



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA**



Caracterización morfológica y molecular de amebas de vida libre
potencialmente patógenas aisladas de aguas termales en Cusco, Perú

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA –
MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA**

AUTOR

Br. Delgado Tenorio Christian Diego

ASESORA

Mblga. María Teresa Silva García

Lambayeque – Perú

2022

Caracterización morfológica y molecular de amebas de vida libre
potencialmente patógenas aisladas de aguas termales en Cusco, Perú

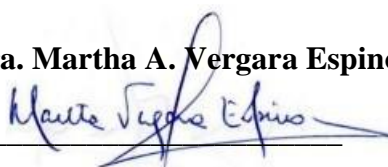
TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA -
MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA

APROBADA POR:

PRESIDENTE

Dra. Martha A. Vergara Espinoza




SECRETARIO

Dr. César Alberto Guzmán Vigo



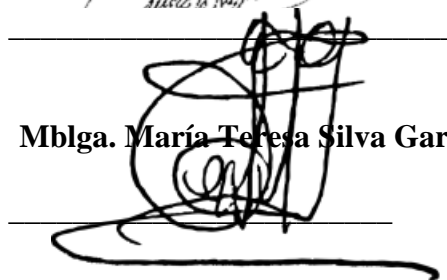
VOCAL

Lic. Julio César Silva Estela



ASESOR

Mblga. María Teresa Silva García



Lambayeque – Perú

2022

EPÍGRAFE

“La Suerte solo favorece a las mentes preparadas”

Louis Pasteur

DEDICATORIA

A Dios el alfa y la Omega el principio y el fin.

A mi mamá que el mejor regalo que me ha podido dar ha sido la educación

A mi querida familia, en especial a mi abuela que en vida me ha visto crecer y para ella esto sería un logro más como crecimiento personal y profesionalmente.

AGRADECIMIENTOS

A Dios el alfa y la Omega el principio y el fin.

A mi patrocinadora, Mblga. María Teresa Silva García, por su asesoramiento, por guiarme y encaminarme en la ejecución del presente trabajo.

A Concytec - Banco Mundial “Mejoramiento y Ampliación de los Servicios del Sistema Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica” 8682-PE, a través de su unidad ejecutora ProCIENCIA [contrato número 190-2018] por el financiamiento de este proyecto.

Al distinguido jurado:

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza

Dr. César Alberto Guzmán Vigo

Lic. Julio César Silva Estela

Que con sus observaciones y sugerencias me ayudaron a mejorar y culminar el presente trabajo.

INDICE

ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
RESUMEN.....	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	11
DISEÑO TEÓRICO	14
2.1. Antecedentes de la investigación	14
2.2. Base teórica	17
2.2.1. Taxonomía	17
2.2.2. Caracterización Morfológica	18
2.2.3. Caracterización Molecular	24
MATERIALES Y METODOS	25
3.1. Área de estudio y características físico químicas termales	25
3.2. Población	26
3.3. Muestra.....	26
3.4. Aislamiento.....	26
3.5. Cultivo de Muestras.....	27
3.6. Caracterización Morfológica	28
3.7. Caracterización molecular	28
3.7.1 Extracción de ADN	28
3.7.2 Protocolo de extracción de ADN (Cabello-Vílchez et al., 2014)	29
3.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
3.7.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	31
RESULTADOS	32
4.1. Resultados	32
4.2 Caracterización morfológica	33
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES.....	40
RECOMENDACIONES.....	41
REFERENCIAS	42
ANEXOS	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de supergrupos del dominio eucariota de acuerdo a Adl et al. (2005, 2012).....	17
Tabla 2. Clasificación taxonómica de los géneros <i>Naegleria</i> , <i>Acanthamoeba</i> y <i>Balamuthia</i> , de acuerdo a Adl et al. (2012) y Cavalier-Smith et al. (2016).....	18
Tabla 3. Genotipos, especies, enfermedad y grupos de <i>Acanthamoeba</i> spp. Pussard y Pons empleando 18S ADNr.....	21
Tabla 4. Distribución de muestras de agua termales de la Región de Cusco, Perú. .	25
Tabla 5. Características físico químicas y de uso de las aguas termales de “La Raya”, “Cocalmayo”, “Minas moqo” y “Lares” (Huamaní, 2001).	25
Tabla 6. Frecuencia de amebas de vida libre en Lagunas de Aguas termales de Cusco, Perú.	32
Tabla 7. Frecuencia de ambas de vida libre según distrito de procedencia de las aguas termales.....	32
Tabla 8. Distribución de muestras Positivas para amebas de vida libre obtenidas de las aguas termales de Cusco, Perú.....	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Grupos morfológicos de Acantamoeba: Grupo I, II, III.	20
Figura 2. M Micrografías electrónicas de transmisión que ilustran las etapas de trofozoíto ameboide, flagelar y quiste de Naegleria fowleri	24
Figura 3. Muestras de aguas termales procedentes de los distintos puntos de muestreo Cusco, Perú.	29
Figura 4. Imágenes de Quiste y Trofozoítos observados	37
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa para determinar AVL	39
Figura 6. Preparación de placas Petri con medio de cultivo (ANN).....	50
Figura 7 Frascos con medio líquido Lares – Jiménez.....	50
Figura 8. Visualización del Crecimiento de amebas en Placas de ANN, mediante microscopia óptica.....	51
Figura 9. Flujograma de Caracterización morfológica y molecular de AVL.	

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue caracterizar morfológica y molecularmente amebas de vida libre, potencialmente patógenas, aisladas de aguas termales en Cusco, Perú. Para ello se analizaron 57 muestras de agua de 16 lagunas de aguas termales de los distritos de San Pedro, Calca y Lares de la provincia de Cusco. Las muestras fueron sembradas en Agar No Nutritivo (conteniendo una suspensión de *Escherichia coli*), el Medio Lares-Jiménez y el Medio PYG, incubadas a 30°C y monitoreadas durante una semana, para determinar la presencia de amebas y posteriormente obtener el ADN para la identificación del género, mediante PCR. Como resultado se obtuvo que, de las 57 muestras revisadas, 7 (12,28%), presentaron quistes y trofozoítos morfológicamente compatibles con la clase Heterolobosea y familia *Vahlkampfiidae*. No se determinó amebas potencialmente patógenas mediante PCR. Se concluye que estas fuentes termales presentan amebas de la clase Heterolobosea y la familia *Vahlkampfiidae*.

Palabras clave: Clase Heterolobosea, Familia *Vahlkampfiidae*, amebas, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris*.

ABSTRACT

The objective of this research was to morphologically and molecularly characterize potentially pathogenic free-living amoebae isolated from hot springs in Cusco, Peru. For this, 57 water samples from 16 thermal water lagoons in the districts of San Pedro, Calca and Lares in the province of Cusco were analyzed. The samples were seeded in Non-Nutritive Agar (containing a suspension of *Escherichia coli*), Lares-Jiménez Medium and PYG Medium, incubated at 30°C and monitored for one week to determine the presence of amoebae and subsequently obtain DNA. for gender identification, by PCR. As a result, it was obtained that, of the 57 samples reviewed, 7 (12.28%) presented cysts and trophozoites morphologically compatible with the Heterolobosea class and Vahlkampfiidae family. Potentially pathogenic amoebas were not determined by PCR. It is concluded that these hot springs present amoebas of the Heterolobosea class and the Vahlkampfiidae family

Keywords: Clase Heterolobosea, Familia Vahlkampfiidae, amebas, *Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia mandrillaris*.

INTRODUCCIÓN

En la historia evolutiva de los protistas, la separación de estos respecto a los principales conjuntos eucariontes fue, probablemente, hace mil millones de años (Sogin, 1991). Su comprensión taxonómica dada por Ernst Haeckel en 1866 era confusa, denominándolos como organismos unicelulares eucariotas dentro del reino Protista en definición como “eucariota que no es ni planta, animal u hongo”(Florin-Christensen & Schnittger, 2018). En las últimas décadas, y con base a estudios filogenéticos moleculares (ARNr, ADNr) y filogenómica, se ha podido comprender la relación de este grupo con los demás organismos unicelulares o pluricelulares (Cavalier-Smith et al., 2016). Las clasificaciones de los eucariotas realizada con estos nuevos enfoques moleculares permitieron delimitar cinco reinos filogenéticos protistas denominados SAR (Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria), Archaeplastida, Excavata, Amoebozoa y Opisthokonta (Adl et al., 2012; Klinger et al., 2016).

Es en este grupo de microorganismos encontramos amebas de vida libre, las que presentan adaptaciones evolutivas que las hacen complejas de controlar cuando invaden un organismo (Schnittger & Florin-Christensen, 2018).

Las Amebas de Vida Libre (AVL) son microorganismos cosmopolitas, su distribución abarca todos los ambientes posibles, encontrándose desde fuentes de agua dulce o salada con preferencia en agua estancada con material orgánico favorable para su desarrollo, hasta rejillas de aire acondicionado de un hospital. (Mergeryan, 1991; Rivera et al., 1987; Shoff et al., 2008; Szénási et al., 1998). Entre las amebas de vida libre se han determinado a 6 géneros que tienen asociación con enfermedad humana: *Naegleria fowleri*, *Balamuthia mandrillaris*, *Vermamoeba vermiformis*, *Sappinia pedata* (diploidea), *Paravahlkamfia francinae* y *Acanthamoeba spp*); Sin embargo (Değerli et al., 2020) describieron a *Acanthamoeba*, *Naegleria*, y *Balamuthia* como las Amebas de Vida Libre que tienen importancia clínica.

Según Carlesso et al., 2007, Concluyeron el potencial patógeno de *Acanthamoeba* spp. y *Naegleria fowleri* con meningoencefalitis, infecciones corneales. Además, Greub y Raoult (2004) describieron que una característica muy importante de *Acanthamoeba* spp. es que es portador de microorganismos patógenos, como bacterias, hongos, virus y otros protozoos, dando lugar a una asociación denominada endosimbiosis.

Las Amebas del Género *Acanthamoeba*, pertenecientes a la Familia Acanthamoebidae (Cavalier-Smith et al., 2016), son ubicuas y se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, se han aislado de enfriadores de agua, filtros de acondicionadores de aire, agua de mar, agua de charcos, aguas residuales, lagunas, ríos, polvo, incluso de la boca y de la nariz de individuos sanos (Cabello-Vílchez et al., 2014; Hooshyar et al., 2015; Jeong et al., 2007). Asimismo, *Naegleria fowleri* fue clasificada dentro la familia *Vahlkampfiidae* como un protozoo ubicuo y presente en todo el mundo (Cavalier-Smith et al., 2016). Ha sido encontrado, bajo condiciones normales y temperatura ambiente, en el suelo, polvo del aire ambiental, agua dulce de piscinas y lagos, reservorios de agua doméstica, sistemas de humidificación, aguas residuales y en la nariz de individuos sanos (Jahangeer et al., 2020)

Por otro lado, *Balamuthia mandrillaris* está clasificada dentro de la familia Balamuthiidae (Cavalier-Smith et al., 2016), y hasta antes del 2004 no había sido aislada del medio ambiente, sin embargo, sí se había recuperado de muestras de autopsia de humanos y animales infectados (Mungroo et al., 2020).

En Perú existen más de 500 fuentes termales de las cuales, 242 tienen capacidad para ser aprovechadas turísticamente, es así que Cusco posee 26 fuentes de aguas termales, un 11% de las aguas termales presentes en el Perú (MINCETUR), pero a su vez representan una fuente de infección de microorganismos como las amebas de vida libre, que pueden tener un comportamiento anfitriónico.

Por lo tanto, considerando el limitado conocimiento de la presencia y distribución de estos microorganismos en diversos ambientes, el objetivo de la presente investigación ha sido la caracterización morfológica y molecular de amebas de vida libre potencialmente patógenas aisladas de aguas termales de diversas localidades en Cusco, Perú.

DISEÑO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

En África, Guinea –Bissau , Baquero et al., (2014) lograron aislar amebas de vida libre, a partir de un total de 22 muestras de agua de pozo, resultando el 68.20% (15) positivas para amebas de vida libre potencialmente patógenas *Acanthamoeba sp.* Genotipo T3 y T4; *Naegleria fowleri* y *Balamuthia mandrillaris*.

En Italia, Berrilli et al., (2021) identificaron a partir de 36 muestras de aguas termales un 91,6% (33) de muestras positivas para amebas de vida libre potencialmente patógenas pertenecientes a los géneros; *Acanthamoeba sp.* Genotipo T4, T15, especies de *Naegleria australiensis*, *italica* y *lovaniensis* respectivamente, como también a géneros de amebas *Vahlkampfia*, *Fumarolamoeba*, *Stenamoeba*, y *Echinaamoeba*.

En Korea, Kang et al., (2020) realizaron la identificación molecular de amebas de vida libre potencialmente patógenas aisladas a partir de 120 muestras de agua del Sur del Río Han (Namhangang), las cuales demostraron similitudes en las secuencias de ADNr 18S, en comparación con varias amebas de referencia en GenBank, mostraron una homología del 86~99 % con especies de *Naegleria gruberi*, *N. philippinensis*, *N. clarki*, *Acanthamoeba polyphaga*, *A. castellanii* y *Hartmannella (Vermamoeba) vermiformis*.

Üstüntürk-Onan, (2020) en Turquía, realizó el aislamiento e identificación a partir de 10 muestras, de las cuales 8 (80%) fueron positivas para amebas de vida libre del género *Acanthamoeba spp.* Genotipo T3 y T4 y especies de *Vermamoeba vermiformis*.

Lares-Jiménez et al., (2018), en México, obtuvieron a partir de muestras de aguas de un manantial termal, mediante caracterización molecular 34 muestras positivas para especies de amebas de vida libre potencialmente patógenas (23) *Naegleria lovaniensis*, (8) *Acanthamoeba*

jacobsi, (1) para *Vermamoeba vermiformis* e identificación de 2 cepas del género *Stenamoeba spp.*

Ramirez et al., (2009) determinaron en muestras de aguas subterráneas procedentes de Zacatepec, México, 22 especies de amebas pertenecientes a 16 géneros, siendo el género más frecuente *Hartmannella* (38%). En Colombia de un total de 54 muestras de fuentes de agua natural, dio como resultado positividad del 55,5 % para amebas de vida libre, con mayor frecuencia de *Naegleria sp.* con un 44,4 %, y *Acanthamoeba sp.* en un 7,4% (Carbal Reyes et al., 2016). Asimismo, en Brasil, Fabres et al., (2016) analizaron 72 muestras de agua procedentes de piscinas termales y spas, evidenciando amebas del género *Acanthamoeba* en 8 muestras, con la distribución de los siguientes genotipos T3 (12,5%), T5 (12,5%), T4 (25%) y T15 (50%).

De igual manera en Argentina, Rojas et al., (2017) determinaron en 65 muestras de agua destinada al consumo ganadero, 13 (24%) muestras positivas para el género *Acanthamoeba*, y se determinó mediante técnicas moleculares la presencia de genotipos T4, T5 y T15. Fuera de américa, en Europa Oriental, Değerli et al., (2020) realizaron un estudio en aguas termales en Turquía, de un total de 434 muestras recolectadas, 148 (34%) fueron positivas, de los cuales 102 se determinaron molecularmente la presencia de *Acanthamoeba* (6%) predominando el genotipo T4A, y especies del género *Naegleria* (0,7%) *N. fowleri*, *N. lovaniensis* y *N. australiensis*.

En el Perú, Beltrán de Estrada & Uyema T, (1997) determinaron a partir de 68 muestras de agua procedentes de 34 piscinas en la ciudad Metropolitana de Lima, obtuvieron un total de 18 (40%) muestras positivas para los géneros: *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, predominando la familia Acanthamebidae. Asimismo, Uscamayta (1999) en el distrito de Layo en Cusco, analizó 30 muestras de agua servidas (16,7%) y reportó que correspondían a *Acanthamoeba spp.*, así como en 14 muestras de agua de uso recreacional el 50% resultaron

positivas a *Acanthamoeba* spp. Un estudio en fuentes de agua del departamento de Lima determinó la presencia de amebas de vida libre en 83 muestras de las que aisló 7 géneros (*Hartmanella*, *Acanthamoeba*, *Mayorella*, *Naegleria*, *Valhkampfia*, *Vanella* y *Saccamoeba*), complementado de estudios de patogenicidad en pacientes inmunosuprimidos, existiendo un riesgo de infección amebiana asociada con estas fuentes de agua (Garaycochea et al., 2008). En el departamento de Ica, Suárez et al., (2002) determinaron la presencia de amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* en diversas fuentes de agua, con 31 muestras de las cuales 11 muestras fueron positivas para este género, comprobando la patogenicidad de dichos aislamientos mediante inoculación en ratones de laboratorio. Martínez et al., (2010) sostuvieron que muy pocos, no más de 10 casos de infección por *Acanthamoeba* spp. han sido reportados en Perú, y a la fecha solo un caso por una especie de *Naegleria* sp., sin embargo, Cabello-Vílchez et al., (2014) reportaron que oficialmente en el Perú se han reportado 55 casos desde 1975 y continúan aumentando los casos reportados sobre todo en varones principalmente en los departamentos de Piura, Trujillo, Lima e Ica.

Minetto & Lima, (2016) determinaron presencia de AVL potencialmente patógenas aisladas a partir de muestras de aguas termales procedentes de Churin (Lima). De un total de 60 muestras recolectas, el (23%) fueron positivas para AVL del Género *Naegleria* spp.

Dávila (2017) determinó a partir de muestras procedentes de la Laguna Chinchaycocha (Junín) a partir de 11 muestras de agua y suelo, el 36% fue positivas para amebas del Género *Acanthamoeba* y *Leptomyxa* spp. respectivamente.

Peláez (2019), obtuvo como resultados a partir de muestras ambientales de piletas de agua como muestras de suelo (Lima), como resultados 4 muestras positivas, (70%) para el Género *Acanthamoeba* spp. y (30%) para el Género *Vanella*.

2.2. Base teórica

2.2.1. Taxonomía

Los recientes ordenamientos taxonómicos de las eucariotas con énfasis en protistas Adl et al., (2012), y su actualización completa de sus rangos más altos, agrupa en el dominio Eucariota a dos supergrupos denominados Amorphea y Diaphoretickes. Dentro del filum Opisthokonta (Adl et al., 2012). El segundo Clado Diaphoretickes es el más inclusivo, y refiere a la diversidad de forma y características celulares, aquí se agrupan filum Excavata, SAR (Stramenopiles, Alveolata y Rhizaria) y Archaeplastida (Adl et al., 2012). Es en el filum Amoebozoa y Excavata donde encontramos parásitos protistas ameboides con grandes adaptaciones y estrategias de supervivencia que hacen de ellos organismos de extrema rareza (Klinger et al., 2016).

Tabla 1.

Clasificación de supergrupos del dominio eucariota de acuerdo a (Adl et al., 2005, 2012).

Eucariota	Amorphea	Amoebozoa
		Opisthokonta
	Diaphoretickes	Excavata
		SAR
		Archaeplastida

Tanto Amoebozoa como Excavata presentan organismos de vida libre parasitarios (Schnittger & Florin-Christensen, 2018; Walochnik, 2018). El filum Amoebozoa es monofilético y se divide en dos clados o subfilum, Lobosa y Conosa, el primero con tres clases (Cutosa, Tubulinea y Discosea) 11 órdenes y 44 familias, dentro de las cuales, la clase Discosea alberga las familias Acanthamoebidae y Balamuthiidae (Cavalier-Smith et al., 2016). Por otro lado, el filum Excavata es el más diverso con 17

subfilum, de las cuales dos son los principales, Metamonada y Discoba (Adl et al., 2012). Es en el subfilum Discoba donde encontramos la familia Vahlkampfiidae (Adl et al., 2012; Walochnik, 2018) (Tabla 2).

Tabla 2.

Clasificación taxonómica de los géneros Naegleria, Acanthamoeba y Balamuthia, de acuerdo (Cavalier-Smith et al., 2016).

Phylum	Subphylum	Clase	Orden	Familia	Género/especie
Amoebozoa	Lobosa	Discosea Cavalier-Smith	Centramoebida Rogerson & Patterson	Acanthamoeb idae Sawyer & Griffin	<i>Acanthamoeba castellani</i>
				Balamuthiida e Cavalier- Smith	<i>Balamuthia mandrillaris</i>
Excavata	Discoba	Heterolobosea Page & Blanton	Tetramitia Cavalier-Smith	Vahlkampfiid ae Jollos	<i>Naegleria fowleri</i>

2.2.2. Caracterización Morfológica

Los protistas son un grupo de organismos parafiléticos con una diversidad morfológica que los hace capaces de adaptarse a nichos ecológicos extremos, y con acelerada capacidad evolutiva (Florin-Christensen & Schnittger, 2018). Por su diminuto tamaño, su morfología debe ser estudiada con microscopio óptico o electrónico, lo que representa un obstáculo para poder ser clasificados o determinados con facilidad en comparación con otros organismos animales o vegetales (Carter, 1970; Florin Christensen & Schnittger, 2018; Walochnik, 2018)

Amoebozoa

Según Adl et al., (2012), el filum Amoebozoa son células desnudas o testadas, con crestas mitocondriales tubulares o ramificadas, uninucleado, binucleado o multinucleado, con quistes comunes morfológicamente variables. Pese a estar presente en la mayoría de los subconjuntos de las eucariotas, el ciclo de vida de los Amoebozoa incluye la capacidad de formar esporocarpo, estructura única que los hace útiles para probar hipótesis evolutivas de esta estructura singular (Tice et al., 2016).

Presenta una clase Discosea con organismos desnudos aplanados que nunca producenseudópodos tubulares subcilíndricos, y que nunca alteran la locomoción (Adl et al., 2012).

En el orden Centramoebida se agrupan organismos aplanados con subpseudópodos prominentes, flexibles y ahusados hasta una punta o furcados cerca de su base (Adl et al., 2012).

Acanthamoeba

Son organismos que presentan finos pseudópodos en forma de dedos denominados acantopodios, estos se proyectan hacia afuera de la superficie de la célula (Schuster & Visvesvara, 2004). Presenta un nucléolo de gran tamaño en el núcleo, y cuando la ameba se enquistar tiene protección contra desecación, inanición y diversos agentes químicos y físicos debido a su estructura de doble pared (Aksozek et al., 2002; Schuster, 2002).

Acanthamoeba tiene dos etapas durante su ciclo de vida: una vegetativa, caracterizado por la forma de trofozoítos (8 - 40 μm) y un estadio latente, cuya forma evolutiva comprende el quiste (8 - 29 μm) (Iglesias-Osores et al., 2018). El trofozoíto tiene un solo núcleo y proyecciones en su cuerpo que se denominan acantópodos, que

facilitan la adhesión a las superficies además de su movimiento.

Se alimentan de bacterias, algas, hongos y pequeñas partículas orgánicas, mientras que su replicación ocurre por fisión binaria (Khan, 2006).

En 1977, Pussard y Pons separaron el género *Acanthamoeba* en tres grupos morfológicos según el tamaño y la forma de los quistes, Aksozek et al., (2002); Schuster, (2002)

Figura 1.

Grupos morfológicos de Acanthamoeba: Grupo I, II, III.



Grupo I: Especies *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. stevensoni* y *A. triangularis* (Walochnik, 2018)(Walochnik, 2000; (Marciano-Cabral & Cabral, 2003). Consiste en especies que se caracterizan por grandes amebas con quistes que varían en tamaño de 16 a 30 μm (Visvesvara et al., 2007).

Grupo II: Especies *A. castellanii*, *A. divionensis*, *A. griffini*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. mauritaniensis*, *A. polyphaga*, *A. quina*, *A. rhyodes*, *A. stevensoni* y *A. triangularis* (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Walochnik, 2018). El grupo comprende el mayor número de especies, que consisten en amebas con quistes que miden alrededor de 18

µm (Schuster & Visvesvara, 2004).

Grupo III: Especies *A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. jacobsi*, *A. lenticulata*, *A. palestinensis*, *A. postulosa* y *A. royreba* (Marciano-Cabral & Cabral, 2003; Walochnik, 2018); También consta de especies con quistes que miden 18 µm o menos, pero con sutiles diferencias en la morfología del quiste. Sin embargo, el agrupamiento de especies basado en la morfología no se considera confiable debido a las variaciones en la morfología del quiste, una característica crítica para la identificación de especies, que puede ser causada por las condiciones del cultivo (Visvesvara et al., 2007).

Con el avance de la tecnología, fue posible desarrollar un sistema más específico para la caracterización y clasificación del género *Acanthamoeba*, como lo describen (Qvarnstrom et al., 2013), Los genotipos se determinaron a partir de la secuencia de ADN ribosómico 18S (T1-T12).

Tabla 3.

Genotipos, especies, enfermedad y grupos de Acanthamoeba spp. Pussard y Pons empleando 18S ADNr.

Genotipo	Infección	Especies / Tipo	Grupo Pussard
T1	Encefalitis	<i>A. castellanii</i>	Grupo III
T2	Queratitis, encefalitis	<i>A. palestinensis</i>	Grupo III
T3	Queratitis	<i>A. griffini</i>	Grupo II
T4	Queratitis, encefalitis	<i>A. castellanii</i>	Grupo II
T5	Queratitis, encefalitis	<i>A. lenticulata</i>	Grupo III
T6	Queratitis	<i>A. palestinensis</i>	Grupo III
T7	Aún no descrita en humanos	<i>A. astronyxis</i>	Grupo I
T8	Aún no descrita en humanos	<i>A. tubiaschi</i>	Grupo I
T9	Aún no descrita en humanos	<i>A. comandoni</i>	Grupo I
T10	Queratitis, encefalitis	<i>A. culbertsoni</i>	Grupo III

T11	Queratitis	<i>A. hatchetti</i>	Grupo II
T12	Encefalitis	<i>A. healyi</i>	Grupo III
T13	Queratitis	<i>Acanthamoeba</i> spp. (Grün A-L <i>et al.</i> , 2014)	Grupo II
T14	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba</i> spp.	No establecido
T15	Encefalitis- queratitis	<i>A. jacobsi</i>	Grupo III
T16	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba</i> spp (Aislada en muestra clínica de perro)	Grupo II
T17	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba</i> spp.	Grupo I
T18	Encefalitis	<i>A. byersi</i>	Grupo I
T19	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba micheli</i> <i>sp. Nov</i>	Grupo II
T20	Aún no descrita en humanos	<i>Acanthamoeba</i> spp.	Grupo III

EXCAVATA

Por lo general son organismos heterótrofos, con preferencias de hábitat carentes de oxígeno, y muy diversos (Klinger et al., 2016; Simpson, 2003). Alguno de ellos presenta un surco longitudinal para filtrar y atrapar alimento suspendido a través de corrientes generadas por golpes de sus flagelos dirigidos posteriormente (Adl et al., 2005; Simpson, 2003). Su filogenia aún no está establecida, pero los últimos estudios soportan su monofilia (Adl et al., 2012).

El citoesqueleto del filum Excavata presenta microtúbulos, fibras no microtubulares y surco de alimentación (Simpson, 2003). La Clase Heterolobosea se caracteriza morfológicamente por presentar fibra I, B y C, y surco de alimentación (Adl et al., 2005; Simpson, 2003). Esta clase, por lo general presentan pseudópodos eruptivos, con fase ciliada alterna, y la fase ciliada o ameboide varía de acuerdo la especie (Adl et al., 2012). Es en la clase Heterolobosea donde encontramos el orden Tetramitida, donde se agrupan organismos ciliados, por lo general de cuatro a dos cilios por kinetid (Adl et al., 2005).

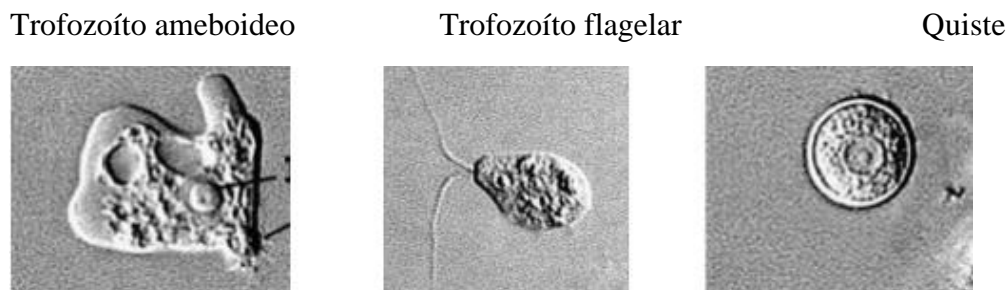
La familia Vahlkampfiidae se caracteriza por tener la capacidad de cambiar su modo de vida, de flagelado a mastigote o viceversa (Hinkle & Sogin, 1993). A menudo predomina un modo de vida, tal es el ejemplo de *Naegleria* que es generalmente ameboide, mientras que *Titanitas* prefiere la flagelar ((Hinkle & Sogin, 1993).

Naegleria

Naegleria fowleri No tiene forma distintiva cuando está suspendida en líquido, con rango de dimensiones promedio de 15 μm a 30 μm de longitud y de ancho de 7 μm , con un rango en este último de 6 μm a 9 μm (Carter, 1970; De Jonckheere, 2014). Puede tener un único núcleo o hasta dos, raramente tres o cuatro núcleos(Carter, 1970). En cuanto al contenido citoplasmático presenta una vacuola contráctil que varían de una a seis, vacuola alimenticia difícil de visualizar, y orgánulos de distintos colores sin distribución de patrones definidos (Carter, 1970). El cambio de la forma de vida ameboide a flagelar se produce a las 20h, y la forma flagelar hasta los 48h en condiciones de temperatura de 21 °C a 37 °C (Carter, 1970). Presenta tres tipos distintos de quistes, el primero de contorno circular de un diámetro de 7 μm a 10 μm , el segundo es el más común es similar al primero, pero es inviable, y su contenido es vacío difícil de diferenciarlos, por último, el tercer tipo de quiste es también inviable, diferenciándose de los anteriores por rectas angulares, triangulares o de cuatro esquinas con el interior vacío (Carter, 1970; De Jonckheere, 2014) (Figura 2).

Figura 2.

Micrografías electrónicas de transmisión que ilustran las etapas de trofozoíto ameboide, flagelar y quiste de Naegleria fowleri.



Nota. Visvevara et al., 2007

2.2.3. Caracterización Molecular

La caracterización molecular en base a la secuencia del gen nuclear 18S rRNA, 16S rARN, ADN_r 5.8S e ITS2 han sido usados para comprender la complejidad y filogenia de las especies de *Acanthamoeba spp*, *Balamuthia mandrillaris* y *Naegleria fowleri* respectivamente (Rivera et al., 1987; Schuster & Visvesvara, 2004).

Estas metodologías aumentan significativamente la sensibilidad del diagnóstico (Lorenzo-Morales et al., 2015). En muestras clínicas se utilizan en muestras de LCR, tejido cerebral, piel, córnea y lágrimas. La técnica más utilizada es el PCR tradicional, basados en la diferencia de las secuencias, hasta hoy, 20 genotipos de *Acanthamoeba* han sido establecidos (Tabla N°3). Al comienzo se propuso que entre dos tipos diferentes de secuencias debería existir una divergencia de pares de bases mayor a 5%, (Trabelsi et al., 2012), actualmente esto está siendo evaluado nuevamente dada la expansión de secuencias disponibles, por lo cual se podría reducir a un 4%. En especies de *Naegleria* son más de 47 especies que se han descrito basados en la amplificación de estos genes (Schuster & Visvesvara, 2004)

MATERIALES Y METODOS

3.1. Área de estudio y características físico químicas termales

Lagunas de aguas termales de los distritos de Lares, Calca y San Pedro del departamento de Cusco (Tabla 4). Las características físico químicas y de uso se tomaron de Huamaní Huaccán, (2001) del Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico – INGEMMET.(Tabla 5)

Tabla 4.

Procedencia de muestras de aguas termales de la Región de Cusco, Perú.

Fuente Termal	Distrito	Zona	Nº de lagunas de aguas termales	Nº de muestras de agua
Laguna Canchis	San Pedro	La Raya	8	26
Lagunas Calca 1	Calca	Cocalmayo	3	16
Lagunas Calca 2	Calca	Minas moqo	2	4
Lagunas Calca 3	Lares	Lares	3	11
		TOTAL	16	57

Tabla 5.

Características físico químicas y de uso de las aguas termales de “La Raya”, “Cocalmayo”, “Minas moqo” y “Lares” (Huamaní, 2001).

Distritos	Fuente termal	Minerales presentes	pH	Grados Celsius (°C)	Uso	Tipo de agua
San Pedro	Aguas calientes La Raya	Sodio, calcio y potasio	6,1	52 - 57	Completo termal turístico (piscinas)	Termonineral
Calca	Aguas Calientes Cocalmayo	Sodio, potasio, calcio y magnesio	5,9 - 6,0	31 - 45	Completo termal turístico (piscinas)	Termonineral
	Aguas calientes Minas moqo	Sodio, potasio, calcio y magnesio	5,9 - 6,1	32 - 45	Completo termal turístico (piscinas)	Termonineral
Lares	Baños termales Lares	Sodio, potasio, calcio y magnesio	5,9 - 6,2	33 - 45	Completo termal turístico (piscinas)	Termonineral

3.2. Población

Amebas de vida libre potencialmente patógenas presentes en aguas termales de Cusco

3.3. Muestra

Amebas de vida libre potencialmente patógenas, aisladas a partir de 57 muestras procedentes de 16 lagunas de aguas termales en el área de estudio.

3.4. Aislamiento

Para el aislamiento de amebas de vida libre potencialmente patógenas, se obtuvieron las muestras de la zona superficial de las lagunas.

Se obtuvieron 57 muestras, las cuales fueron almacenadas en frascos asépticos con tapa y boca ancha de 100ml, para luego ser transportadas en Cooler con paquetes de cadena de frío a una temperatura de 2 – 8°C al Laboratorio de Microbiología perteneciente al

Instituto de Medicina Tropical Alexander Von Humboldt de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, para su posterior procesamiento.

Figura 3.

Muestras de aguas termales procedentes de los distintos puntos de muestreo Cusco, Perú.



3.5. Cultivo de Muestras

Para Cultivar las muestras de agua, se utilizaron los medios de cultivo Agar no nutritivo (ANN) , el Medio Lares-Jiménez y el Medio PYG.

Se utilizó también medio de Agar McConkey para la siembra de *Escherichia coli* ATCC 25922 (Bacteria gram negativa entérica utilizada como fuente de alimento para las amebas).

Previamente a la siembra de las muestras de agua, se realizó un lavado de las placas conteniendo *Escherichia coli* y embebiendo un hisopo se extendió sobre las placas con agar ANN, se dejó secar 5 minutos y se procedió a cultivar las muestras de agua, para lo cual se homogeniza la muestra y se toma con una pipeta pasteur estéril una alícuota de muestra y se colocó en el centro de la placa, se sella la placa con petrofilm y se incuba a

temperatura ambiente. Las placas se monitorearon, interdiario por el periodo de 3 a 4 semanas.

El crecimiento de amebas se evidencia por la presencia del protozoo, colocando la placa invertida al microscopio óptico. Todas las muestras positivas se replicaron mediante corte de agar por sacabocado a nuevas placas con medio ANN recubierto con *E. coli* repicando entre 3 a 6 sucesivamente (técnica descrita por Page).

Las muestras positivas, compatibles con la familia Vahlkampfiidae en búsqueda de la especie (*Naegleria fowleri*) fueron sembradas en medio PYG, incubadas a temperatura de 42°C.

3.6. Caracterización Morfológica

Para la identificación morfológica se realizó el estudio microscópico de amebas, utilizando claves y manuales de identificación. Las principales claves de identificación morfológica fueron Gymnamoebae; Nackte Rhizopoda and Heliozoa (Page, 1988), así como Illustrated Guide to the Protozoa (Lee et al., 2002). Además, Free-Living Freshwater Protozoa: A Color Guide (Patterson & Hedley, 2003). Finalmente, Guide to the methods of study and identification of soil Gymnamoebae (Smirnov, 2003) y Optimizing methods of the recovery of Gymnamoebae (Smirnov, 2003).

Se consideraron los siguientes criterios para Caracterización morfológica:

Tamaño en micrómetros del quiste, Presencia / Ausencia de estadio amebloflagelar, morfología interna e externa del quiste, tipo de movilidad de pseudópodos.

3.7. Caracterización molecular

3.7.1 Extracción de ADN

Utilizando la cabina de seguridad, a las placas positivas a quistes y trofozoítos, se

le agregó solución PAGE de manera que se cubra el agar completamente. Se dejó reposar cada placa durante 30 minutos. Luego se procedió a raspar cada placa con el asa de siembra durante 10 minutos con la finalidad que los quistes y trofozoítos sean removidos del agar. Posteriormente, utilizando una pipeta Pasteur se traspasó la solución PAGE con quistes y trofozoítos a un tubo *Falcon* de 15 ml y centrifugar a 1000 RPM por 10 minutos. Se decantó el sobrenadante y conservó el pellet para la extracción de ADN.

3.7.2 Protocolo de extracción de ADN (Cabello-Vílchez et al., 2014)

- a) Se agregó 20 µl de solución de proteinasa K a 200 uL de la muestra, y llevados a homogenizar en vórtex. Luego se agregaron 400 uL de la solución de lisis y se lleva a homogenizar en vórtex o pipeteo hasta obtener una suspensión uniforme.
- b) Se incubó la muestra a 56°C por 10 minutos.
- c) Luego se agregaron 200 uL de etanol (96 – 100%) y se homogenizaron por pipeteo.
- d) Se transfirió la mezcla preparada a una columna de centrifugación, luego se centrifuga por un minuto a 6000g (Aprox. 8000 rpm). Se desecha el tubo de recolección que contiene la solución precipitada. Se lleva a colocar la columna en un nuevo tubo de recolección de 2ml. (importante no exceder la fuerza centrífuga relativa especificada).
- e) Se agregó 500 uL de buffer de lavado I. Se llevó a centrifugar por un minuto a 8000 g (aprox. 10 000 rpm). Se Descartó el tubo de recolección que contiene la solución precipitada y se vuelve a colocar la columna nuevamente dentro de un nuevo tubo de colección.
- f) Se agregan 500 uL de buffer de lavado II a la columna. Se centrifugó por 3 min. A velocidad máxima ($\geq 20\ 000\ g$ o $\geq 14\ 000\ rpm$).
- g) Se descartó el tubo de colección que contenía la solución precipitada y se transfirió la columna a un tubo estéril de micro centrífuga de 1,5 uL.
- h) Se adicionó 200 uL de buffer de dilución al centro de la columna que contiene la membrana para eluir el DNA genómico. Se llevó a incubar por 2 min a T° ambiente y centrifugó por 1min a 8 000 g (aprox. 10 000 rpm).

- i) Finalmente se descartó la columna de purificación, y se llevó a usar el DNA purificado inmediatamente o en su caso a almacenar a – 20°C para su posterior utilización.

3.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para confirmar que los aislamientos que se evaluaron y caracterizaron morfológicamente, sean individuos de los géneros *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris* y/o *Naegleria fowleri* se realizó la técnica de reacción en cadena a la polimerasa (PCR). La técnica de PCR se realizó en el termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Para un volumen final de reacción de 25 µl se utilizaron 12,5 µl PCR Master Mix 2X, 5 µl de ADN templado que contengan 30-40 ng de ADN, 1,5 µl de cada primer o cebador, 1,25 U Taq polimerasa, 0,3mM dNTPs, 1mM MgCl₂, 10mM buffer. (Gatti et al., 2010; Cabello-Vílchez et al., 2014), con los siguientes cebadores para AVL:

3.7.3.1 Cebadores o primers para *Acanthamoeba* spp.

Para la identificación de *Acanthamoeba* spp., se emplearon un par de cebadores específicos que amplifican el gen nuclear 18S ARN ribosomal del ADN (ADNr 18S) de estas amebas (Cabello-Vílchez et al., 2014):

JDP1 : 5' – GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA – 3'

JDP2 : 3' – TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA – 5'

3.7.3.2 Cebadores o primers para *Balamuthia mandrillaris*

Para la identificación de *Balamuthia mandrillaris*, se emplearon un par de cebadores específicos que amplifican el gen mitocondrial 16S ARN ribosomal (ARNr 16S) de estas amebas:

5' Balspec16S (5'-CGC ATG TAT GAA GAC CA-3')

3' Balspec16S (5'-TTA CCT ATA TAA TTG TCG ATA CCA -
3')

El producto de esta PCR amplifica un fragmento de 1,075pb para
Balamuthia mandrillaris (Dunnebacke et al., 2004).

3.7.3.3 Cebadores o primers para *Naegleria fowleri*

Para la identificación de *Naegleria fowleri*, se emplearon un par de
cebadores específicos que cubren la región del ADN ribosómico
5.8S (ADNr 5.8S) y el espaciador interno transcrito 2 (ITS2) (De
Jonckheere, 2014) con las siguientes secuencias.

NFFW: 5' TGAAAACCTTTTTTCCATTTACA 3'

NFRV: 5' AATAAAAGATTGACCATTGAAA 3'

3.7.4 Electroforesis en gel de agarosa.

Para comparar los fragmentos de ADN amplificados fueron separados por
electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 20 min usando como marcador
lambda de peso de 1 kb (concentración final 0,5 ng / μ L) para llevar a observarse
una banda de 1500 pb aproximadamente; mediante radiación UV en el
transiluminador para captura de imágenes: Chemi-Doc (Biorad) con el software
ImageLab (Cabello-Vílchez et al., 2014)

RESULTADOS

4.1. Resultados

De las cuatro fuentes de aguas termales se tomaron 57 muestras de las cuales se obtuvo siete (12,28%) muestras positivas para amebas de vida libre .

Tabla 6.

Frecuencia de amebas de vida libre en Lagunas de Aguas termales de Cusco, Perú.

	N° de muestras	Porcentajes (%)
POSITIVO	7	12,28
NEGATIVO	50	87,72
TOTAL	57	100

Las muestras que resultaron positivas a amebas de vida libre procedían de las fuentes de aguas termales del distrito de Calca (19%), San Pedro (11,5) y Lares (9%)

Tabla 7.

Frecuencia de amebas de vida libre, según distrito de procedencia de las aguas termales.

Fuente Termal	Distrito	Zona	N° muestras positivas	Porcentaje (%)	N° total de muestras
Laguna Canchis	San Pedro	La Raya	3	11,53	26
Lagunas Calca 1	Calca	Cocalmayo	3	18,75	16
Lagunas Calca 2	Calca	Minas moqo	0	0	4
Lagunas Calca 3	Lares	Lares	1	9	11
		TOTAL	7	12,28	57

4.2 Caracterización morfológica

En las siete muestras positivas de agua procesadas, tras registrar las dimensiones, morfología de las estructuras taxonómicas (quiste y trofozoíto), se determinó la presencia de amebas de vida libre con morfotipos compatibles correspondientes a la Familia Vahlkampfiidae, por presentar un tamaño de quiste y trofozoíto pequeño, movimiento por lobopodios eruptivos, no presentaron fase ameboflagelar, y una muestra sin determinar por el tamaño que presentó. Asimismo, tras la prueba de transformación flagelar no se logró observar que presenten un estado biflagelado. El tamaño aproximado de los trofozoítos de 20- 25 μm , y quistes fue de 15-25 μm respectivamente. . Se observaron también amebas con quistes muy pequeños , compatibles con Clase Heterolobosea.

Figura 4.

Imágenes de Quistes y Trofozoítos observados



Quiste muestra CMY JZ – 2, compatible con Clase Heterolobosea (400X.)



Trofozoítos de la muestra LRP –3E, morfológicamente compatible con Amebas de la Familia Vahlkampfiidae (1000X)

En la Tabla 8, se muestra la procedencia de las muestras positivas, así como la ubicación taxonómica de las amebas de vida libre identificadas por sus características morfológicas.

Tabla 8

Distribución de muestras Positivas para amebas de vida libre obtenidas de las aguas termales de Cusco, Perú.

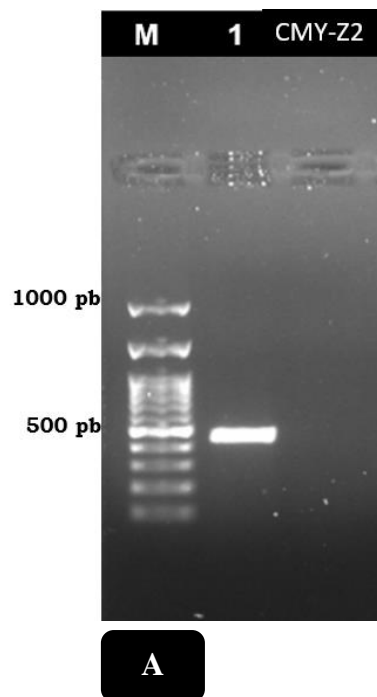
N° de la Muestra	Procedencia de la Muestra	Código de Cultivo	Observaciones
1	La Raya Pequeña	LRP - 1A	Presencia de Trofozoítos <i>Vahlkamphidae</i>)
2	La Raya Pequeña	LRP - 3D	Presencia de Trofozoítos <i>Vahlkamphidae</i>)
3	La Raya Pequeña	LRP - 3E	Presencia de Trofozoítos <i>Vahlkamphidae</i>
4	Cocalmayo	CMY - 1.1	Presencia de Trofozoítos <i>Vahlkamphidae</i>)
5	Cocalmayo	CMY - 2.4	Presencia de Trofozoítos <i>Vahlkamphidae</i>)
6	Lares Piscina	LP - 4.4	Presencia de Trofozoítos <i>Vahlkamphidae</i>
7	Cocalmayo Jacuzzi	CMY JZ - 2	Amebas muy pequeñas (Heterolobosea)

4.3 Caracterización molecular

Por motivos de viabilidad al realizar el mantenimiento de cultivos, solo se realizó la determinación molecular a la cepa “CMY JZ – 2 para determinar la identificación de amebas de vida libre potencialmente patógenas para humanos. Los análisis mediante PCR, no detectaron géneros de *Acanthamoeba*, *Naegleria* o *Balamuthia*; es decir, ninguno de los PCR realizadas amplificó el segmento ADNr 18S, ARNr 16S y ADNr 5.8S/ITS2 de cada género *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Balamuthia*, respectivamente.

Figura 6.

Electroforesis en gel de agarosa para determinar AVL.

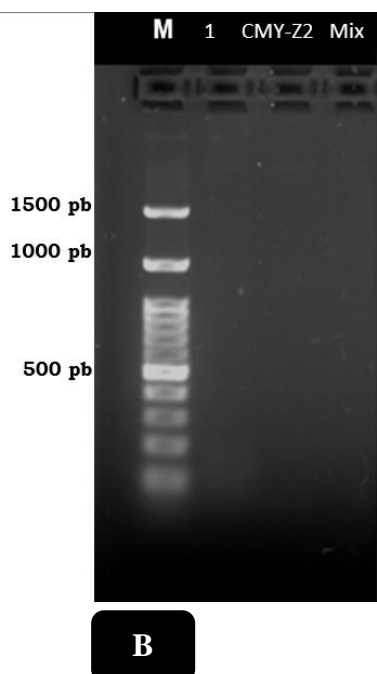


Electroforesis en gel de agarosa PCR de *Acanthamoeba* spp, con primers JDP1 and JDP2 Para *Acanthamoeba* DF3 different fragment 3 una sección corta de casi 500pb del 18S.

M= Marcador molecular.

1= Control positivo de *Acanthamoeba* (Cultivo axénico).

CMY-Z2= AVL potencialmente patógena -No amplificó.



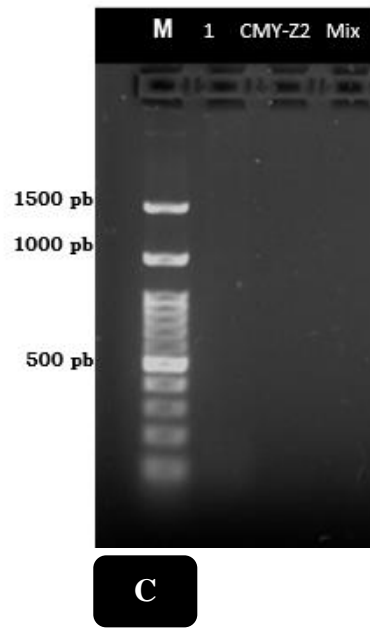
Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de *Naegleria fowleri* con el par primers específicos NFFW and NFRW. *Naegleria fowleri* ITS1, 5.8 , ITS2 ENTRE 350 pb

M= Marcador molecular.

1= Control negativo (Agua).

CMY-Z2= AVL potencialmente patógena, no amplificó.

Mix= Master mix del PCR.



Electroforesis gel de agarosa de la PCR para *Ballamuthia mandrillaris* primers específicos 5'Balspec and 3'Balspec

M= Marcador molecular

1= Control negativo (Agua).

CMY-Z2= AVL potencialmente patógena, no amplificó.

Mix= Master mix del PCR.

DISCUSIÓN

En la presente investigación, de las 57 muestras se obtuvo un 12,28% de muestras positivas para amebas de vida libre, y un 87,72% muestras negativas. Caso contrario fue lo reportado por Beltrán de Estrada & Uyema T, (1997) concluyeron en un estudio de amebas de vida libre en muestras de agua de 34 piscinas del departamento de Lima, en la que 18 (40%) de las muestras resultaron positivas para la presencia de amebas del género: *Naegleria*, *Hartmannella*, *Vahlkampfia*, predominando la familia Acanthamoebidae, difiriendo en sus resultados principalmente por el tipo de fuente de agua.

Todas las cepas fueron capaces de crecer en medio monoxénico a temperatura ambiental, ninguna de las cepas creció en medio axénico PYG y medio Lares-Jiménez (Caseína y suero bovino fetal). De las siete muestras positivas, solo dos, muestra N°03 (LRP – 3E) y N°07 (CMY JZ – 2) se mantuvieron viables, y las otras cinco cepas dejaron de transformarse en trofozoíto. Con base a los datos obtenidos de la caracterización morfológica la cepa codificada CMY JZ – 2 presentaron en su fase trofozoíto por locomoción por monopodio, y su fase quística forma esférica de tamaño 20 – 25 μm , con una pared borde y lisa, no presentaron un estadio ameboflagelar y al ser descritas como amebas con término "Limax" se clasificó en la clase Heterolobosea con la sospecha que pueda ser AVL potencialmente patógena; asimismo, la cepa LRP – 3E se clasificó en el taxón de la Familia Vahlkampfiidae, pero al no observar fases flageladas, se descartó *Naegleria* y los trofozoítos observados eran más bien compatibles con *Vahlkampfia spp.* y al no ser reportadas según la literatura como patógenas para humanos no se le consideró realizar el PCR.

Las especies de amebas de vida libre del género *Naegleria* son termo resistentes a niveles altos de temperatura máxima de 45 °C, pero la especie patógena *N. fowleri* no

ha sido aislada ni determinada a 45 °C o 37 °C en México (Lares-Jiménez & Lares-Villa, 2009). En relación a ello, las muestras en este estudio provienen de aguas de entre 31 °C a 57 °C, y no se ha reportado la implicancia de la mineralización en concordancia con el nivel de pH de los hábitats de estas tres especies patógenas. Asimismo, especies del género *Acanthamoeba* proliferan a temperaturas de 37 °C (Lares-Jiménez & Lares-Villa, 2009), pero nuestros resultados difieren al respecto, sin poder determinar la especie patógena posiblemente atribuido a que los hábitats acuáticos termales no reúnen las condiciones suficientes como los suelos o aguas con materia orgánica donde abundan estas especies incluida *A. castellani* (Cabello-Vílchez *et al.*, 2014). Por otro lado, *Balamuthia* sp. solo ha sido aislada de suelos (Dunnebacke *et al.*, 2004), y hasta su aislamiento del ambiente (Schuster, 2002) se creía que era un parásito obligado (Schuster & Visvesvara, 2004).

Al aplicar la caracterización molecular a la muestra N°07 (CMY JZ – 2), no se determinó que perteneciera a ningún género potencialmente patógeno para seres humanos. Los trabajos realizados por (Lares-Jiménez & Lares-Villa, 2009) reportan *Acanthamoeba* basándose sólo en caracterización morfológica. Garaycochea *et al.*, (2008) así como Garaycochea *et al.*, (2008) han logrado determinar mediante caracterización morfológica la presencia de amebas potencialmente patógenas en muestras procedentes de piscinas en el Perú. .

Değerli *et al.*, (2020) quienes realizaron determinación mediante el uso de PCR, obtuvieron para un total de 434 muestras de aguas termales, el 6.7% positivas para género *Acanthamoeba* genotipo T4, y especies del género *Naegleria*, lo que indicaría a mayor número muestras analizadas aumenta el índice de positividad de muestras mediante PCR, pero hay un porcentaje considerable de muestras que no pueden ser cultivadas en medios convencionales. Nuestros resultados arrojan pistas de los medios

apropiados e inapropiados en la búsqueda de estas especies patógenas, pero sin confirmar su inexistencia en aguas termales por lo que se requiere de constante muestreo en diferentes fechas del año, y aislamiento a distintas temperaturas. (Lares-Jiménez et al., 2018)

CONCLUSIONES

- Se determinó un 12.28% de muestras de aguas termales positivas para Amebas de vida Libre de la Provincia de Cusco, Perú.
- Se ha demostrado mediante la caracterización morfológica la presencia de amebas de vida libre compatibles con la familia Vahlkampfiidae y Clase Heterolobosea en aguas termales en Cusco, Perú.
- No se logró determinar molecularmente la presencia de amebas potencialmente patógenas (*Naegleria fowleri*, *Acanthamoeba castellanii* y *Balamuthia mandrillaris*).

RECOMENDACIONES

- Recomendamos evaluaciones con mayor número de fuentes termales y mayor número de muestras en cada una de ellas, así como la toma de muestra en distintas fechas del año en concordancia con las visitas de mayor número de turistas.
- Para preservar la viabilidad de cultivos para estudios moleculares, se recomienda cultivos por triplicado, y utilización de la criopreservación.
- Difundir el conocimiento respecto a amebas de vida libre ,así como su potencial rol patógeno, tanto para la población como para los órganos gubernamentales a quienes les compete la vigilancia en salud pública.

REFERENCIAS

- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Farmer, M. A., Andersen, R. A., Anderson, O. R., Barta, J. R., Bowser, S. S., Brugerolle, G., Fensome, R. A., Fredericq, S., James, T. Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C. E., Lewis, L. A., Lodge, J., Lynn, D. H., Mann, D. G., ... Taylor, M. F. J. R. (2005). The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 52(5), 399–451. <https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.2005.00053.X>
- Adl, S. M., Simpson, A. G. B., Lane, C. E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S. S., Brown, M. W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., Heiss, A., Hoppenrath, M., Lara, E., Gall, L. Le, Lynn, D. H., McManus, H., Mitchell, E. A. D., Mozley-Stanridge, S. E., Parfrey, L. W., ... Spiegel, F. W. (2012). The revised classification of eukaryotes. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 59(5), 429–514. <https://doi.org/10.1111/J.1550-7408.2012.00644.X>
- Aksozek, A., McClellan, K., Howard, K., Niederkorn, J. Y., & Alizadeh, H. (2002). Resistance of *Acanthamoeba castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *Journal of Parasitology*, 88(3), 621–623. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2002\)088\[0621:roacct\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2002)088[0621:roacct]2.0.co;2)
- Baquero, R. A., Reyes-Batlle, M., Nicola, G. G., Martín-Navarro, C. M., López-Arencibia, A., Guillermo Esteban, J., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2014). Presence of potentially pathogenic free-living amoebae strains from well water samples in Guinea-Bissau. *Pathogens and Global Health*, 108(4), 206. <https://doi.org/10.1179/2047773214Y.0000000143>
- Beltrán de Estrada, M., & Uyema T, N. (1997). Amebas de vida libre en muestras de agua de piscinas del Departamento de Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 14(1), 29–33. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46341997000100007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Berrilli, F., Di Cave, D., Novelletto, A., & Montalbano Di Filippo, M. (2021). PCR-based identification of thermotolerant free-living amoebae in Italian hot springs. *European Journal of Protistology*, 80(1), 125812. <https://doi.org/10.1016/j.ejop.2021.125812>
- Cabello-Vílchez, A. M., Rodríguez-Zaragoza, S., Piñero, J., Valladares, B., & Lorenzo-Morales, J. (2014). *Balamuthia mandrillaris* in South America: An emerging potential hidden pathogen in Perú. *Experimental Parasitology*,

145(S), S10–S19. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2014.05.007>

Carbal Reyes, L., Foen Alarcón, L., Morales-Aleães, M., & Orozco-Ugarriza, M. (2016). Amebas de Vida Libre aisladas en aguas superficiales del municipio de Turbaco, Bolívar-Colombia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 68(1), 1.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602016000100006

Carlesso, A. M., Simonetti, A. B., Artuso, G. L., & Rott, M. B. (2007) Isolamento e identificação de amebas de vida livre potencialmente patogênicas em amostras de ambientes de hospital público da cidade de Porto Alegre, RS. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 3, p. 316–320. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000300013>

Carter, R. F. (1970). Description of a *Naegleria* sp. isolated from two cases of primary amoebic meningo-encephalitis, and of the experimental pathological changes induced by it. *The Journal of pathology*, 100(4), 217–244. <https://doi.org/10.1002/PATH.1711000402>

Cavalier-Smith, T., Chao, E. E., & Lewis, R. (2016). 187-gene phylogeny of protozoan phylum Amoebozoa reveals a new class (Cutosea) of deep-branching, ultrastructurally unique, enveloped marine Lobosa and clarifies amoeba evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 99, 275–296. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2016.03.023>

Corsaro, D., & Venditti, D. (2010). Phylogenetic evidence for a new genotype of *Acanthamoeba* (Amoebozoa, Acanthamoebida). *Parasitology research*, 107(1), 233–238. <https://doi.org/10.1007/S00436-010-1870-6>

Dávila, F. (2017). Bio-diversidad de amebas de vida libre en la laguna de Chinchaycocha en Junín 4140 msnm contaminada por relaves mineros (Universidad Alas Peruanas). Retrieved from https://repositorio.uap.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/20.500.12990/2017/Tesis_Biodiversidad_Laguna.pdf?sequence=1

De Jonckheere, J. F. (2014). What do we know by now about the genus *Naegleria*? *Experimental Parasitology*, 145(S), S2–S9. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2014.07.011>

Değerli, S., Değerli, N., Çamur, D., Doğan, Ö., & İlter, H. (2020). Genotyping by Sequencing of *Acanthamoeba* and *Naegleria* Isolates from the Thermal Pool Distributed Throughout Turkey. *Acta parasitologica*, 65(1), 174–186. <https://doi.org/10.2478/S11686-019-00148-3>

- Dunnebacke, T. H., Schuster, F. L., Yagi, S., & Booton, G. C. (2004). *Balamuthia mandrillaris* from soil samples. *Microbiology*, 150(9), 2837–2842. <https://doi.org/10.1099/MIC.0.27218-0/CITE/REFWORKS>
- Fabres, L. F., Rosa Dos Santos, S. P., Benitez, L. B., & Rott, M. B. (2016). Isolation and identification of *Acanthamoeba* spp. from thermal swimming pools and spas in Southern Brazil. *Acta parasitologica*, 61(2), 221–227. <https://doi.org/10.1515/AP-2016-0031>
- Florin-Christensen, M., & Schnittger, L. (2018). Parasitic protozoa of farm animals and pets. En *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5>
- Garaycochea, M. del C., Beltrán, M., & Morón, C. (2008). Patogenicidad de las amebas de vida libre aisladas de fuentes de agua en Lima. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 25(2), 204–207. http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342008000200009&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Greub, G., & Raoult, D. (2004). Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clinical microbiology reviews*, 17(2), 413–433. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.413-433.2004>
- Hinkle, G., & Sogin, M. L. (1993). The Evolution of the Vahlkampfiidae as Deduced from 16S-like Ribosomal RNA Analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 40(5), 599–603. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1993.tb06114.x>
- Hooshyar, H., Rostamkhani, P., & Rezaeian, M. (2015). An annotated checklist of the human and animal entamoeba (Amoebida: Endamoebidae) species- A review article. *Iranian Journal of Parasitology*, 10(2), 146–156. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26246811/>
- Huamaní Huaccán, A. (2001). Aguas termales y minerales en el suroriente del Perú (Dptos. Apurímac, Cusco, Madre de Dios y Puno) - [Boletín D 24]. En *Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico - INGEMMET* (p. 1). Instituto Geológico, Minero y Metalúrgico - INGEMMET. <https://repositorio.ingemmet.gob.pe/handle/20.500.12544/337>
- Iglesias-Osores, S., Olivos-Caicedo, K., & Failoc-Rojas, V. E. (2018). *Acanthamoeba*: Recordando un protozoo olvidado. *Revista Del Cuerpo Médico Del HNAAA*, 11(2), 126–127. <https://doi.org/10.35434/rcmhnaaa.2018.112.78>
- Jahangeer, M., Mahmood, Z., Munir, N., Waraich, U. e. A., Tahir, I. M., Akram, M., Ali Shah, S. M., Zulfqar, A., & Zainab, R. (2020). Naegleria

- fowleri: Sources of infection, pathophysiology, diagnosis, and management; a review. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 47(2), 199–212. <https://doi.org/10.1111/1440-1681.13192>
- Jeong, H. J., Lee, S. J., Kim, J. H., Xuan, Y. H., Lee, K. H., Park, S. K., Choi, S. H., Chung, D. Il, Kong, H. H., Ock, M. S., & Yu, H. S. (2007). Acanthamoeba: keratopathogenicity of isolates from domestic tap water in Korea. *Experimental parasitology*, 117(4), 357–367. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2007.05.003>
- Kang, H., Sohn, H. J., Seo, G. E., Seong, G. S., Ham, A. J., Park, A. Y., Jung, S. Y., Lee, S. E., Cho, S. H., & Shin, H. J. (2020). Molecular detection of free-living amoebae from Namhangang (southern Han River) in Korea. *Scientific Reports* 2020 10:1, 10(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57347-1>
- Khan, N. A. (2006). Acanthamoeba: biology and increasing importance in human health. *FEMS microbiology reviews*, 30(4), 564–595. <https://doi.org/10.1111/J.1574-6976.2006.00023.X>
- Klinger, C. M., Karnkowska, A., Herman, E. K., Hampl, V., & Dacks, J. B. (2016). Phylogeny and evolution. *Molecular Parasitology: Protozoan Parasites and their Molecules*, 383–408. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1416-2_12/COVER
- Lares-Jiménez, L. F., Borquez-Román, M. A., Lares-García, C., Otero-Ruiz, A., Gonzalez-Galaviz, J. R., Ibarra-Gámez, J. C., & Lares-Villa, F. (2018). Potentially pathogenic genera of free-living amoebae coexisting in a thermal spring. *Experimental parasitology*, 195, 54–58. <https://doi.org/10.1016/J.EXPPARA.2018.10.006>
- Lares-Jiménez, L. F., & Lares-Villa, F. (2009). Aislamiento de amebas de vida libre en aguas superficiales del Valle del Mayo, Sonora. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales*, 5(2), 161–167. <https://revista.itson.edu.mx/index.php/rlrn/article/view/167>
- Lee, J. J., Leedale, G., Bradbury, P., & Press, A. (2002). *Putting Protozoa in Their Place The Illustrated Guide to the Protozoa*.
- Lorenzo-Morales, J., Khan, N. A., & Walochnik, J. (2015). An update on Acanthamoeba keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite*, 22(10). <https://doi.org/10.1051/PARASITE/2015010>
- Magnet, A., Henriques-Gil, N., Galván-Díaz, A. L., Izquiedo, F., Fenoy, S., & Del Aguila, C. (2014). Novel Acanthamoeba 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. *Parasitology research*, 113(8), 2845–2850.

<https://doi.org/10.1007/S00436-014-3945-2>

- Marciano-Cabral, F., & Cabral, G. (2003). Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. *Clinical microbiology reviews*, 16(2), 273–307. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.273-307.2003>
- Martínez, D. Y., Seas, C., Bravo, F., Legua, P., Ramos, C., Cabello, A. M., & Gotuzzo, E. (2010). Successful treatment of Balamuthia mandrillaris amoebic infection with extensive neurological and cutaneous involvement. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51(2). <https://doi.org/10.1086/653609>
- Minetto, M., & Lima, R. (2016). Amebas de vida libre en las pozas de los baños termales de Churín (Universidad Privada Norbert Wiener). Retrieved from http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/343/T061_40846697_T.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Mergeryan, H. (1991). The prevalence of Acanthamoeba in the human environment. *Reviews of infectious diseases*, 13 Suppl 5, S390–S391. https://doi.org/10.1093/CLIND/13.SUPPLEMENT_5.S390
- Mohammad Ridwane Mungroo, Naveed Ahmed Khan & Ruqaiyyah Siddiqui (2020) *Balamuthia mandrillaris*: pathogenesis, diagnosis, and treatment, Expert Opinion on Orphan Drugs, 8:4, 111-119 <https://doi.org/10.1080/21678707.2020.1758061>
- Niyyati, M., Lorenzo-Morales, J., Rezaeian, M., Martin-Navarro, C. M., Haghi, A. M., MacIver, S. K., & Valladares, B. (2009). Isolation of Balamuthia mandrillaris from urban dust, free of known infectious involvement. *Parasitology research*, 106(1), 279–281. <https://doi.org/10.1007/S00436-009-1592-9>
- Nuprasert, W., Putaporntip, C., Pariyakanok, L., & Jongwutiwes, S. (2010). Identification of a novel t17 genotype of acanthamoeba from environmental isolates and t10 genotype causing keratitis in Thailand. *Journal of clinical microbiology*, 48(12), 4636–4640. <https://doi.org/10.1128/JCM.01090-10>
- Page, F. C. (1988). *A new key to freshwater and soil gymnamoebae : with instructions for culture*. 122. https://books.google.com/books/about/A_New_Key_to_Freshwater_and_Soil_Gymnamo.html?id=9DIJAQAAMAAJ
- Peláez, D. (2019). Descripción morfológica de Amebas de Vida Libre en fuentes ambientales en Lima Metropolitana (Universidad Peruana Cayetano Heredia). Retrieved from <https://repositorio.upch.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12866/6569/Descri>

pcion_PelaezLazaro_David.pdf? sequence=1&isAllowed=y

Patterson, D. J., & Hedley, S. (2003). *Free-living freshwater protozoa : a colour guide*. ASM Press.

Qvarnstrom, Y., Nerad, T. A., & Visvesvara, G. S. (2013). Characterization of a New Pathogenic Acanthamoeba Species, *A. byersi* n. sp., Isolated from a Human with Fatal Amoebic Encephalitis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60(6), 626. <https://doi.org/10.1111/JEU.12069>

Ramírez, E., Robles, E., Sainz, M. G., Ayala, R., & Campoy, E. (2009). Calidad microbiológica del acuífero de Zacatepec, Morelos, México. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 25(4), 247–255. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992009000400005&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Retana-Moreira, L., Abrahams-Sandí, E., Cabello-Vílchez, A. M., Reyes-Batlle, M., Valladares, B., Martínez-Carretero, E., Piñero, J. E., & Lorenzo-Morales, J. (2014). Isolation and molecular characterization of Acanthamoeba and Balamuthia mandrillaris from combination shower units in Costa Rica. *Parasitology Research*, 113(11), 4117–4122. <https://doi.org/10.1007/S00436-014-4083-6>

Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, I., Ramirez, E., Bonilla, P., & Lares, F. (1987). Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. *Environmental research*, 42(1), 149–154. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(87\)80016-6](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(87)80016-6)

Rojas, M. del C., Rodríguez Fermepín, M., Gracia Martínez, F., & Costamagna, S. R. (2017). Presencia de Acanthamoeba spp. en agua para consumo ganadero en la provincia de La Pampa, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 49(3), 227–234. <https://doi.org/10.1016/J.RAM.2016.12.003>

Schnittger, L., & Florin-Christensen, M. (2018). Introduction into parasitic protozoa. *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets*, 1–10. https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_1/COVER

Schuster, F. L. (2002). Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clinical microbiology reviews*, 15(3), 342–354. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.3.342-354.2002>

Schuster, F. L., & Visvesvara, G. S. (2004). Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. *International journal for parasitology*, 34(9), 1001–1027. <https://doi.org/10.1016/J.IJPARA.2004.06.004>

- Shariq, A., Afridi, F. I., Farooqi, B. J., Ahmed, S., & Hussain, A. (2014). Fatal primary meningoencephalitis caused by *Naegleria fowleri*. *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*, 24(7), 523–525.
<https://doi.org/07.2014/JCPSP.523525>
- Shoff, M. E., Rogerson, A., Kessler, K., Schatz, S., & Seal, D. V. (2008). Prevalence of *Acanthamoeba* and other naked amoebae in South Florida domestic water. *Journal of water and health*, 6(1), 99–104.
<https://doi.org/10.2166/WH.2007.014>
- Simpson, A. G. B. (2003). Cytoskeletal organization, phylogenetic affinities and systematics in the contentious taxon Excavata (Eukaryota). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(Pt 6), 1759–1777.
<https://doi.org/10.1099/IJS.0.02578-0>
- Smirnov, A. V. (2003). Optimizing methods of the recovery of gymnamoebae from environmental samples: a test of ten popular enrichment media, with some observations on the development of cultures. *Protistology*, 3(1), 47757. <https://cyberleninka.ru/article/n/optimizing-methods-of-the-recovery-of-gymnamoebae-from-environmental-samples-a-test-of-ten-popular-enrichment-media-with-some-observations>
- Sogin, M. L. (1991). Early evolution and the origin of eukaryotes. *Current Opinion in Genetics & Development*, 1(4), 457–463.
[https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(05\)80192-3](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(05)80192-3)
- Suárez, R., Espinoza, Y., Villanueva, C., Ramos, J., Huapaya, P., & Marquina, R. (2002). Aislamiento de amebas de vida libre del género *Acanthamoeba* a partir de fuentes de agua en la ciudad de Ica. *Anales de la Facultad de Medicina*, 63(2), 101–105.
- Szénási, Z., Endo, T., Yagita, K., & Nagy, E. (1998). Isolation, identification and increasing importance of “free-living” amoebae causing human disease. *Journal of medical microbiology*, 47(1), 5–16.
<https://doi.org/10.1099/00222615-47-1-5>
- Tice, A. K., Shadwick, L. L., Fiore-Donno, A. M., Geisen, S., Kang, S., Schuler, G. A., Spiegel, F. W., Wilkinson, K. A., Bonkowski, M., Dumack, K., Lahr, D. J. G., Voelcker, E., Clauß, S., Zhang, J., & Brown, M. W. (2016). Expansion of the molecular and morphological diversity of *Acanthamoebidae* (Centramoebida, Amoebozoa) and identification of a novel life cycle type within the group. *Biology Direct*, 11(1), 1–21.
<https://doi.org/10.1186/S13062-016-0171-0/FIGURES/5>
- Trabelsi, H., Dendana, F., Sellami, A., Sellami, H., Cheikhrouhou, F., Neji, S., Makni, F., & Ayadi, A. (2012). Pathogenic free-living amoebae:

epidemiology and clinical review. *Pathologie-biologie*, 60(6), 399–405.
<https://doi.org/10.1016/J.PATBIO.2012.03.002>

Üstüntürk-Onan, M. (2020). Isolation and identification of free-living amoebae isolated from well water in Istanbul. *Journal of water and health*, 18(6), 1139–1145. <https://doi.org/10.2166/WH.2020.255>

Visvesvara, G. S., Moura, H., & Schuster, F. L. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS immunology and medical microbiology*, 50(1), 1–26. <https://doi.org/10.1111/J.1574-695X.2007.00232.X>

Walochnik, J. (2018). Amoebae. En *Parasitic Protozoa of Farm Animals and Pets* (pp. 389–412). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-70132-5_15/COVER

ANEXOS

Anexo A

Esquema de los medios de cultivo utilizados

AGAR NO NUTRITIVO (ANN)	
Solución Page	1000 mL
NaCl	120mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	4mg
Na ₂ HPO ₄	142mg
CaCl ₂ x 2H ₂ O	4mg
H ₂ O destilada	1000 mL
Agar	20g.

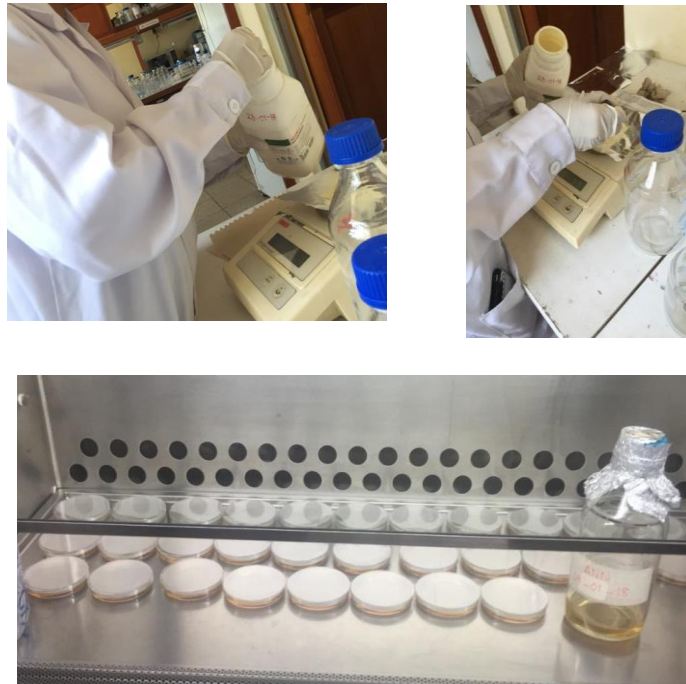
Medio PYG	
Solución Page	1000 mL
Proteasa - Peptona	20g.
Extracto de Levadura	2.0g.
Glucosa	18g.
Antibiótico ATB	Estreptomicina

Medio Lares - Jiménez	
Bactocasitona	10g.
Sal Balanceada de Hanks	34mL.
Agua Destilada	456mL.
Suero Bovina Fetal	10%
Antibiótico ATB	Estreptomicina

Anexo B

Figura 6.

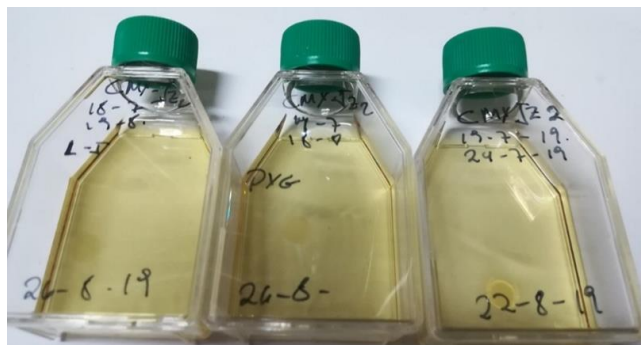
Preparación de placas Petri con medio de cultivo (ANN)



Anexo C

Figura 7.

Frascos con medio líquido Lares – Jiménez.



Anexo D

Figura 8.

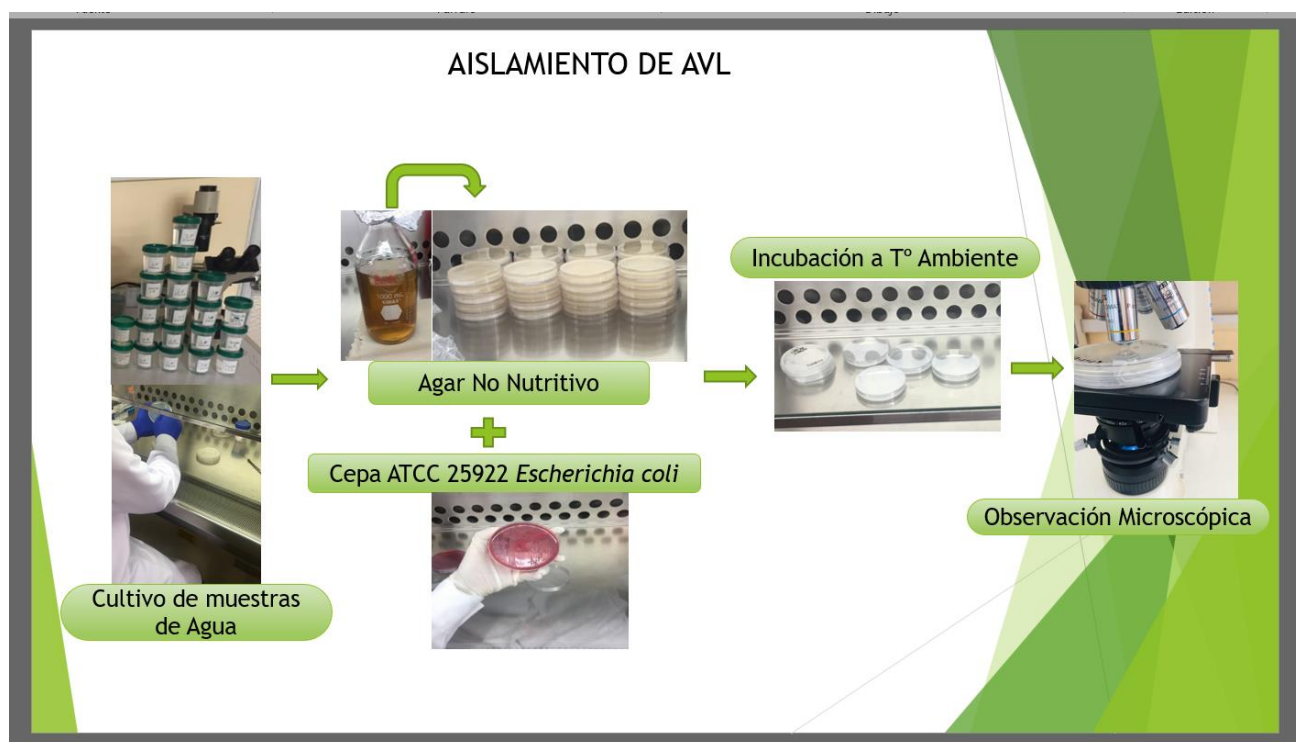
Visualización del Crecimiento de amebas en Placas de ANN, mediante microscopia óptica



Anexo E

Figura 9.

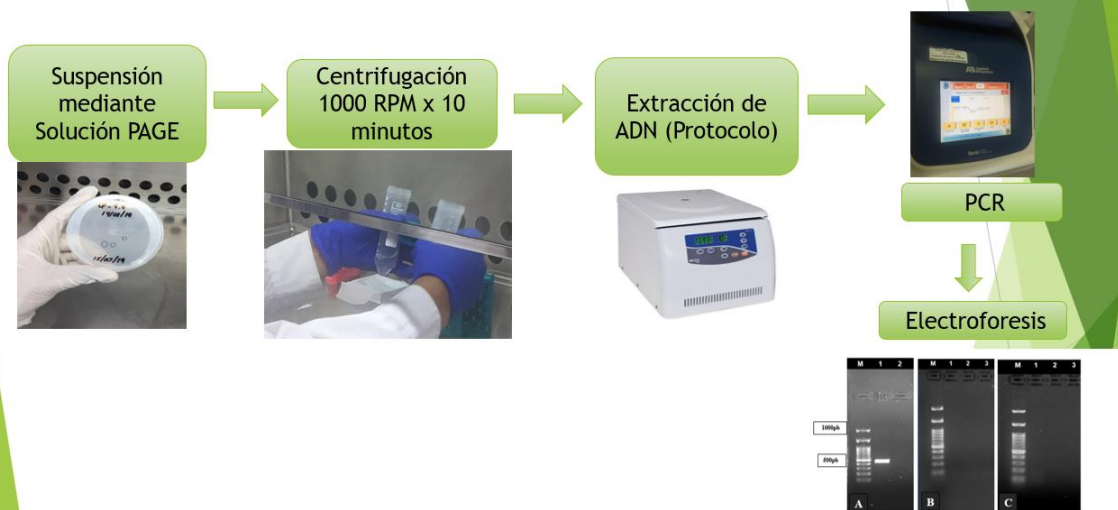
Flujograma de Caracterización morfológica y molecular de AVL



CULTIVO AXÉNICO



Caracterización molecular



Anexo F

Esquema de Cultivo Muestras de aguas termales Cusco, Perú.

N° de Muestra	Lugar de Muestreo	Código de Muestreo	Resultados
01	La Raya Pequeña	LRP – A	NEGATIVO
02	La Raya Pequeña	LRP – B	NEGATIVO
03	La Raya Pequeña	LRP – C	NEGATIVO
04	La Raya Pequeña	LRP – D	NEGATIVO
05	La Raya Pequeña	LRP – 1A	POSITIVO
06	La Raya Pequeña	LRP – 1B	NEGATIVO
07	La Raya Pequeña	LRP – 1C	NEGATIVO
08	La Raya Pequeña	LRP – 2A	NEGATIVO
09	La Raya Pequeña	LRP – 2B	NEGATIVO
10	La Raya Pequeña	LRP – 2C	NEGATIVO
11	La Raya Pequeña	LRP – 3A	NEGATIVO
12	La Raya Pequeña	LRP – 3B	NEGATIVO
13	La Raya Pequeña	LRP – 3C	NEGATIVO
14	La Raya Pequeña	LRP – 3D	POSITIVO
15	La Raya Pequeña	LRP – 3E	POSITIVO
16	La Raya Pequeña	LRP – 4A	NEGATIVO
17	La Raya Pequeña	LRP – 4B	NEGATIVO
18	La Raya Pequeña	LRP – 4C	NEGATIVO
19	La Raya Pequeña	LRP – 4D	NEGATIVO
20	La Raya Pequeña	LRP – 5A	NEGATIVO
21	La Raya Pequeña	LRP – 5B	NEGATIVO
22	La Raya Pequeña	LRP – 5C	NEGATIVO
23	La Raya Pequeña	LRP – 5D	NEGATIVO
24	La Raya Pozo	LRPZ – 1A	NEGATIVO
25	La Raya Pozo	LRPZ – 2B	NEGATIVO
26	La Raya Pozo	LRPZ - 2	NEGATIVO
27	Cocalmayo	CMY – 1.1	POSITIVO

28	Cocalmayo	CMY – 1.2	NEGATIVO
29	Cocalmayo	CMY – 1.3	NEGATIVO
30	Cocalmayo	CMY – 1.4	NEGATIVO
31	Cocalmayo	CMY – 1.5	NEGATIVO
32	Cocalmayo	CMY – 1.6	NEGATIVO
33	Cocalmayo	CMY – 1.7	NEGATIVO
34	Cocalmayo	CMY – 2.1	NEGATIVO
35	Cocalmayo	CMY – 2.2	NEGATIVO
36	Cocalmayo	CMY – 2.3	NEGATIVO
37	Cocalmayo	CMY – 2.4	POSITIVO
38	Cocalmayo	CMY – 2.5	NEGATIVO
39	Cocalmayo Pozo	CMY PZ -1	NEGATIVO
40	Cocalmayo Pozo	CMY PZ -2	NEGATIVO
41	Cocalmayo Jacuzzi	CMY JZ – 1	NEGATIVO
42	Cocalmayo Jacuzzi	CMY JZ – 2	POSITIVO
43	Minas moqo Central	MIO C - 1	NEGATIVO
44	Minas moqo	MIO – 1	NEGATIVO
45	Minas moqo	MIO – 2	NEGATIVO
46	Minas moqo	MIO – 3	NEGATIVO
47	Lares Piscina	LP – 3.1	NEGATIVO
48	Lares Piscina	LP – 3.2	NEGATIVO
49	Lares Piscina	LP – 3.3	NEGATIVO
50	Lares Piscina	LP – 3.4	NEGATIVO
51	Lares Piscina	LP – 3.5	NEGATIVO
52	Lares Piscina	LP – 4.1	NEGATIVO
53	Lares Piscina	LP – 4.2	NEGATIVO
54	Lares Piscina	LP – 4.3	NEGATIVO
55	Lares Piscina	LP – 4.4	POSITIVO
56	Lares Piscina	LP – 6.1	NEGATIVO
57	Lares Piscina	LP – 6.2	NEGATIVO
TOTAL	57 muestras		



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN
ACTA DE SUSTENTACION VIRTUAL N° 035-2022-FCCBB-UI

Siendo las 15:30 horas del día 29 de diciembre de 2022, se reunieron vía plataforma virtual, **meet.google.com/urm-bjow-gra** los Miembros del Jurado evaluador de la tesis titulada **“Caracterización morfológica y molecular de amebas de vida libre potencialmente patógenas aisladas de aguas termales en Cusco, Perú”**, designados por Resolución 022-2019-UI-FCCBB de fecha 31 de mayo de 2019 y la Resolución N° 024-2019-UI-FCCBB de fecha 17 de junio de 2019, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza	Presidenta
Dr. César Alberto Guzmán Vigo	Secretario
Lic. Julio César Silva Estela	Vocal
Mblga. María Teresa Silva García	Asesora

Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 365-2022-VIRTUAL-FCCBB/D, de fecha 28 de diciembre de 2022.

La Tesis presentada y sustentada por el **Bachiller CHRISTIAN DIEGO DELGADO TENORIO** tuvo una duración de 30 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de **(BUENO) (17)** en la escala vigesimal.

Por lo que el Bachiller **CHRISTIAN DIEGO DELGADO TENORIO** queda **APTO** para obtener el título profesional de Licenciado en Biología – Microbiología - Parasitología, de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 17:05 horas se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza
Presidenta

Dr. César Alberto Guzmán Vigo
Secretario

Lic. Julio César Silva Estela
Vocal

Mblga. María Teresa Silva García
Asesora

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Quien suscribe, Mblga. María Teresa Silva García, Asesora de Tesis, del Bachiller, Delgado Tenorio Christian Diego, de la Tesis titulada: “Caracterización morfológica y molecular de amebas de vida libre potencialmente patógenas aisladas de aguas termales en Cusco, Perú “, luego de la revisión exhaustiva del documento constato que la misma tiene un índice de similitud de 17 % verificable en el reporte de similitud del programa Turnitin.

La suscrita analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque, 28 de diciembre del 2022



Mblga. María teresa Silva García

Asesora de Tesis

Caracterización morfológica y molecular de amebas de vida libre potencialmente patógenas aisladas de aguas termales en Cusco, Perú

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

INDICE DE SIMILITUD

15%

FUENTES DE INTERNET

4%

PUBLICACIONES

4%

TRABAJS DEL
ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1

zagan.unizar.es

Fuente de Internet

4%

2

riul.unanleon.edu.ni:8080

Fuente de Internet

2%

3

repositorio.unprg.edu.pe

Fuente de Internet

1%

4

bibliotecadigital.usb.edu.co

Fuente de Internet

1%

5

Submitted to UTEC Universidad de Ingeniería
& Tecnología

Trabajo del estudiante

1%

6

repositorio.ufpb.br

Fuente de Internet

1%

7

www.educacion.gob.es

Fuente de Internet

1%

8

Submitted to Universidad Alas Peruanas

Trabajo del estudiante

1%

9	www.redalyc.org Fuente de Internet	<1 %
10	doku.pub Fuente de Internet	<1 %
11	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
12	riull.ull.es Fuente de Internet	<1 %
13	www.scielo.org.co Fuente de Internet	<1 %
14	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Trabajo del estudiante	<1 %
15	documents.mx Fuente de Internet	<1 %
16	hal.univ-lorraine.fr Fuente de Internet	<1 %
17	eprints.ucm.es Fuente de Internet	<1 %
18	certezadirecto.blogspot.com Fuente de Internet	<1 %
19	fcv.uccuyosl.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
20	repositorio.inta.gob.ar Fuente de Internet	

<1 %

21

repositorio.uwiener.edu.pe

Fuente de Internet

<1 %

22

revistabiomedica.org

Fuente de Internet

<1 %

23

idoc.pub

Fuente de Internet

<1 %

24

link.springer.com

Fuente de Internet

<1 %

25

www.scielo.org.pe

Fuente de Internet

<1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 15 words

Excluir bibliografía

Activo



Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por **Turnitin**. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega: Christian Diego Delgado Tenorio
Título del ejercicio: tesis pregrado
Título de la entrega: Caracterización morfológica y molecular de amebas de vida ...
Nombre del archivo: TESIS_DIEGO_final_TURNITIN28_diciembre_-.docx
Tamaño del archivo: 3.43M
Total páginas: 40
Total de palabras: 8,511
Total de caracteres: 50,138
Fecha de entrega: 28-dic.-2022 07:47a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega... 1987097424

