitis amebiana (10). Por último, el *Paravahlkampfia ssp.* y la *Sappinia pedata*, es un agente causal del meningoencefalitis amebiana en el ser humano (11). Sin embargo, estos últimos 3 agentes causantes de encefalitis/ meningitis no son mortales, al menos no los casos que han sido publicados y solo se tiene registro de un solo caso de cada uno.

Existen reportes, en diferentes países Latinoamericanos, sobre la presencia de diferentes géneros de amebas; En 1957 Lima, Perú, se publica el primer caso de abscesos amebianos cerebral y meningoencefalitis sin compromiso hepático ni pulmonar. (12) (13). Muchos casos se han descrito en la literatura desde los años 70' y 80' en la costa de Perú. En Venezuela, en los años 1991-92, se estudiaron a 50 pacientes encontrándose *Acanthamoeba spp.* a un 6% de pacientes (ulceras corneales). (14) En Chile 1993, el estudio determinó la presencia, en un 92% de AVL en reservorios de agua dulce. (15)

Por lo expuesto anteriormente, es importante estudiar la presencia de AVL en especial en ambientes donde el público se encuentre altamente expuesto a infectarse con estos agentes. Los baños termales "La Calera", en Cerro de Pasco es llamativo por su antigüedad y por su composición física al ser alimentada por aguas subterráneas de altas temperaturas.

1.2. Formulación del problema

¿Existe amebas de vida libre potencialmente patógenas en los Baños Termales la Calera – Cerro de Pasco, 2019?

1.3. Justificación

Los baños termales son espacios naturales que datan de la época pre-incaica y hoy en día son fuentes importantes de ingresos económicos a los pueblos andinos; por ser un gran atractivo turístico, atrayendo una cantidad importante de visitantes. Sin embargo, estas aguas termales son en su mayoría fuentes naturales que raramente son estudiadas a nivel microbiológico, los cuales muchas veces, son productores de una gran colonización natural de una serie de microorganismos de baja frecuencia como la AVL.

Tal es así que, el incremento de la popularidad de los baños termales y la gran variedad de enfermedades humanas que muchas veces son fatales, se relacionan al mantenimiento y al uso inapropiado estas piscinas, producto muchas veces de organismos cosmopolitas. (16)

Por tal razón que, los Baños Termales la Calera – Cerro de Pasco, presentan la posibilidad de contar con especies patógenas que son capaces de desarrollarse en diferentes ambientes, teniendo como probabilidad los cuerpos de agua con temperaturas mayores a los 30° C (17) constituyendo así uno de los mayores vehículos de transmisión de amebas. Por ello creemos que es importante su estudio.

1.4. Objetivos.

1.4.1. Objetivo general

1. Demostrar la presencia de amebas de vida libre patógenas en los Baños Termales la Calera – Cerro de Pasco, 2019.

1.4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el tipo de amebas de vida libre patógenas de acuerdo al raspado o superficie de los Baños Termales la Calera
2. Establecer la presencia de las amebas libres de acuerdo a sus temperatura y pH de las aguas de los Baños Termales la Calera

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

2.1.1. Antecedentes internacionales

Lares et al., (2018) (19) estudio los géneros potencialmente patógenos de amebas de vida libre que coexisten en una fuente de agua termal en México. Las 42 muestras analizadas demostró la presencia de *Naegleria spp*, *Acanthamoeba spp*, *Vermamoeba vermiformis* y *Stenamoeba spp.*, pero no de *Balamuthia mandrillaris*.

Moreno L. (2018), (18) estudio a las amebas de vida libre como un reservorio de patógenos en aguas tratadas. se aisló e identifico las Ambas de Vida Libre patógenas de especie *Acanthamoeba ssp*, *Balamuthia* y la familia *Vahlkampfiidae* dentro de la cual se encuentra *Naegleria* en las aguas residuales.

Carbal L. (2016) (17) estudio la presencia de amebas de vida libre en las fuentes de agua natural del Municipio Turbaco Cartagena - Colombia. Encontrándose mayormente en un 44,4 % ameba de vida libre *Naegleria spp*. y en un 7,4 %, ameba de vida libre *Acanthamoeba spp*.

Carbal. L. (2014), (20) es 17 no 20 estudio a las amebas de vida libre desde un punto de vista epidemiológico y diagnóstico que afectan en salud del ser

humano. Se concluye que, si existen amebas de vida libre que afectan la salud del ser humano, como son las *Acanthamoeba ssp.* y *B. mandrillaris ssp.* que fueron detectadas en diferentes aguas de la zona de las regiones del país, señalándolos como problemas latentes para la salud pública.

Muñoz X. (2011), (21) estudio la presencia de AVL en las pozas públicas del Municipio de Chinchiná. En un total de 54 muestras de aguas provenientes de 6 pozas del municipio, en 3 momentos diferentes. Se encontró que el 67% (36) resultaron positivas para amebas de vida libre, del 67% de AVL, el 64% ⁽²³⁾ fueron identificadas morfológicamente como *Acanthamoeba ssp.* Un porcentaje superior a lo encontrado en otros países.

2.1.2. Antecedentes nacionales

Peláez L. (2019), (22) su estudio es descriptivo y solo muestra la presencia de amebas sin tipificar. Sin embargo, hay morfotipos no descritos antes.

Minetto M. (2016), (23) estudio a las amebas de vida libre en las pozas de los Baños Termales de Churín. encontrándose con el género *Naegleria spp.* en las pozas de los centros de esparcimientos de los baños termales de Churín.

Iturriaga B. (2015), (24) estudio la detección de amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete. Se logró identificar el 77.7% dio positivo a la presencia de ameba de vida libre, de los cuales el 66.6% de las muestras mostró *Acanthamoeba spp.*, y el 50% fueron compatibles con *Naegleria ssp.* y el 16% fueron *Leptomyxa spp.*

El estudio preliminar realizado por Cabello- Vílchez AM. (2015) (4) estudio las amebas de vida libre en el lago de Chinchaycocha con una altitud de 4.083 msnm en los andes centrales de Perú. El objetivo de su estudio fue documentar las amebas de vida libre en el altiplano a elevaciones superiores a los 4.100 msnm en los Andes centrales peruanos. Se recolectaron muestras del lado izquierdo del lago y después de dos días se procesaron en Lima. Se concluyó que, si se llegó a detectar amebas de vida libre a más de 4.100 msnm como la *Acanthamoeba spp* y *Leptomyxa spp* a pesar de su altitud, estado anóxico y presencia de metales.

2.2. Bases Teóricas

1. Amebas de Vida Libre (AVL)

Las AVL, se encuentran distribuidas en toda naturaleza y pueden sobrevivir en una amplia variedad de hábitats.

Tienen la capacidad de afecta al cuerpo del huésped causando infecciones en el sistema nervioso central e infecciones en piel y pulmones. (25)

El trofozoíto es la forma que se divide y alimenta, se multiplican por fisión binaria asexual. La forma de quiste es la forma de resistencia, en el cual la ameba se mantiene en latencia y puede resistir varios periodos en condiciones adversas como pueden ser la falta nutrientes, sin humedad, pH inadecuado y presiones parciales de O₂ bajas etc.

2. Protozoología de las Amebas de vida libre

3. *Acanthamoeba spp.*

Es una de las amebas más frecuentes de encontrar en los ambientes húmedos, como es en el caso del suelo y del agua. Y también por estar en contacto permanente con los animales y el ser humano. El ciclo de la *Acanthamoeba* se divide en dos fases: trofozoíto y quiste.

El trofozoíto, se movilizan a través de los pseudópodos tipo filamentosos (acanthopodios). Poseen un núcleo central y un prominente nucléolo redondo. Mide desde 15 μm hasta 35 μm . (25)

El quiste, presenta doble capa (el exoquiste y el endoquiste) (26) las que se forma al cuando las condiciones que presentan el medio ambiente no son las más favorables, actuando como respuesta por la presencia de antimicrobianos y por el efecto químicos de desinfección o físico. Mide desde 15 μm hasta 28 μm . (27)

Las *Acanthamoeba spp.* se encuentra agrupadas en tres grupos (I, II, III) de acuerdo con su morfología, de los cuales solo hay descritas 24 especies. (28) Actualmente, son 23 genotipos descritos para las *Acanthamoebas*.

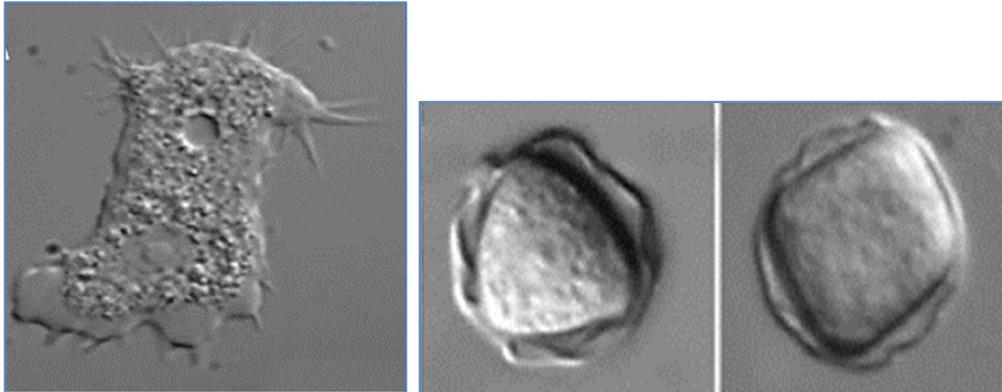


Ilustración 1. Ameba De Vida Libre: *Acanthamoeba* (18)

4. *Naegleria spp.*

La ameba *Naegleria spp.* se las encuentra en las aguas dulces de las pozas, en las aguas de los lagos, en el suelo, etc. (Oddó, 2006). Se han identificado más de 47 especies del género *Naegleria fowleri*, este ha sido demostrado hasta el día de hoy como único patógeno a humanos.

Así mismo, la *Naegleria spp.*, en su ciclo de vida presenta tres estadios, son: estado bi-flagelar, trofozoíto y quiste. Su primer estadio es de forma vegetativa o trofozoíto midiendo 15 hasta 25 μm diámetro, el cual puede estar aislado o en grupos, contando con un aspecto termófilo y reproduciéndose en altas temperaturas de 40°C a 45 °C, llegan a sobrevivir hasta condiciones que le son adversas. Segundo estadio en su forma flagelada es usualmente piriforme, con un diámetro máximo de 12 a 18 μm y tiene habitualmente dos flagelos. Y, por último, el tercer estadio es de forma de un quiste que se pueden observar de formación esférica de 8 a 12

μ , de diámetro mayor, aunque pueden alcanzar hasta 20 μ , presentando una densa pared retráctil con uno o dos poros aplanados. (29)(30).



Ilustración 2. Ameba de Vida Libre: *Naegleria Fowleri* (31)

5. *Balamuthia spp.*

La *Balamuthia*, llega a presentar dos estadios trofozoíto y quiste. De los cuales, los trofozoítos, que miden de 15 a 60 μ m, tienen un peculiar retículo endoplasmático acintado, y se desplazan lentamente mediante amplias proyecciones aplanadas, llamadas lamelipodios, a diferencia de las prolongaciones espinosas del género *Acanthamoeba*. Los quistes miden de 15 a 30 μ m de diámetro y tienen una triple pared. (32). Causa enfermedad en humanos y animales y es altamente mortal. (33)



Ilustración 3. Ameba De Vida Libre: Balamuthia (34)

1. Hábitat

La AVL, existen en toda naturaleza: (35) en el suelo, en agua y hasta en el aire. (36) entre las especies de amebas de vida libre, tenemos a *B. mandrillaris* que viven en aguas naturales, tropicales y subtropicales, proliferándose mejor en esas zonas. (37) (38)

2. Enfermedades causadas por AVL (amebas de vida libre).

Algunas especies de amebas de vida libre pueden producir enfermedades en inmunocompetentes e inmunodeprimidos.

Entre las especies de ameba de vida libre patógenas, tenemos: *A.castellanii*, *A.culbertsoni*, *A.polyphaga*; *Naegleria fowleri* y la *Balamuthia mandrillaris*; y *Sappinia pedata* (39)

1. Meningoencefalitis amebiana primaria (MEAP)

Naegleria fowleri, es la responsable de producir lesiones en los niños, jóvenes y adultos que gozan de buena salud, generando MEAP. altamente letal 98%. El contacto directo con pozas o lagos, fuentes de agua contaminada, en zonas cálidas. (40)

1. Síntomas

Los síntomas de la meningoencefalitis son: las convulsiones, cefalea, irritabilidad, náuseas, fiebre y vómitos, etc. (41)

2. Vías de ingreso

La vía de ingreso de la ameba de vida libre es por las fosas nasales, a través de la aspiración de aguas contaminadas.

El cuadro clínico suele ser fatal, al punto de llegar a la falla cardiorrespiratoria por edema cerebral grave y muerte. (42)

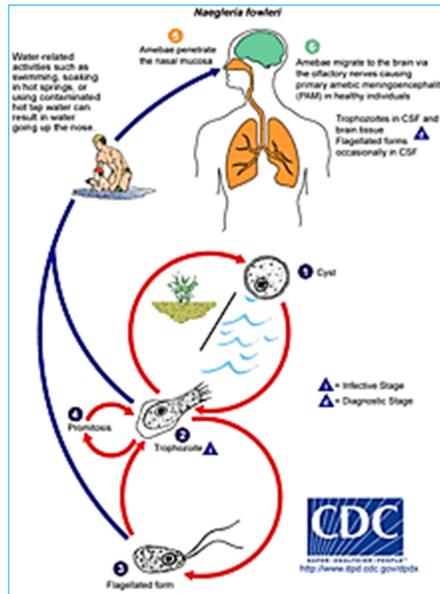


Ilustración 4. La Meningoencefalitis amebiana primaria (MAP). (43)

3. Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG)

La especie de *Acanthamoeba spp.* o la *Balamuthia mandrillaris.* causan infecciones en el sistema nervioso central. Estas infecciones se producen en hospedadores inmunodeprimidas o inmunodeficientes, donde sus defensas están bajas, como es en el caso de las mujeres embarazadas, HIV, diabéticos, etc. (3)

1. Síntomas

Los síntomas encefalitis amebiana granulomatosa son: los episodios convulsivos, cefaleas intensas, la fiebre de alto y bajo grado y a veces cuadros de insuficiencia renal o insuficiencia hepática, etc. (44)

2. Vías de ingreso

La vía de ingreso de las amebas para este problema neurológico, fue ante cedida a una lesión cutáneas o a través de las vías aéreas. (26). En otras palabras primero aparece la lesión cutánea y luego el compromiso neurológico.

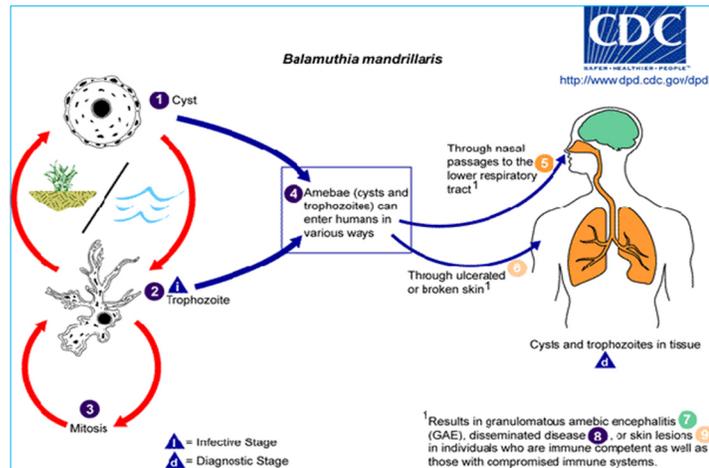


Ilustración 5. Encefalitis amebiana granulomatosa (EAG). (34)

3. Queratitis amebiana (QA)

La especie de ameba de vida libre *Acanthamoeba spp.* Es causante de lesiones en la córnea, que consiste en la inflamación y en la ulceración crónica de la córnea (45) Presentándose en estos últimos años en personas que usan lentes de contacto o en personas que han estado expuestas a aguas contaminadas. (46)

1. Síntomas

Los síntomas de la Queratitis amebiana son: sensación de tener un objeto extraño dentro del ojo, disminución o pérdida de la agudeza visual. (47)

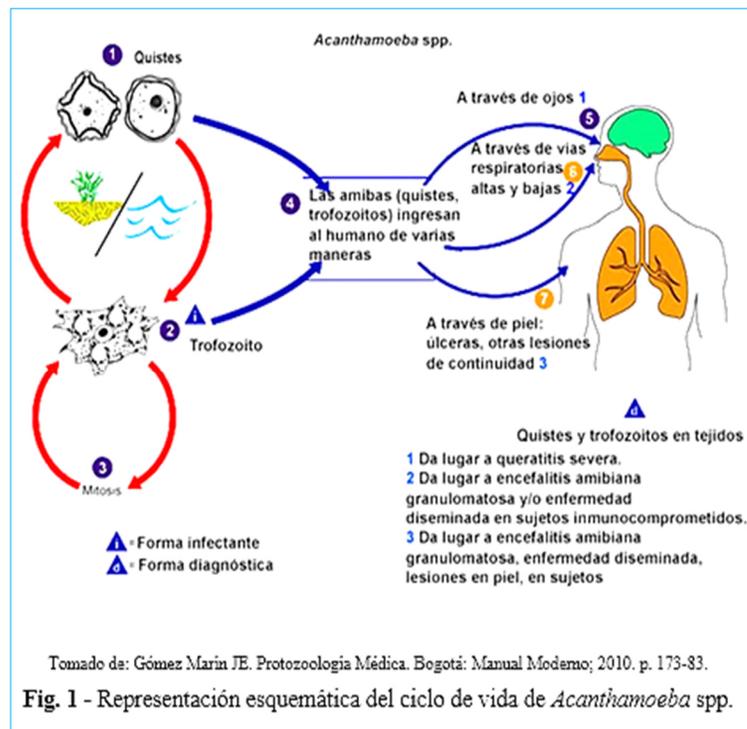


Ilustración 6. Queratitis amebiana (QA) (48)

2. Acanthamebiosis cutánea

Algunas Especies de amebas de vida libre generan infecciones en la piel, las cuales son difícilmente de diagnosticar. Esto sucede muchas veces en personas que están inmunodeprimidas. (49)

3. Síntomas

Las manifestaciones clínicas también dependen del estado de inmunocompetencia, de forma que los pacientes inmunocompetentes presentan múltiples lesiones en la piel, manifestándose de forma aguda, sin compromiso del sistema nervioso central y que evolucionan favorablemente con el tratamiento, solo si son diagnosticados a tiempo.

En general se puede decir que se trata de una manifestación tardía de la diseminación de la acanthamebiosis sistémica. Las lesiones cutáneas se caracterizan por ser papulonodulares, purulentas, aparecen pústulas, placas y celulitis, además de abscesos intramusculares con presencia de trofozoitos en la lesión cutánea.

1. Aguas termales

Las aguas termo minerales son remedios naturales con virtudes curativas acreditadas a lo largo de los siglos.

Por su geografía y pasado geológico, el Perú es un país rico en aguas minerales; desde la antigüedad su aplicación terapéutica es limitada y se basa en el empirismo por parte de los usuarios.

Se denomina agua termal a aquella que emana a la superficie con una temperatura 5 °C más alta que la temperatura superficial; estas aguas proceden de capas subterráneas, las cuales son ricas en diferentes componentes minerales.

El criterio de clasificación puede ser asumido desde diversos puntos de vista: físico, químico, fisicoquímico, bacteriológico y otros, el de mayor aceptación en todo el mundo es el basado en la mineralización.

Las aguas termales son aguas medicinales recomendables en afecciones reumáticas y proceso del aparato locomotor que requieren de rehabilitación de hidroterapia, además de mostrar efectos relajantes y sedantes. (50)

2. El agua en las pozas o baños termales

El agua que se emplea en estas pozas o baños termales deberán ser suministradas naturalmente, de lo contrario se deberá realizar estudios y análisis, y así poder contar con las condiciones sanitarias admisibles. (49)

Así mismo, el agua de estas pozas o baños termales deberán ser constantemente purificadas y recirculadas mediante el ingreso y salida de las mismas, a fin de mantener sus niveles de calidad; así mismo se deberá realizar un constante tratamiento de desinfección en base a verificar los niveles de cloro lo cual debería ser 0.5mg por litros el nivel máximo es de 1.5mg/L, los niveles del pH , etc., a fin de eliminar los microorganismos e impedir el crecimiento de bacterias tanto gran negativas como gran positivas (51)

4. Tratamiento del agua de pozas

El tratamiento que se brinde al agua de pozas o baños termales debe tener una correcta desinfección y para ello existen diferentes tratamientos como el hipoclorito sódico y al contacto con el agua produce ácido hipocloroso (HClO), capaz de destruir bacterias virus y otro microorganismo.

Para que la desinfección sea efectiva el agua tiene que estar con un pH de 7,2 y 7,8 y si no fuese así se tiene que dosificar un ácido que se realiza con bisulfito sódico o ácido clorhídrico. (52)

5. Tratamiento físico del agua

6. Recirculación del agua

La recirculación del agua busca evitar el uso excesivo del agua, retorno en forma continua y rápida a fin de mantener los niveles de calidad de esta, mejorando el tratamiento de desinfección producto de la contaminación de los bañistas. (52)

Tratamiento físico-microbiológico del agua recreacional

Son tratamientos para regular la pureza de los factores físico-microbiológicos y evita riesgos en el ser humano, como: el cloro, el hipoclorito de sodio, el controlador del pH y la alcalinidad. (53)

7. El cloro (Cl₂)

El cloro por su propiedad química es un elemento adecuado para desinfectar el agua de las pozas; su concentración es de 0.5 ppm hasta 2 ppm. (54)

8. El hipoclorito de calcio ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$)

Es una solución al 70% de cloro activo y el resto son óxido y carbono ambos de calcio. (54)

al entrar en contacto con el agua se produce ácido hipocloroso (HClO).

9. Control de pH

Está en base al pH 7.2-7.6, compuesta por agentes biocida, basado en destruir e impedir la acción de un organismo nocivo para el ser humano. (51)

10. Alcalinidad

La alcalinidad debe oxilar entre 125 y 150 ppm, cuenta con una capacidad reguladora, en base al bicarbonato de sodio, que se agrega a las pozas para desinfectarla. (52)

2.3 Hipóstasis

No aplica.

2.4 Variable e indicadores

Variable	Tipo de Variable	de Indicadores	Escala de Medición	Valor
Amebas de vida libre	Cualitativa	Prueba directa	Nominal	1. Presente
				2. Ausente
		Cultivo		1. Presente
				2. Ausente
Clasificación de AVL	Cualitativa	<i>Acanthamoeba spp.</i>		1. Presente
		<i>Naegleria sp.</i>		2. Ausente
		<i>Balamuthia sp.</i>		

2.5 Definición operacional de términos

1. **Ameba de vida libre:** Es un organismo que se está presente en el suelo, en agua y hasta en el aire. (35)
2. **Patógenos:** Es aquel que posee la capacidad de causar enfermedad en el ser humano.
3. **Trofozoíto:** Son estadios de la AVL por su forma le permite alimentarse, moverse y reproducirse. (3)
4. **Quiste:** Es un segundo estadio de la AVL por su forma le permite tener resistencia para sobrevivir a los ambientes extremos adversos. (4)

5. **Aguas termales:** Estas aguas con temperaturas por encima de 4° C a más, Estas aguas poseen minerales en grandes cantidades, que salen del sub-suelo de manera natural. (2)

CAPÍTULO III

DISEÑO Y MÉTODO

1. Tipo de investigación

El estudio fue de tipo observacional, descriptivo, con corte transversal y con un enfoque cualitativo.

2. Ámbito de investigación

Los Baños Termales La Calera se encuentra ubicado en el bosque de Piedras Huayllay provincia de Pasco departamento Cerro de Pasco. Está situada a 4380m s. n. m. en la meseta del Bombón, altiplano de la cordillera de los andes.

Es posible ubicar en las siguientes coordenadas:(11°00'00"S 76°21'55"O).

Los baños termales son producto de aguas subterránea de un volcán inactivo; se caracteriza por presentar temperaturas que alcanzan un máximo de 60°C.

Las aguas de los baños son graduadas por los encargados del área turística para que sean adecuadas a las visitas y uso de turistas.



Ilustración 7. Baños Termales La Calera en Cerro de Pasco. (55)

3. Población y muestra

6. Población

La población estuvo conformada por la muestra por las aguas termales de Huayllay – Cerro de Pasco, que servirán para el aislamiento e identificación de amebas de vida libre patógenas según temperatura y pH de las aguas. El periodo de estudio estuvo comprendido entre junio a diciembre del 2019.

Muestra

Para la realización del estudio se tomaron 24 muestras de aguas termales de diferentes temperaturas y pH, se recolectaron de 4 pozas: 5 muestras superficiales y 1 raspado. En Huayllay Cerro de Pasco.

7. Muestreo

No Probabilístico y de conveniencia.

8. Criterios de selección de la muestra

1. Criterios de inclusión

1. Muestra homogenizada.
2. Correctamente transportadas y colectadas en recipientes estériles y de tapa rosca.
3. Muestras colectadas entre las temperaturas de 30°C a 45°C.

1. Criterios de exclusión

1. Muestras colectadas en las que se observan residuos sólidos contaminantes en el momento del muestreo.
2. Muestras que previo al análisis se observen con turbidez, o presencia de contaminación bacteriana.
3. Muestras con recipientes de colecta abiertos, dañados o con tapas mal colocadas.

1. Técnica e Instrumento de recolección de muestra

Técnica: Observacional

Instrumento: Se utilizará una ficha de recolección de datos previamente elaborada y adaptado por los investigadores a la realidad, de acuerdo a los manuales: *Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae*, publicado por Alexey V. Smirnov y Susan Brown y Frederick Page 1988. ⁽⁵⁵⁾

3.4.1 Toma de la muestra

Las muestras fueron recolectadas de 4 pozas seleccionados por los investigadores, Así mismo, nos permitirá establecer el orden morfológico de las AVL al cual pertenecen y delimitar los procedimientos para la recolección de la toma de la muestra, de acuerdo a la posición, temperatura y el PH del agua.

Procedimiento N°1

Para la obtención de la muestra, primero se determinó las condiciones del agua de las pozas, teniendo en cuenta los siguientes parámetros:

4. pH (7,2 – 7,6 rango requerido para pozas).

El procedimiento por utilizar fue:

1. Se introdujo directamente la tira de pH en las pozas
2. Se comparó el color con la escala de pH
3. Se registró el valor del pH en la guía de observaciones.
4. Temperatura. (Normal sobre los 30 °C)

El procedimiento por utilizar fue:

1. Se introdujo el termómetro directamente en las pozas a unos 25 cm de profundidad.
2. Se mantuvo una agitación constante con movimientos circulares
3. Se registró el valor de temperatura en la guía de observaciones.

procedimiento N°2

La toma de la muestra de agua se realizó en 4 pozas de los Baños Termales La Calera (Pasco), en 6 diferentes momentos. La muestra fue de 200 ml en frascos estériles de boca ancha y tapa rosca, en 2 lugares de la poza: la superficie y el raspado de pared, haciéndose un total de 24 muestras. El proceso fue de forma manual y de la siguiente manera.



1. **Muestra de la superficie:** Se recolecto el agua en el frasco estéril tapa rosca introduciendo el frasco directamente.
2. **Muestra de raspado de la pared:** Se recolecto la muestra utilizando una gasa estéril y se procedió a raspar la pared de la tubería de salida de agua con ello, obteniendo la muestra y guardándolo en un frasco estéril.

Todas las muestras tomadas fueros rotuladas y codificadas.

Procedimiento N°3

Las muestras fueron empaquetadas y conservadas a temperatura ambiente para su traslado desde Cerro de Pasco a Lima hasta su procesamiento en el laboratorio.

Procedimiento N°4

Preparación del medio de cultivo Agar no Nutritivo (ANN):

1. 20g de agar
2. 1000 ml solución salina 0.9 %
3. Tubo estéril (suspensión de E. coli)
4. Cepa de E. coli.
5. Placas petri estériles descartables

Se vertió 20g de agar en 1000ml de solución salina al 0.9% y se esterilizó en autoclave posteriormente de plaqueo en placas estériles de 90x15mm.

Se llenó, el tubo estéril con suero fisiológico y se hizo una suspensión con E.coli, se vertió la suspensión bacteriana en las placas con el medio de cultivo en toda la superficie de este y se llevó a incubar a 37 °C por 24 horas.

Procedimiento N°5

En el laboratorio Preparamos las placas de agar no nutritivo cubiertas con *Escherichia coli*, se le agregó 5 gotas de cada muestra en forma de cruz a

cada medio de cultivo, obteniendo 72 siembras en total, esto se realizó con la finalidad de garantizar el mayor crecimiento de AVL.

Las 72 siembras se llevó a incubar a 30 °C de 7 a 10 días, después de estos días se buscó amebas de vida libre a través del microscopio y al no tener evidencia clara por contaminantes, clonamos en placas nuevas con E.coli para poder obtener cultivos más limpios y libre de contaminantes y se los llevo a incubar por 7- 10 días más.

Pasado los 10 días observamos al microscopio, los que no había presencia de amebas se dejaban en observación de 20 a 90 días. Consideramos presencia de amebas de vida libre al observar a través del microscopio quistes de AVL.

1. Plan de procedimientos de datos y análisis de datos

1. Procedimientos administrativos:

1. Se solicitó la aprobación del proyecto de investigación a la Universidad Norbert Wiener.
2. Se redactó la solicitud dirigido a las autoridades de la administración de los Baños Termales la Calera, con la finalidad de obtener la autorización y brindar facilidades para realizar el estudio.
3. Se coordinó con las autoridades de la administración de los Baños Termales la Calera, a fin de programar el horario para la recolección de las muestras.

4. Se aplicó los criterios de inclusión y exclusión, para la recolección de la muestra

5. Análisis de los datos

Los datos fueron organizados haciendo uso del programa Microsoft Excel 2010 Los resultados se presentarán en tablas de Excel.

1. Aspectos éticos

La investigación, respeta los aspectos bioéticos de la investigación científica. se respetaron las condiciones medio-ambientales de los baños termales, evitando impactos negativos durante la recolección de muestras.

CAPÍTULO IV

RESULTADO Y DISCUSIÓN

4.1. Resultado

Cerro de Pasco es una ciudad del centro del Perú, capital de la provincia de Pasco y el departamento Cerro de Pasco. Está situada a 4380 m s. n. m. (metros sobre el nivel del mar), en la meseta del Bombón, altiplano de la cordillera de los Andes.

Los baños termales “La Calera” se encuentra ubicado en el bosque de Piedras Huayllay en el departamento Cerro de Pasco. Es posible ubicar en las siguientes coordenadas: (11°00'00"S 76°21'55"O)

Baños termales de La Calera tiene 3 piscinas y una cueva volcánica desde donde se puede observar el Bosque de piedras de Huayllay. Actualmente existe 4 pozas de los Baños Termales La Calera (Pasco),

Estas aguas termales se caracterizan por presentar temperaturas que alcanzan un máximo de 60°C. Nosotros tomamos las muestras de estas aguas termales en el mes de junio a diciembre del 2019 en 5 diferentes momentos, para aislar amebas de vida libre.

Nosotros tomamos muestras de las 4 pozas, por cada poza se tomo 5 muestras de agua superficial y 1 muestra de raspado, en total fueron 24 muestras de agua y raspado de la superficie de la poza.

De las 4 pozas, se consiguió aislar amebas de vida libre en 3 de ellas. En las pozas N° 1 y N°4 se aisló *Acanthamoeba spp.* y en la N° 2 ameba desconocida.

[*Insertae Sedis*]

La proporción de éxito en el aislamiento es de un **12.5%** de Amebas de Vida Libre en las pozas termales de Cerro de Pasco.

Cuadro de resultados de nuestros hallazgos

Aislamiento de amebas de vida libre en las aguas termales de LA Calera Cerro de Pasco, Perú.						
	S1	S2	S3	S4	S5	R-A
Poza N°1	-	-	-	-	-	+
Poza N°2	-	-	-	+	-	-
Poza N°3	-	-	-	-	-	-
Poza N°4	-	+	-	-	-	-

S= superficie; R-A= raspado A,

R-A = Quiste de *Acanthamoeba sp.*

S2 = *Acanthamoeba sp*

S4 = ameba desconocida [*Insertae Sedis*]

Las temperaturas de las pozas fueron:

Poza-1= , Poa 2= , Poza 3 = , Poza 4 =

la poza N°1 y N° 4 el cual contaba con una temperatura de 35°C y un pH de 7

la poza N° 2 con una temperatura entre 35 – 45°C y un pH de 7

4.2. Discusión

Las fuentes de agua termales en nuestro país son un atractivo turístico muy cotizado, pero con bajo presupuesto para establecer un mejor servicio al turista. Además, el desinterés de los académicos y personal sanitario y de las propias autoridades regionales que tienen a su cargo personal que es responsable de las evaluaciones microbiológicas no ejercen sus funciones en el sentido estricto de evaluaciones a nivel microbiológico incluyendo muchos otros potenciales patógenos.

Como se ha podido evidenciar, al menos 3 pozas de 4 poseen amebas de vida libre, pero solo dos se ha observado alta proliferación de *Acanthamoeba* sp.

Las Amebas de Vida Libre son un grupo heterogéneo de eucariotas (56), que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza en todo el mundo, son muy abundantes en la naturaleza y en las zonas urbanas/rurales, ya que pueden sobrevivir en una amplia variedad de hábitats, incluyendo ambientes inhóspitos, gracias a su poca demanda de alimento y a que puede formar estructuras conocidas como quistes que las hacen resistentes.

Las amebas de vida libre (AVL) son microorganismos que habitan el suelo, polvo, agua, hielo, viento etc (57) , son ubicuos en el medio ambiente (58), algunas especies son de importancia clínica debido a que son capaces de causar una alta tasa de mortalidad >98%. Sin embargo, es una entidad clínica de baja frecuencia y por ello suele pasar desapercibida.

La cantidad de aguas termales que posee el Perú es impresionante, así como impresionante la escasísima literatura respecto a la presencia de amebas de vida libre en estas fuentes termales.

En otros países se ha demostrado que el agua termal podría albergar *Acanthamoeba sp*, *Naeglerias sp* y *Balamuthia mandrillaris* (59). Este artículo provee la evidencia que es posible que en nuestro país podamos encontrar amebas en aguas termales y ser altamente peligroso a los turistas.

Creemos que deberían de incluir a las amebas de vida libre dentro de un grupo de microorganismos con alta capacidad patogénica y con prioridad "1" en fuentes de agua recreacionales, termales y piscinas.

Este tipo de acciones podrían lograr de alguna manera, mejorar los aspectos sanitarios de los balnearios y la seguridad en materia de salud.

Sin embargo, hace falta una legislación ordenada y beneficiosa y después una fiscalización efectiva con sanciones ejemplares.

La infección por amebas de vida libre podría ser una cuestión de vida o muerte, y por lo tanto debe existir una garantía en los establecimientos que brinden Piscinas y/o baños termales.

La casuística de enfermedad letal por *Balamuthia mandrillaris* en Perú es muy clara. (60)

En Perú, lo común es que aparezca lesiones cutáneas y posterior a este, aparecen las lesiones cerebrales. El 98 % de los pacientes con esta presentación clínica sucumben a la infección. Los tratamientos no están estandarizados, es

decir no es posible predecir qué sucederá con el paciente administrándole el fármaco. (60)

El presente estudio sobre el aislamiento y caracterización morfológica de las amebas de vida libre potencialmente patógenas de los baños termales la calera del Distrito de Huayllay, provincia y departamento de Pasco, 2019 a más de 4,000 msnm es un hallazgo importante.

Sin embargo, en la tesis de Centeno 2016 interesantemente se hace referencia a un estudio realizado en Cusco. En una tesis de hace 20 años exactamente, que la publicó (61). *En su trabajo sobre prevalencia de Naegleria y Acanthamoeba en aguas geotermales y geomedicinales de las localidades de la Raya-Aguas Calientes, afirmó que de 30 muestras de aguas procesadas: El 16.7% corresponden a Acanthamoeba spp. Así mismo de 14 muestras de agua de uso recreacional un 50% fue positiva para Acanthamoeba, encontrándose Acanthamoeba spp en la zona de San Pedro más no en San Pablo.*

Creemos que es necesario que más estudios de este tipo se hagan a fin de hallar los agentes potencialmente indecisos en estos fuetes de agua y realizar controles periódicos.

CAPITULO V

CONCLUSIÓN Y RECOMENDACIÓN

5.1. Conclusiones

1. Se concluye que, a través del examen directo y de cultivo se evidencio presencia de ameba de vida libre
2. Se concluyó que, los factores que contribuyen a su existencia de ameba de vida libre son la temperatura y el pH.
3. Se concluyó que, si existe amebas de vida libre según su morfología en las aguas termales de la Calera, Cerro de Pasco, Perú. A 4000 msnm

5.2. Recomendaciones

1. Se recomienda la evaluación microbiológica de las piscinas termales en el Perú, incluyendo en los parámetros la búsqueda de amebas de vida libre potencialmente patógenas.
2. Se recomienda una política educativa a los administradores de piscinas. La salud de muchas personas dependería de la información que dispone el administrador y de los riesgos que existen al exponerse a una piscina contaminada con amebas de vida libre.
3. Se sugiere que el ministerio de Salud en coordinación con otros sectores del gobierno asesore a los administradores y otorgue mecanismos de control y evaluación continua sin tener que cerrar las fuentes de ingreso a dichas poblaciones que dependen del turismo de las aguas termales.

REFERENCIA

1. Page F. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae. Reino Unido: Freshwater, Biological Association; 1988.
2. Da Rocha- Azevedo H , Tanowitz F , Marciano-Cabral. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. Interdisciplinary perspectives on infectious diseases. 2009;(1- 14).

3. Visvesvara G , Moura H , Schuster F. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007; 50(1–26).
4. Cabello-Vílchez A. *Acanthamoeba* spp. Un agente oportunista en Infecciones Humanas. *Revista de Investigación de la Universidad Nobert Wiener*. 2015; 4(11-32).
5. Visvesvara GS. Infections with free-living amoebae. *Handbook of Clinical Neurology*. 2013; 153(68).
6. Costamagna, S. *Parasitosis regionales Buenos aires: UNS; 2005.*
7. Ávila I , Infante D , Llovera V , Álvarez O , Briceño M. Amibas de vida libre potencialmente patógenas en aguas del parque “Las Cocuizas”. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 2006; 58.
8. Cuevas M , Smoje G , Jofré L , Ledermann W , Noemí I. Meningoencefalitis granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: Reporte de un caso y revisión de la literatura. *Revista chilena de infectología*. 2006; 23(237-42).
9. Visvesvara G , Stehr-Green J. Epidemiology of free-living amoeba infections. *J Protozool*. 1990 Julio-Agosto; 37(25S-33S).
10. Visvesvara G , Sriram R , Qvarnstrom Y. *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningo encephalitis. *J. Eukaryot. Microbiol*. 2009;; p. 357-66.
11. Bermúdez A , Pérez M , Pérez E. *Acanthamoeba* en el Servicio de Oftalmología del Hospital Universitario de Caracas. *Anales del Instituto Barraquer*. 1993; 24(63–68).
12. Seas C , Bravo F. Encefalitis amebiana granulomatosa por *Balamuthia mandrillaris*: una enfermedad reconocida cada vez más frecuentemente en

- América Latina. Chil Infectol. 2006; 3(197-99): p. 197-99.
13. Koopp J, & McKee H. Methods for chemical analysis of water and wasted. Academic Press, Springfield; 1998.
 14. Muñoz V , Reyes H , Astorga B. Amebas de Vida Libre en habitats de aguas dulces de Chile. Parasitol al Día. 1993; 17(147-52).
 15. Delgado J , Aguila E. Abscesos amebianos cerebrales y meningoencefalitis. Arch Peru Patol Clin. 1957; 6(21-26).
 16. Deligiorgis A, Xekoukoulotakis P, Diamadopoulos E. Electrochemical oxidation of table olive processing wastewater over boron-doped diamond electrodes. Water Research,. ; 2008. Report No.: 12(3).
 17. Carbal L , Foen L , Morales- Aleans M. Amebas de Vida Libre aisladas en aguas superficiales del municipio de Turbaco, Bolívar-Colombia. Cubana de Medicina Tropical. 2016; 68(59-69).
 18. Moreno L. Estudio del papel de las amebas de vida libre como reservorio de Helicobacter pylori y otras bacterias patogenas en aguas y alimentos mediante tecnicas moleculares. Doctoral. Valencia: Universitat Politecnica de Valencia; 2018.
 19. Lares L. Estudio los géneros potencialmente patógenos de amebas de vida libre que coexisten en una fuente de agua termal. Mexico:; 2018.
 20. Dávila A. Epidemiología y diagnóstico de amebas de vida libre implicadas en salud humana. Tesis Doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia; 2014.
 21. Muñoz X , Quintero G. Determinar la presencia de AVL en piscinas del Municipio de Chinchiná. Pre grado. Caldas: Universidad Ccatólica de Manizales, Semillero de Investigación de Enfermedades Infecciosas; 2011.

22. Peláez D. Descripción morfológica de Amebas de Vida Libre en fuentes ambientales en Lima Metropolitana. Tesis Pregrado. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia, Tecnología Medica - Especialidad en Laboratorio Clínico; 2019.
23. Minetto Marynn , Lima R. Amebas de vida libre en las pozas de los Baños Termales de Churín. Pre Grado. Lima – Perú: Universidad Norber Wiener, Tecnología Medica en Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica; 2016.
24. Iturrizaga R. Detección de amebas de vida libre en aguas de regadío de la zona agrícola de Cañete. Tesis Pregrado. Lima – Perú: Universidad Alas Peruana, Tecnología Medica; 2015.
25. Castrillón J , Orozco L. Acanthamoeba spp. como parásitos patógenos y oportunistas. Revista chilena de infectología. 2013; 2(55-147).
26. Schuster F , Visvesvara G. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol. 2004; 34(9)(1001-27).
27. Aksozek A , McClellan K , Howard K. Resistance of Acanthamoeba castellanii cysts to physical, chemical, and radiological conditions. J Parasitol. 2002; 88 (3)(621-3).
28. Page, W.. An illustrated key to freshwater and solid amoebae, with notes on cultivation and ecology. Freshwater Biological Association. 1976; 1(153-155).
29. Becerril M , Romero R. Parasitología médica, de las moléculas a la enfermedad. Monterrey. McGraw-Hill interamericana S.A. 2008.
30. Webconsultas. Ameba "comecerebro", un parasito mortal. [Online].; 2019 [cited 2019 Agosto 05. Available from: <https://www.webconsultas.com/curiosidades/ameba-come-cerebros-un->

parasito-mortal-12191.

31. Naegleria Fowle. Trofozoito. Depto. de Parasitología, ENCB-IPN. [Online]. Available from: <https://www.nbcnews.com/healthmain/deadly-brain-amoeba-infects-us-tap-water-first-time-8C11172643>.
32. Fernández C. Estudio sanitario de las piscinas. Tesis Doctoral. España: Universidad de Madrid, Facultad de Medicina; 1964.
33. Martínez P , Ma P , Vivesvara S , Martínez E. Naegleria and Acanthamoeba infections. Review Infection Disease. 1985; 3(490–513).
34. Viajoseguro.org. Guia de enfermedades. [Online].; 2016 [cited 2019 Agosto 05]. Available from: <http://fundacionio.org/viajar/enfermedades/acanthamoeba.html>.
35. Rivera, F. , Garcia, G. , Lugo, A. , Zierold, E. , Islas, J. , Ramirez, E. , et al. Amoebae in a waste stabilization pond system in México. Water. Air and Soil Pollution. 1985; 3(185-198).
36. Bonilla, P.. Heterogeneidad de las amebas de vida libre con potenciales patógenos aislados de la atmósfera de la Ciudad de México. Tesis Doctoral. México: Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Ciencias; 1999.
37. Pernin P , Pélandakis M , Rouby Y , Faure A. Comparative recoveries of Naegleria fowleri amoebae from seeded river water by filtration and centrifugation. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64(955-959).
38. Carter RF. Primary Amoebic Meningo-Encephalitis. An Appraisal of Present Knowledge. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1972; 66(193-213).
39. Lavande V , Marcel F. A case of primary amoebic meningoencephalitis in a Nigerian farmer. Europe Publishing Medicine Central. 1980; 29(21-25).

40. Wikipedia®. Meningoencefalitis amebiana primaria. [Online].; 2019 [cited 2019 Agosto 05. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Meningoencefalitis_amebiana_primaria.
41. Trabelsi H1 , Dendana F , Sellami A , Sellami H. Pathogenic free-living amoebae: epidemiology and clinical review. *Pathol Biol (Paris)*. 2012; 60(6)(399-405).
42. Por Y , Mehta J , Chua J , Koh T , Khor W , Fong A. Acanthamoeba keratitis associated with contact lens wear in Singapore. *Am J Ophthalmol*. 2009; 148(1)(7-12).
43. Graffi S , Peretz A , Jabaly H , Koiefman A , Naftali M. Acanthamoeba keratitis. study of the 5-year incidence in Israel *Br J Ophthalmol*. 2013; 97(11)(1382-3).
44. Knickelbein J , Kovarik J , Dhaliwal D , Chu C. Acanthamoeba keratitis: a clinicopathologic case report and review of the literature. *Hum Pathol*. 2013; 44(5)(918-22).
45. Galarza C , Ramos W , Gutierrez E. L , Ronceros G , Teran M , Uribe , et al. Cutaneous acanthamebiasis infection in immunocompetent and immunocompromised patients. *International Journal of Dermatology*. 2009; 48(1324–1329).
46. Elsevier. *Infectio*. [Online].; 2015 [cited 2019 Agosto 05. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-infectio-351-articulo-balamuthia-mandrillaris-el-peru-lesiones-S0123939215001010>.
47. Valenzuela, M. *Compendio de hidrología médica* Madrid: Científico-Médica; 1968.
48. Mosquera, J. Las ventajas de bromados para la desinfección de piscinas y spas. *Piscinas Microbiológicas*. 1992; 78–81(7(2)).

49. Arboleda J , Valencia M. Teoría, diseño y control de los procesos de clarificación del agua. Lima: Organización Panamericana de la Salud. 2001.
50. Maxe M. Estudio de la calidad fisico-mineromedicinal del agua termal de los baños del inca. *investigacion y cultura*. 2015 Enero -Junio; 4(1).
51. Healy G , Rodgers M , Mulqueen J. Performance of a stratified sand filter in removal of chemical oxygen demand, total suspended solids and ammonia nitrogen from high-strength wastewater. [Online].; 2006. Available from: https://www.google.com/search?q=cual+es+la+consentracion+de+cloro+en+las+piscinas&rlz=1C1CHBD_esPE868PE869&oq=cual+es+la+consentracion+de+cloro+en+las+piscinas&aqs=chrome.69i57j33i2.9767j0j8&sourceid=chrome&ie=UTF-8.
52. Fair G , Geyer J , Okun D. Water and wastewater engineering. [Online]. New York: John Wiley & Sons Inc; 1998. Available from: https://www.google.com/search?rlz=1C1CHBD_esPE868PE869&sxsrf=ALeKk02ghOKVgmscxZvJ5ybGYBJJdtHzow%3A1594701841551&ei=ETgNX5qqIf3F5OUP0P2Z2AE&q=alcalinidad+de+una+piscina&oq=alcalinidad+de+una+piscina+&gs_lcp=CgZwc3ktYWIQAxgAMgIIADIGCAAQFhAeMgYIABAWEB4yBggAE.
53. Smirnov , Brown S. Guía de los métodos de estudio e identificación de Gymnamoebae de suelo. *Protistología - Departamento de Zoología de Invertebrados*. 2004; 3 (3), (148-190).
54. A. Determinación de la presencia de amebas de vida libre en piscinas de centros de recreación en los departamentos de Guatemala y escuintla que se encuentran aledaños a la carretera internacional al pacífico ca-9 sur. Guatemala: Universidad De San Carlos De Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas Y Farmacia; 2017.
55. Breaking. Baños Termales La Calera en Pasco, posee propiedades curativas.

[Online].; 2019 [cited 2019 Agosto 05. Available from: <https://www.peruenvideos.com/banos-termales-la-calera-propiedades-curativas-pasco/>.

56. Rodríguez-Zaragoza S. Ecology of free-living amoebae. 1994.
57. Schuster F, Visvesvara G. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of human and animals. *Int J Parasitol.* ; 2004. Report No.: 34(9).
58. Martínez A. Free living Amoeba: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of Disease CRC Press. Boca Raton - FL.; 1985.
59. Latifi A, Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Haghghi A, Seyyed Tabaei S, Lasjerdi Z. Presence of *Balamuthia mandrillaris* in hot springs from Mazandaran province, northern Iran. *Epidemiol Infect.* ; 2016 Aug. Report No.: 144(11).
60. Bravo FG, Gotuzzo E. Cutaneous manifestations of infection by free living amoebas, In: Tying, S.K., Lupi, O., Henage, U.R. (Eds.). ; 2017.
61. Uscamayta LA. Búsqueda de amebas de vida libre *Naepleria*, *Acantomoeba* en Aguas Calientes-La Raya, aguas termales y geomedicinales”. Seminario curricular. UNSAAC, Facultad de Ciencias Biológicas; 1999.

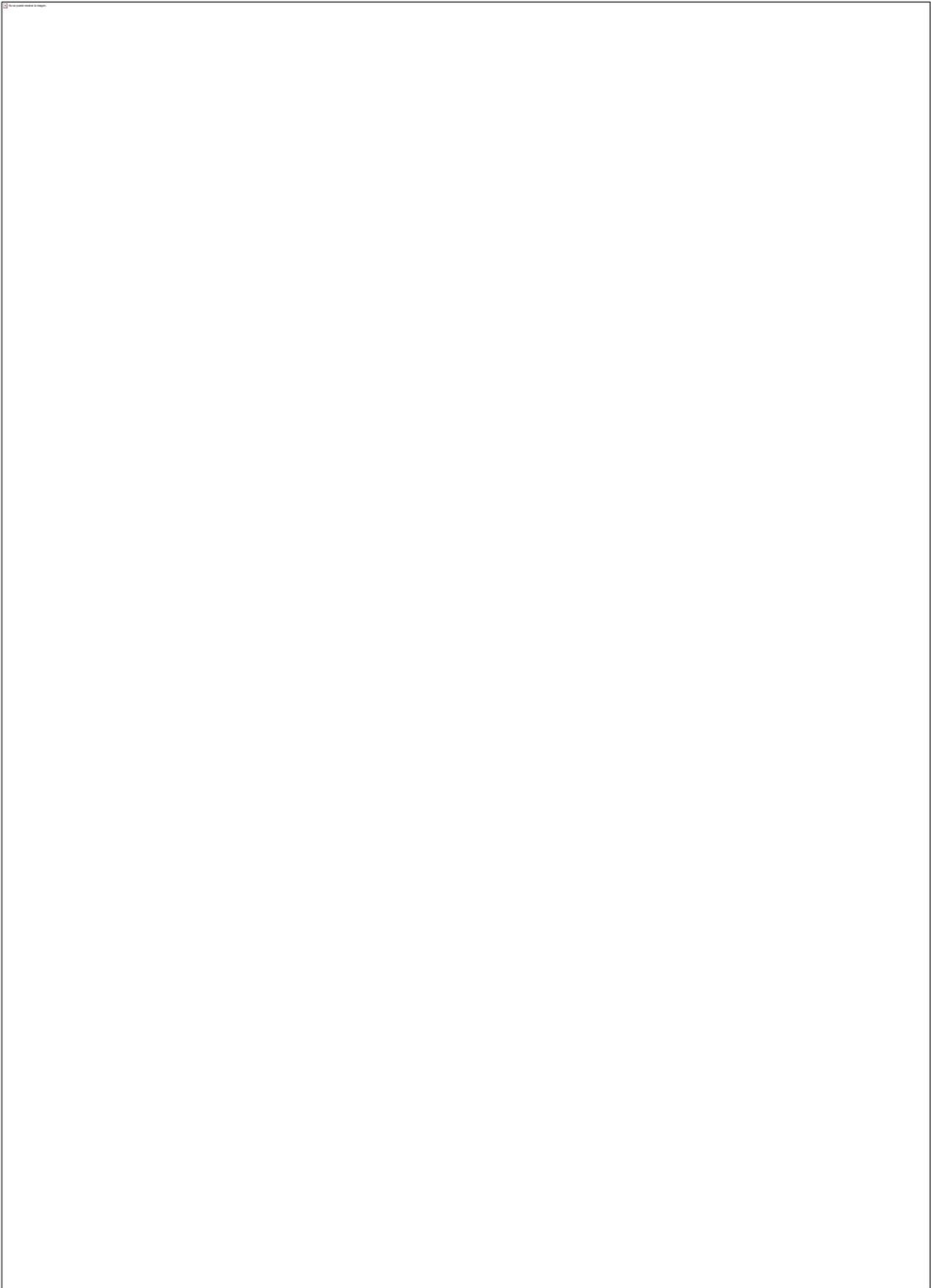
ANEXO

ANEXO N°1: Matriz de consistencia

Titulo	Formulación De Problema	OBJETIVO	Variables	Indicador	Tipo De Investigación Y Población
<p>“aislamiento y caracterización morfológica de amebas de vida libre patógenas en los baños termales la Calera – Cerro de Pasco, 2019”</p>	<p>¿Existe amebas de vida libre potencialmente patógenas en los Baños</p>	<p>Objetivo general</p> <p>Demostrar la presencia de amebas de vida libre patógenas en los Baños</p>	<p>Amebas de vida libre patógenas</p>	<p>Examen directo</p>	<p>Metodología:</p> <p>El estudio de tipo observacional, descriptivo, con corte transversal y con un enfoque cuantitativo.</p>
		<p>Objetivos específicos</p> <p>1. Determinar el tipo de amebas de vida libre patógenas de acuerdo al raspado o superficie de los Baños Termales la Calera</p>		<p>Examen Cultivo</p>	<p>Población</p> <p>La población estará conformada por muestras de las aguas termales que servirán para el aislamiento e identificación de amebas de vida libre patógenas. Periodo de estudio comprendido entre junio a diciembre del 2019.</p>
<p>“aislamiento y caracterización morfológica de amebas de vida libre patógenas en los baños termales la Calera – Cerro de Pasco, 2019”</p>	<p>¿Existe amebas de vida libre potencialmente patógenas en los Baños</p>	<p>2. Establecer la presencia de las amebas libres de acuerdo a sus temperatura y pH de las aguas de los Baños</p>	<p>Clasificación de la ameba de vida libre</p>	<p><i>Acanthamoeba spp.</i> <i>Naegleria spp.</i> <i>Balamuthia spp.</i></p>	<p>Muestra</p> <p>Se trabajará con la totalidad de muestras que cumplan los criterios de selección.</p>
		<p>Muestreo</p> <p>No Probabilístico y de conveniencia.</p>			

Termales la Calera

ANEXO N°2. Carta De Presentación



ANEXO N°3. Carta De Respuesta



COMUNIDAD CAMPESINA DE HUAYLLAY
Fundado el 09 de SETIEMBRE de 1854
Pasco - Perú

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

HUAYLLAY 14 DE OCTUBRE DEL 2019

CARTA N° 006 - CCSJH/P - 2019

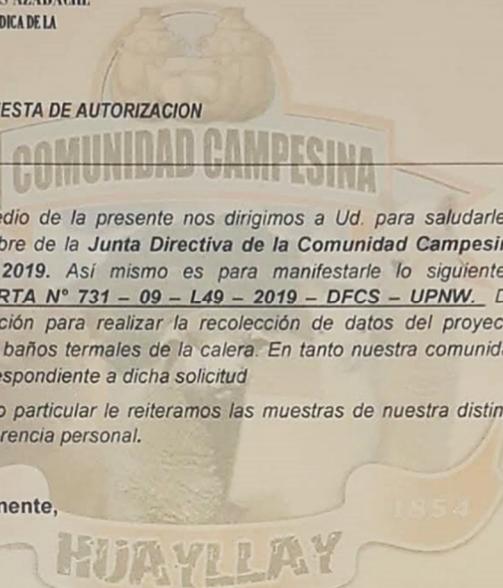
Dr. JUAN CARLOS BENITES AZABACHE
PRESIDENTE DE LA EAP TECNICO MEDICA DE LA
UNIVERSIDAD NORBERT WIENER

ASUNTO : RESPUESTA DE AUTORIZACION
PRESENTE.

Por medio de la presente nos dirigimos a Ud. para saludarle muy cordialmente a nombre de la **Junta Directiva de la Comunidad Campesina de Huayllay periodo 2019**. Así mismo es para manifestarle lo siguiente; **En referencia a la CARTA N° 731 - 09 - L49 - 2019 - DFCS - UPNW**. Donde solicitan la autorización para realizar la recolección de datos del proyecto de Investigación en los baños termales de la calera. En tanto nuestra comunidad da la autorización correspondiente a dicha solicitud

Sin otro particular le reiteramos las muestras de nuestra distinguida consideración y deferencia personal.

Muy atentamente,



COMUNIDAD CAMPESINA DE HUAYLLAY



Comun. Campesina
PRESIDENTE



COMUNIDAD CAMPESINA
HUAYLLAY
Alcalde CRISTOBAL VICENTE
FISCAL



Oficina:
Plaza Principal Huayllay

Correo Electrónico:
Comu.cam.huayllay@gmail.com

ANEXO N°4. Baños termales LA CALERA



Entrada de aguas termales LA CALERA

ANEXO N°5. Recolección de la muestra.



Poza N.º 1 La poza de los niños T°: 35 °C / PH: 7



Poza N.º 2 La Cueva Tº: 35 / Ph: 7



Poza N.º 3 La Cuadrada Tº : 30 / Ph: 8

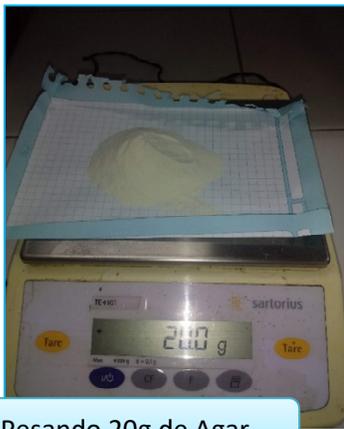


Poza N.º 4 - Poza Multifamiliar Tº 35 / Ph : 7



ANEXO N° 6. Preparación de materiales y medio de cultivo (ANN)

Las 24 muestras de agua
termal



Pesando 20g de Agar



Medio de cultivo preparado



Suspensión de E. coli



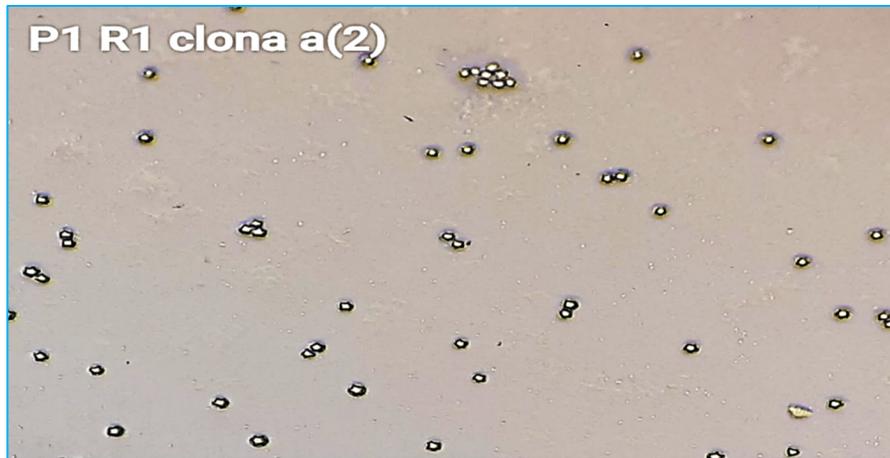
Sembrado de la Mx



Clonación de amebas



Placas clonadas



ANEXO N°7. Amebas de vida libre vistas a través del microscopio.

Figura N.º 1 Quiste de *Acanthamoeba* spp. Poza N° 1 clonación
2. Vista a 40x.

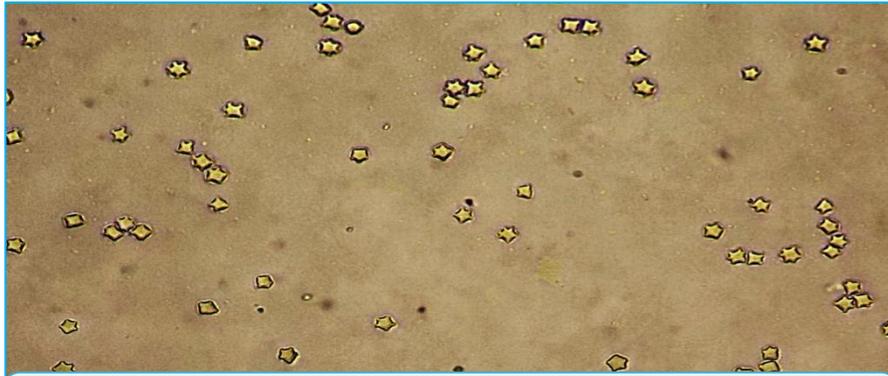


Figura N.º 2 Quiste de *Acanthamoeba* spp. Poza N.º 1 clonación 2. Vista a 40x. (foto de cámara digital)

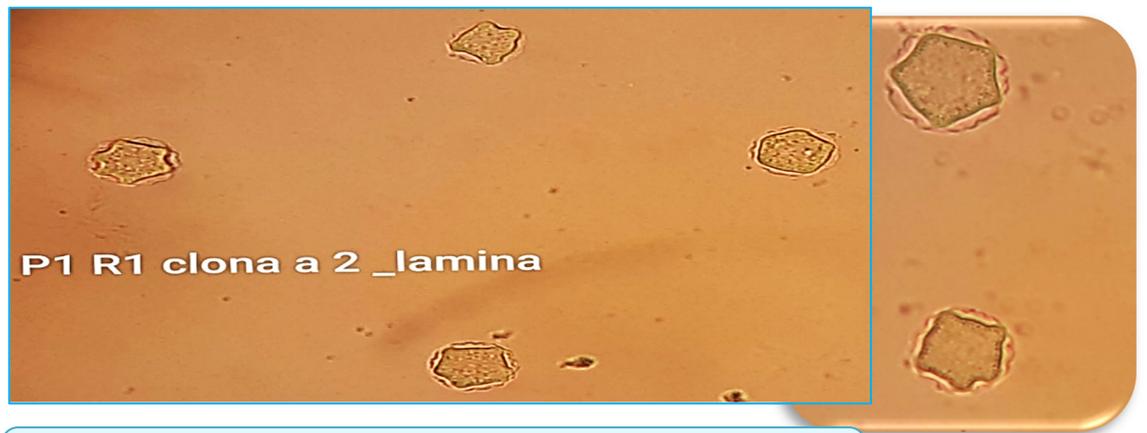


Figura N.º 3 Quiste de *Acanthamoeba* spp. Poza N.º 1 clonación 2. Vista a 100x.



Figura N.º 4 Ameba desconocida [*Insertae Sedis*]. Poza N.º 2. clonación 4. vista a 40x

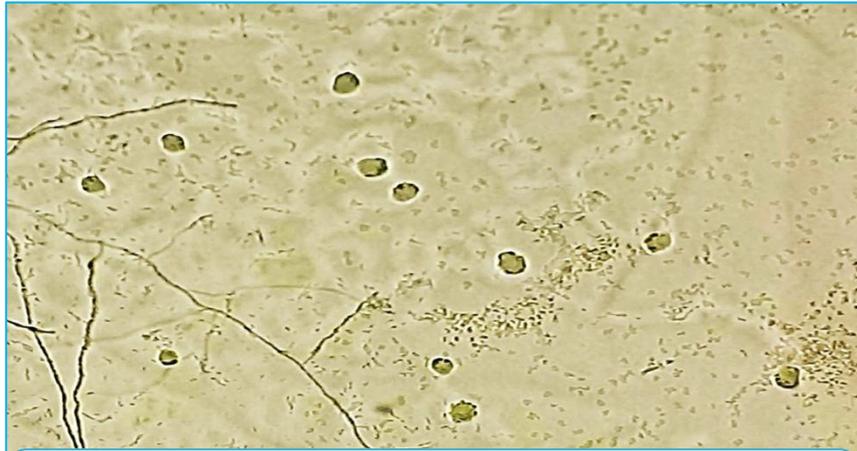


Figura Nº 5 Ameba desconocida [*Insertae Sedis*]. Poza Nº2. clonación 3. vista a 40x

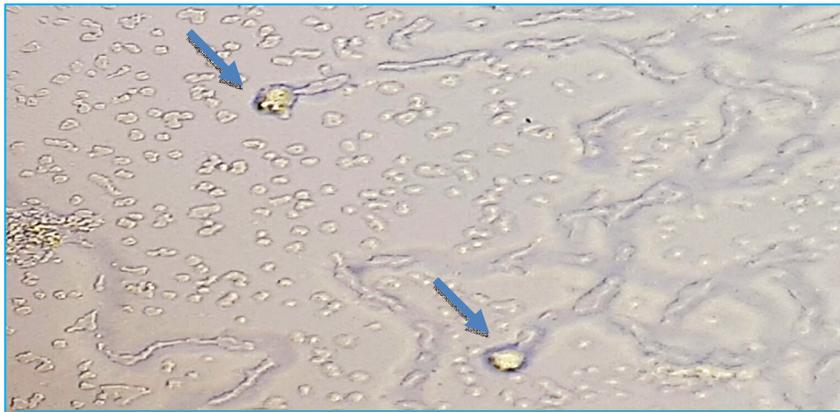


Figura Nº 6 Ameba desconocida [*Insertae Sedis*]. Poza Nº2. clonación 4. vista a 40x

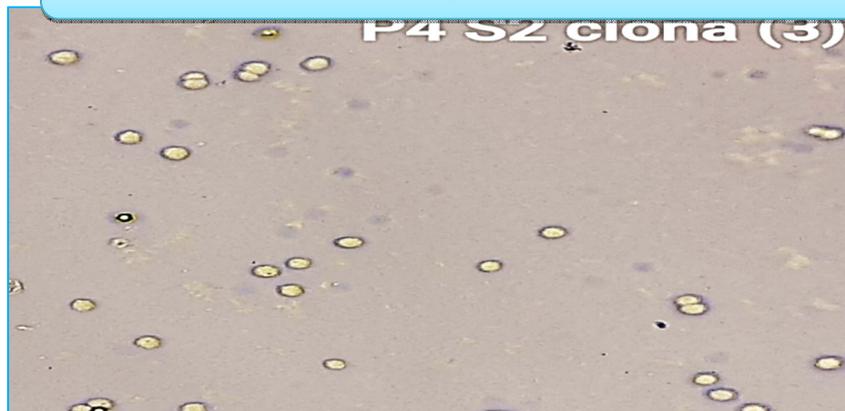


Figura Nº 7 Ameba desconocida [*Insertae Sedis*]. Poza Nº2. clonación 4. vista a 40x

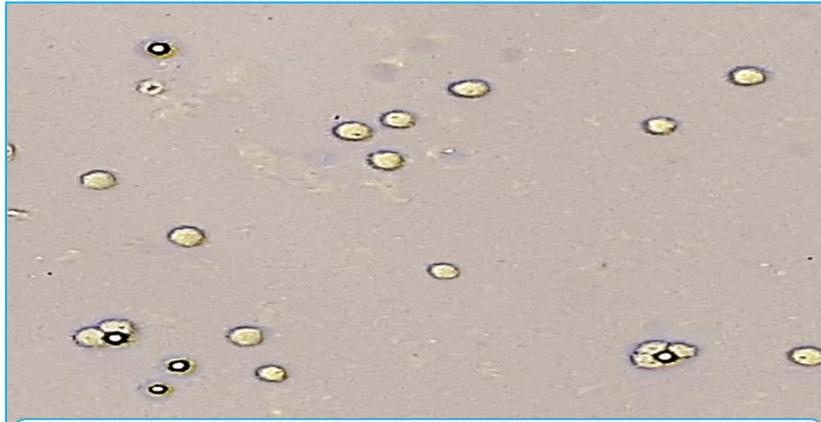


Figura N° 8 Quiste de Acanthamoeba spp. Poza N°4 clonación 2, visto a 40x

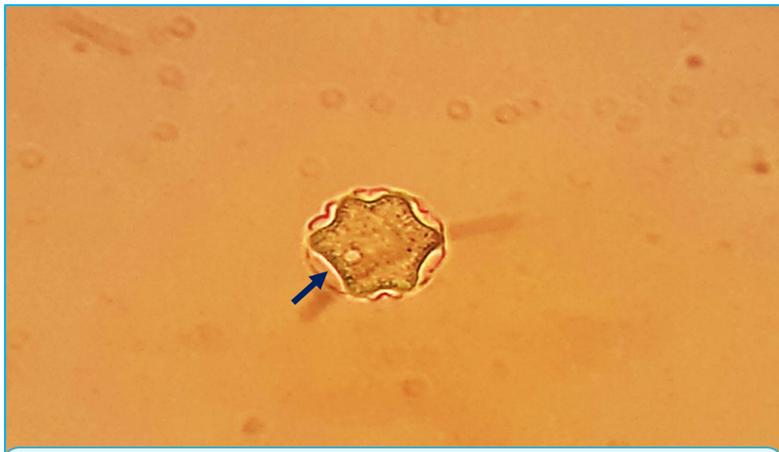


Figura N° 9 Quiste de Acanthamoeba spp. Poza N°4 clonación 2, visto a 100x