



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE MEDICINA

**TESIS PARA OPTAR POR EL TITULO
PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
TECNOLOGIA MÉDICA, ESPECIALIDAD
LABORATORIO CLÍNICO**

TITULO

**Descripción morfológica de Amebas de Vida Libre en fuentes
ambientales en Lima Metropolitana.**

AUTOR

Peláez Lázaro, David Leopoldo

ASESOR

Cabello Vílchez, Alfonso Martín

2019

TABLA DE CONTENIDO

TITULO	i
TABLA DE CONTENIDO	ii
RESUMEN	iii
SUMMARY	iv
1. INTRODUCCION	1
2. MATERIALES Y METODOS	6
2.1. Diseño de estudio: Estudio descriptivo y trasversal.	6
2.2. Criterios de selección de muestras	6
2.3. Muestras ambientales	6
2.4. Tamaño de la Muestra	6
2.5. Recolección de muestras:.....	6
2.6. Siembra, cultivo y aislamiento de AVL:.....	7
2.7. Uso de las claves de identificación morfológicas.	9
3. RESULTADOS	10
Muestra de suelo:	10
Muestra de agua de piletas	11
4. DISCUSIÓN	12
5. CONCLUSIONES:	16
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	18
Anexos	22

RESUMEN

Objetivo: Describir la diversidad de Amebas de Vida Libre en las muestras de suelo y agua de piletas en los distritos de Lima: Pueblo Libre y San Martín de Porres.

Materiales y métodos: Se recolectaron 14 muestras de suelo y agua de los distritos de Pueblo Libre y San Martín de Porres. Se realizó 70 siembras, 5 siembras por muestra. Las muestras fueron sembradas en placas de agar no nutritivo con *Escherichia coli* ATCC 25922 e incubadas a una temperatura ambiental; se utilizó la técnica de clonación continua para obtener una cepa pura de Ameba de Vida Libre. Cada microorganismo fue descrito de acuerdo con sus características propias: morfología y tamaño.

Resultados: Crecieron 9 especies de amebas de vida libre que tuvieron un desarrollo favorable en los medios de cultivo. 3 fueron *Acanthamoeba sp*, 1 cepa de *Vannella sp*, 5 fueron *Insertae sedis* y los 5 restantes no crecieron.

Conclusión: El presente estudio ha permitido establecer que las fuentes de agua y el suelo de Lima posee muchas especies nunca descritas en la literatura de protistas ambientales. Todas corresponden a la orden *Gymnamoeba*. Algunas fuentes de agua en los distritos de Lima podrían contener *Acanthamoeba sp* potencialmente patógenos, como en el distrito de San Martín de Porres

PALABRAS CLAVES: Amebas de Vida Libre, tierra, agua, cultivo monoxenico, encefalitis granulomatosa amebiana, meningoencefalitis amebiana primaria.

SUMMARY

Objective: To describe the diversity of free-living amoeba in the samples of soil and water from pools in two districts of Lima: Pueblo Libre and San Martín de Porres.

Materials and methods: Fourteen samples of soil and water were collected from the districts of Pueblo Libre and San Martín de Porres. It was carried out, 70 sowings in culture medium, 5 sowings per sample. Samples were seeded on non-nutritive agar plates with *Escherichia coli* ATCC 25922 and incubated at room temperature; the continuous cloning technique was used to obtain pure strains of free-living amoeba. Each microorganism was described; size, morphology and own characteristics.

Results: Seven free-living amoebae's species were found that had a favorable development in the culture media and were classified by: size, morphology and internal characteristics.

Results: 9 species of free-living amoebas grew, which had a favorable development in the culture media and were classified by: size, morphology and internal characteristics.

3 were *Acanthamoeba sp*, 1 strain of *Vannella sp*, 5 were *Insertae sedis* and the rest of the samples (5) did not grow.

Conclusion: The present study has established that Lima's water sources and soil have many species never described in the literature of environmental protists. All correspond to the *Gymnamoeba* order. Some water sources in the districts of Lima could contain potentially pathogenic *Acanthamoeba sp*, as in the district of San Martín de Porres.

KEYWORDS: Free living Amoeba, soil, water, monoxenic culture, amebic granulomatous encephalitis, primary amebic meningoencephalitis.

1. INTRODUCCION

La presente investigación está referida a la búsqueda, descripción y análisis morfológico de amebas de vida libre (AVL) en ambientes naturales y artificiales. Estas AVL son protozoos anfitriónicos distribuidos ampliamente en la naturaleza. Son capaces de cumplir todo su ciclo de vida en el medio ambiente, sin necesidad de otros hospedadores (1). Se las puede encontrar distribuidas ampliamente en varios ambientes del planeta como: fuentes de agua dulce o salada, cuerpos de agua estancada con materia orgánica en descomposición, hielo, aire, permafrost, polvo, sedimento marino, etcétera. La gran mayoría de las AVL descritas presentan dos estadios evolutivos; Quiste y Trofozoíto. Sin embargo, hay algunas especies que poseen hasta tres estadios incluyendo el estadio biflagelado, como es el caso de las *Naegleria sp.*

El trofozoíto, estadio móvil y reproductivo, es conocido también como estadio infectante. El quiste, es la forma resistente del protista para sobrevivir a los ambientes extremos, en este estadio no se favorece su desarrollo ni reproducción. En otros géneros de amebas se le conoce como el estadio infectante, debido a que en este estadio resisten (quiste) en el medio ambiente. En 1980 “The Committee on Systematics and Evolution of the Society of Protozoologists” publicó una revisión de actualización acerca de la taxonomía de protozoos que es la tradicionalmente usada en todo el mundo. Esta categorización se basa en las características morfológicas y estructurales de los organismos a clasificar (1, 2, 3, 4).

Las amebas de vida libre pertenecen a la Super clase *Rhizopoda* se caracterizan por presentar: reproducción asexual, enquistamiento común, seudópodos tipo lobopodios, filopodios o reticulopodios (5, 6, 7, 8, 9).

El término protozoo (del griego *Proto*: primero; *Zoo*: animal) se emplea para referirse a organismos constituidos por una sola célula, heterótrofos y de forma y tamaño variables. Como características generales estos protozoos son cosmopolitas, han sido aislados de aguas dulces, saladas, de la tierra y de hospedadores vertebrados e invertebrados. Presentan distintos tipos de reproducción: asexual, fisión binaria, múltiple o gemación o sexual por conjugación. (4, 9).

Dentro de este Orden se ubica la familia *Acanthamoebidae*, la que contiene a los géneros *Acanthamoeba* y *Balamuthia*. *Balamuthia* se reubicó en esta familia a partir de la década del 90'; al momento de la publicación citada se encontraba dentro de la Familia *Leptomyxidae* (10). *Naegleria* pertenece al Orden *Schizopyrenida*, en el cual se ubican protozoos de vida libre que suelen considerarse bifásicos, ya que poseen en su ciclo de vida un estadio flagelado y uno ameboide. *Vahlkampfiidae* es la familia que contiene a este género de importancia en salud humana. En la actualidad la “*Internacional Society of Protozoologists*” acepta y recomienda la revisión publicada en el 2005, y revisada en 2012 (11, 12). Las amebas de vida libre tienen una categorización y diferenciación particular. Se les denomina “*Gymnamoebas*” (amebas desnudas). Las amebas desnudas incluyen especies de hábitat terrestres y acuáticas (13) y hábitat marino (14).

La característica principal de este tipo de estudio está basada en la presencia o ausencia de estos protistas en el suelo y agua. En el suelo, los diversos protistas como las amebas, flagelados y ciliados influyen en la estructura de la comunidad microbiana y mejoran el reciclaje de nutrientes. Entre estos microorganismos, las AVL son los principales consumidores bacterianos dominantes y son responsables de hasta el 60% de la reducción total de la población bacteriana, los procariontes son los principales encargados de la descomposición de la materia orgánica en el suelo, pero son ineficientes en la liberación

de minerales a partir de su propia masa. Entre los organismos secundarios en realizar los procesos de descomposición, están las AVL, las cuales consumen a los organismos primarios (bacterias) y liberan nutrientes minerales como productos de desecho que están enlazados a la biomasa de las bacterias, contribuyendo así al funcionamiento de los ecosistemas (15,16). Los protozoarios generalmente encontrados en los suelos cultivables incluyen flagelados, amebas desnudas y ciliados. Los flagelados heterotróficos de vida libre y las amebas desnudas los más numerosos (17), con poblaciones que oscilan entre los 10^3 y 10^6 microorganismos/g de suelo seco (18-22). La densidad de las amebas en el medio ambiente está regulado por la disponibilidad de materia orgánica y microorganismos (bacterias y pequeños eucariotas). No todas las amebas de vida libre que se encuentran en el suelo causan enfermedad en humanos, están limitados a 3 especies principalmente. Sin embargo, es posible que las amebas no patógenas funcionen como transportador de algún patógenos. Para un inexperto en la observación de estos protistas, todos serán idénticos. Sin embargo, se creó una manera para identificar grupos funcionales. En 1999, Alexey V. Smirnov y Andrew V. Goodkov publican una guía ilustrada de los morfotipos para clasificar las amebas de vida libre. El análisis detallado de la diversidad de formas locomotoras entre las amebas lobosas desnudas (*Lobosea*, *Gymnamoebia*) les permitió construir una tipología que consta de 19 “morfotipos” que abarcan todas las especies conocidas de la subclase *Gymnamoebia* (13,23, 24, 25, 26,27). En un estudio, el suelo que contiene *Acanthamoeba* y bacterias mostró significativamente mayor mineralización de carbono, nitrógeno y fósforo en comparación con el suelo que contiene las bacterias, pero sin *Acanthamoeba*, (22,28).

Acanthamoeba sp.

El término “*acanth*” en griego significa espinas, fue agregado al término ameba para indicar la presencia de estructuras como espinas, ahora conocidas como acantopodios, (29). Son protozoos que se encuentran comúnmente en agua y suelo, sin embargo, sólo unas pocas especies son capaces de causar enfermedad en humanos.

De los 20 genotipos de *Acanthamoeba* spp. descritos hasta aquí, 12 han sido aislados en casos humanos, 4 sólo en queratitis (genotipos T3, T6, T11 y T13), 3 sólo en encefalitis (genotipos T1, T12 y T18) y 5 genotipos identificados en casos de queratitis y encefalitis (genotipos T2, T4, T5, T10 y T15) (4).

Pussard y Pons en 1977, propusieron una clasificación basada principalmente en la morfología y medida del quiste en 3 grupos (30,31). Fueron incorporadas *A. tubiashi*, (32) y *A. byersi*, (33). También se agregaron *A. hatchetti*, (32) y *A. micheli* sp. Nov, (34). *Acanthamoeba* se mueve relativamente rápido, con una velocidad de aproximadamente 0.8µm/segundo (29). *Acanthamoeba* ha sido descrita en varios países del mundo, causando el mayor problema a nivel neurológico, la meningoencefalitis granulomatosa. La tasa de sobrevivencia ronda el 1 a 2 %.

El interés partió de nuestro grupo de investigación. Los estudios exploratorios en ambientes naturales en Perú son por decir lo menos de escasos a ausentes. Para nosotros es importante establecer si determinados espacios públicos podrían ser fuentes de contaminación sin que la población lo sepa y más aún, sin que las autoridades de nuestro país se preocupen de estas entidades biológicas que pueden llegar a causar una tasa de mortalidad de hasta 98%.

Nuestro interés académico nos ha llevado a la búsqueda de amebas de vida libre en ambientes naturales, que podría mostrarnos muchas nuevas especies no descubiertas por

la ciencia. Por otro lado, no debemos olvidar que las personas se contaminan por contacto directo en el medio ambiente, por ende, es importante la evaluación del medio ambiente en zonas en donde determinada población se concentra como, por ejemplo; niños y adolescentes en parques y zonas cercanas a las piletas.

Nuestro grupo ha desarrollado una estrategia bastante simple que nos ha permitido el aislamiento de algunas especies. En general, nos hemos basado del Manual de F. Page 1988 y Smirnov 2004 entre otros. Los medios de cultivos adecuados descritos por estos dos investigadores. Es, sin lugar a duda una línea de investigación muy interesante con grandes probabilidades de hallar muchas nuevas especies, algunas potencialmente patógenas para humanos y animales.

El hallazgo de nuevas especies de amebas de vida libre empieza por el descubrimiento de su morfología y su biología. Es importante la descripción de todas las especies que puedan ser aisladas del medio ambiente, debido que algunas podrían ser potencialmente patógenas.

El objetivo principal de este estudio fue describir la diversidad morfológica de amebas de vida libre en las muestras de suelo y agua de forma aleatoria en dos distritos (Pueblo Libre y San Martín de Porres), considerando las diferentes condiciones micro-climáticas de cada distrito.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Diseño de estudio: Estudio descriptivo y trasversal.

2.2. Criterios de selección de muestras

Se tomó muestras de forma aleatoria y una sola vez para evaluar la presencia o ausencia de ameba de vida libre y describir la posible diversidad de especies.

2.3. Muestras ambientales

En el Parque Las Américas de Pueblo Libre se obtuvieron un total de 5 muestras de tierra y 1 de agua, esta única muestra de agua fue tomada en el nacimiento de la canaleta, de esta manera nos aseguramos de captar las amebas desde el origen.

En el distrito de San Martín de Porres se tomaron 8 muestras de agua de dos Pileta.

2.4. Tamaño de la Muestra

Se desconoce actualmente la prevalencia de amebas de vida libre en el medio ambiente.

No existen estudios previos que permitan estimar con ello el número muestral, por lo tanto, no fue necesario realizar un cálculo de tamaño de muestra. La técnica de muestreo fue No Probabilística, por conveniencia.

La población lo constituye todas las amebas en las muestras de suelo y agua. En cuanto a la unidad muestral, lo constituiría el morfotipo que se halle en las muestras de suelo y agua.

2.5. Recolección de muestras:

Las muestras de suelo fueron recolectadas del Parque Las Américas ubicado en el Distrito de Pueblo Libre en la Ciudad de Lima Metropolitana, Perú. Durante la estación de invierno del 2017. Se eligió este parque debido a su sistema de riego que consiste en el uso de canaletas alrededor de todo el perímetro, guiando el agua que proviene de un pozo de agua tratada. Se recolectó cinco muestras de suelo (MSP-1, MSP-2, MSP-3, MSP-4,

MSP-5) y una de agua (MAP-6) en frascos de plástico estériles de 100 ml de capacidad. Se recolectaron un total de 6 muestras para investigar la presencia de AVL (Anexo Tabla 1).

Las muestras de agua fueron recolectadas de un circuito de piletas ubicadas en la Avenida Perú cuadra 22 en el distrito de San Martín de Porres en la Ciudad de Lima Metropolitana, Perú. Se eligió este circuito por el alto nivel de contaminación ambiental que genera los vehículos de transporte público y privado que circulan en la misma avenida donde se encuentra este circuito de piletas. El agua se recolectó de dos piletas separadas por una distancia de 200 metros, en cuatro puntos distintos, en frascos de plástico estériles de 100 ml de capacidad. Se recolectaron un total de 8 muestras (AP-1, AP-2, AP-3, AP-4; AP-1b, AP-2b, AP-3b, AP-4b) para investigar la presencia de AVL.

2.6. Siembra, cultivo y aislamiento de AVL:

Se recolecto 14 muestras en total. Por cada muestra se realizó 5 siembras en cada medio de cultivo consiguiendo 70 siembras o cultivos. Esto fue para asegurarnos el crecimiento de cualquier AVL.

Las muestras se recogieron en frascos estériles, de boca ancha y tapa hermética. Una vez obtenidas las muestras se llevaron al laboratorio, las muestras de agua se dejaron reposar por un tiempo de 36 – 48 horas a una temperatura de 21°C. Las muestras fueron sembradas en placas de agar no nutritivo cubiertas con *Escherichia coli*, se colocó 5 gotas de cada muestra por cada placa de agar y/o 5 gotas de cada muestra por placa de ANN.

A. Preparación de medios monoxenico: Agar no Nutritivo ANN (Monoxenico).

Se Preparó agar-agar no nutritivo (ANN) al 2% y vertió de 3-4 mL del medio en placas Petri estériles descartables. La solución Page (10 x) ANN: NaCl: 120mg, MgSO₄ x 7H₂O: 4mg, Na₂ HPO₄ 142mg, KH₂PO₄ 136mg, CaCl₂ x 2H₂O 4mg, 1L de H₂O destilada. Se dispenso 100mL sol. Page en 900mL de H₂O; luego se agregó 20gr de agar y se esterilizo

en autoclave. El agar no nutritivo plaqueado en la placa Petri cubierto con una fina capa de *Escherichia coli*, en las placas de 90mm de diámetro; la superficie de la placa debe estar completamente seca. La muestra se dejó en el centro de la placa de ANN.

Se incubaron a 20°C y 37°C. De 24 a 48hrs después la incubación se buscó amebas y se resembraron en placas nuevas para tener cultivos puros y libres de contaminantes. Las cosechas se realizaron para proceder con el cultivo axénico. Cada muestra se centrifugo a 1000g x 10 min y se sembró en PYG.

Medios de cultivo axénico: Se empleará medios líquidos como el PYG, Lares-Cerva

Medio PYG (Peptone, Yeast Extract, Glucose, ATCC 712)

Triptona (Oxoid)/ Proteosa-Peptona	20.0	g
Extracto de Levadura (Oxoid)	2.0	g
Glucosa	18	g
Solución Page	1000	mL
Penicilina/ Estreptomicina	400	µg/ml
Suero bovino fetal	10%	

Medio de Lubor Cerva

Casitona (Difco)	20	g
Ácido fólico	2	mg
Glucosa	1	g
Suero fetal de ternera (fluido)	50	mL
Penicilina	500,000	Und.
Estreptomicina	50,000	mg
Agua bidestilada	950	mL

Los cultivos se incubaron alrededor de 7 días, los que dieron negativo continuaron en observación hasta cumplir los 20 días a 90 días. Los cultivos que fueron considerados positivos cuando se observaron trofozoítos y/o quistes que fueron compatibles con AVL.

2.7. Uso de las claves de identificación morfológicas.

Se empleó las claves de identificación morfológicas para amebas de vida libre, estos manuales sirven para establecer parámetros que ayuden a describir y comparar especies de amebas de vida libre del medio ambiente. Las principales claves de identificación morfológica fueron; [A new key to freshwater and soil *Gymnamoebae* 1988] [Nackte *Rhizopoda and Heliozoa* 1991] publicada por F. Page 1983, 1988 y 1991, así como; Illustrated Guide to the Protozoa, 2nd Edition 2000 por J. J. Lee, Gordon F. Leedale, Phyllis Bradbury. Además Free-Living Freshwater Protozoa: A Color Guide 1st Edition 1996 Por: D. J. Patterson. Se empleó los trabajos como; Protozoology 1969 de Richard Kudo. Finalmente, se consultó los trabajos de Alexey Smirnov, Guide to the methods of study and identification of soil *Gymnamoebae*. 2004 y 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 (36, 37,38,39).

Aspectos Éticos.

El proyecto de investigación fue exonerado por el Comité Institucional de Ética de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (SIDISI: 101823) por no involucrar animales ni personas.

3. RESULTADOS

Se tomaron 14 muestras ambientales, 5 muestras de suelo de un parque, 1 de agua del origen de la canaleta y 8 muestras de agua de dos piletas. Con estas 14 muestras se realizaron 70 cultivos. De estos 70 cultivos, aislamos 9 especies de amebas de vida libre. 3 de ellas fueron *Acanthamoeba sp*, 1 cepa de *Vannella sp*, 5 *Insertae sedis* y los 5 restantes no crecieron. La tasa de éxito en el aislamiento fue de 64,28%. Todas crecieron a temperatura ambiental.

Muestras de suelo del parque “Las Américas” fueron recolectada el 11 de julio del 2017 a las 6 de la tarde. 3 (5) muestras mostraron amebas de vida libre de taxonomía incierta, 2(5) no crecieron.

Muestra de suelo:

MSP-1: Estructura ameboidea observada al 5^{to} día de cultivo. El crecimiento homogéneo se visualizó al día 22. Las estructuras ameboideas de 10 µm, redonda a ovalada, con gran movilidad y un incremento de su biomasa en muy pocos días. (Imagen-1).

MSP-2: Estructura ameboidea al 5^o día de cultivo. El crecimiento homogéneo se visualizó al día 23. Las estructuras ameboideas fueron de 20 a 40 µm, ovalada sin presencia de pseudópodos, núcleo excéntrico, probables granulaciones intracitoplasmáticas (posiblemente levaduras fagocitadas o cristales) y un incremento de su biomasa en pocos días (Imagen-2).

MSP-3: Se observó una estructura ameboidea al 5^{to} día de cultivo. El crecimiento homogéneo se visualizó al día 18. Las estructuras fueron aproximadamente de 10 µm, redonda a ovalada con gran movilidad y un incremento de su biomasa en muy pocos días (Imagen- 3).

MSP-4 y MSP-5: No hubo crecimiento.

MAP-6: En esta muestra crecieron 2 cepas:

Primera cepa (MAP-6a)- Esta cepa creció a las 72 horas después de la siembra, es de 10 a 12 μm de diámetro, redonda a ovalada, con gran movilidad, su biomasa se incrementa significativamente en pocos días 2 a 3 días.

Segunda cepa (MAP-6b)- Esta cepa tomo 26 días en aparecer, mide entre 20 – 40 μm , de morfología amorfa con prolongaciones citoplasmáticas muy extensas de aproximadamente 20 μm de largo, el núcleo fue central y con múltiples pseudópodos.

Durante la observación del crecimiento de esta ameba se pudo constatar una aparente dependencia con una bacteria (bacilo Gram negativo) de colonias con aspecto mucoide. A los 7 días se visualiza el crecimiento de esta cepa y se logra separa de las hifas que crecían junto a esta cepa, lo que presupone que sea una ameba micófaga. El crecimiento de esta ameba es particularmente lento, aproximadamente 15 – 25 días y solo fue posible mantenerla con la colonia mucoide, de otra manera no se expande en la placa de agar (Imagen-4).

Muestra de agua de piletas

Solo 5(8) (62.5%) muestras estudiadas del Circuito de Piletas de San Martin de Porres, crecieron AVL, todas a temperatura ambiente. Solo 3(5) (60%) fueron positivas y morfológicamente compatibles al género *Acanthamoeba* (AP-1b,2b y 3b), 1 muestra (20%) se identificó morfológicamente con el género *Vannella* (AP-4). La última muestra (AP-4b) fue de taxonomía incierta correspondiente al (20%).

AP-1, AP-2 y AP-3: No hubo crecimiento.

AP-4: Crecimiento de estructura ameboide al 4^{to} día de cultivo. Las estructuras de aproximadamente 20 μm , en forma de abanico y alargada, sin emisión de pseudópodos, con núcleo y vacuola central, poca movilidad aparentemente. La velocidad de crecimiento es baja. Se identificó morfológicamente como *Vannella sp*, no formadora de quiste. (Imagen 5).

Las muestras AP-1b; AP-2b; AP-3b: Crecieron a 6^{to} día de siembra. Amebas compatibles por las características del trofozoíto y quiste con *Acanthamoeba sp.*

AP-4b: Estructura ameboidea muy grandes de 45 a 70 μm , de morfología redonda con emisión de pseudópodos de aproximadamente 5 – 10 μm . la velocidad de replicación es muy baja. Forma quiste rápidamente, el quiste es de forma esférica y pequeño aproximadamente de 5 - 7 μm . Esta ameba no guardo relación morfológica con otros géneros mencionados (Imagen 9), (Tabla 3).

Análisis de Datos

La proporción de aislamiento por siembra es bastante menor a la que esperábamos. Sin embargo, es interesante saber que el 4,28 % de aislamiento le corresponde a *Acanthamoeba sp.*, 7,14% a *Insertae sedis* y finalmente 1.42% a la *Vannella sp.*

4. DISCUSIÓN

Los estudios de Protozoología de suelo son básicos si deseamos conocer microfauna del medio ambiente que nos rodea y en la cual entramos en contacto diariamente. Las personas susceptibles a las infecciones por amebas de vida libre han adquirido la infección (enfermedad) por sobre exposición a alguna fuente de agua o alguna fuente de suelo. En nuestro país, se desconoce absolutamente cuales son las fuentes de posible contaminación. Si bien es cierto que, en algunos casos clínicos publicados se describen brevemente, lo cierto es que son escasas las publicaciones, si a eso le sumamos las enormes deficiencias del estado peruano a la evaluación de las fuentes de agua y la falta de investigación en esta área en particular. Es de suponer que nunca será posible establecer con absoluta seguridad el lugar más probable o preciso de contaminación o la fuente original de los brotes.

En este estudio, hemos querido explorar solo dos fuentes ambientales en dos distritos con diferencias importantes en polución, cercanía al mar y microclima. Pueblo libre (PL) es un distrito cerca al mar y el lugar de evaluación ha sido un ambiente de recreación (parque) en donde acuden una amplia diversidad de personas; desde niños hasta adultos. El hallazgo de especies de taxonomía incierta en Pueblo Libre (PL) podría estar revelando la amplia diversidad de especies de protistas que nunca se han investigado. Por el otro lado, en la avenida Perú distrito de San Martín de Porres (SMP), un lugar de alto tráfico de vehículos con una alta contaminación atmosférica por CO₂ y polvo ambiental > 30 Tm por Km² al mes (40) y otros gases producto de la combustión del parque automotor, muchos de estos vehículos son muy antiguos, en este lugar interesantemente se halló una ameba del género *Acanthamoeba sp* en las piletas (fuente de agua potable) de San Martín Porres, podrían significar un peligro potencialmente latente.

Las muestras de suelo de PL mostrarían una rica variedad de protistas identificados en esta muestra. Aunque el número de muestras es bajo, la aparición de morfotipos tipo abanico no suelen ser muy frecuente, aquí se repitió el aislamiento 3 veces. Desafortunadamente no fue posible obtener ADN debido a que no soportaron 37°C y sufrieron lisis. Esto sin duda demostraría que estas cepas no son patógenas. Una característica de esta cepa es su pequeño tamaño y el gran número de cristales intracelulares que pueden ser visualizados. No se conoce las funciones que cumplirían algunos cristales intracelulares, podrían ser producto de un metabolito que se formó y que la ameba es incapaz de disolver.

Muestras de SM sorprendentemente se identificó a un miembro de género *Vannella sp* y 3 de *Acanthamoeba sp*. Las *Vannella* son amebas no patogénicas. Sin embargo, si se han demostrado eventualmente implicadas en procesos de queratitis amebiana (41). La

capacidad de transportar patógenos de manera intracelular lo hace interesante candidato de estudio. Su limitante es que no produce estadio de quiste. Se desconoce cómo sobreviven en el medio ambiente si no son capaces de formar quiste.

Las *Vannella* son amebas de vida libre que no forman quistes, la forma de locomoción es aplanada, usualmente más o menos flabelada, rara vez lingüiforme con un hialoplasma anterior usualmente una vez y medio más amplio en longitud; las formas flotantes a menudo son de forma radial con pseudópodo hialino (1,5). Estas amebas viven en el medio acuático.

Se han reportado esporádicamente su implicancia en problemas oculares en humanos, pueden transportar cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos (42). Si estas amebas pueden ser transportadas por vía aerosol portando bacterias patógenas, sería el mejor método de transmisión sin que la población ingrese a un ambiente potencialmente contaminado, es decir, no sería necesario que las personas se desplacen amplias distancias, el aerosol sería el mecanismo por el que se propagarían los patógenos intracelulares.

El trabajo más extenso lo ha publicado el Dr. Alexey Smirnov en el 2007, “Phylogeny, Evolution, and Taxonomy of *Vannellid Amoebae*” de la universidad de San Petersburgo – Rusia. A. Smirnov confirma que todas las *Vannella* forman un clado diferente en el árbol del SSU consistiendo en 4 géneros: *Vannella*, *Platyamoeba*, *Clydonella* y *Lingulamoeba*. (43). Aunque nosotros no hemos analizado desde el punto de vista molecular, hemos podido distinguir que comparte características compatibles con las descritas por Page 1988, lo que permite establecer y aseverar que es una *Vannella sp.*

Acanthamoeba sp. Produce Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG); la forma infectante es la fase de trofozoítos, que invade el sistema nervioso central (SNC) (44). La vía de entrada puede ser intranasal, o a través de una lesión en la piel. Los síntomas tempranos de la infección son dolor insidioso de cabeza, hemiparesia, somnolencia, cambios en la personalidad, convulsiones, náuseas, vómitos. La fiebre es esporádica y generalmente baja. La enfermedad progresa durante un período de una a varias semanas y generalmente termina en coma y muerte. El período de incubación de la enfermedad es difícil de determinar, ya que las lesiones cutáneas y/o pulmonares pueden estar presentes durante meses antes de que aparezca la encefalitis.

Esta ameba está muy bien caracterizada y estudiada a nivel mundial. En nuestro estudio hemos podido distinguir tres cepas de *Acanthamoeba sp.* Las tres cepas fueron halladas en las fuentes de agua de S.M.P. Las condiciones microbiológicas son propicias para que proliferen estas cepas. No se ha podido establecer si corresponde a una cepa patógena o no patógena. Sin embargo, el hecho de ser una representante del grupo causante de meningoencefalitis granulomatosa (MEG) y queratitis amebiana (QA), proporciona un grado de preocupación a nivel de salud pública. Garaycochea et al 2008 (45), describen la presencia de amebas de vida libre en muestras ambientales en Lima metropolitana, en sus conclusiones se menciona que estas cepas no son patógenas.

La cepa MAP-6 (*Insertae sedis*): aislada del agua del parque de PL, posee unas características muy particulares. La especie crece en aproximadamente 15 a 20 días. Al microscopio se puede observar que muestran largas extensiones citoplasmáticas con terminales muy finas, tanto para el lado anterior como al posterior. Aproximadamente uno medio del total del citoplasma granular y la otra parte es capa hialina. Los pseudópodos poseen forma de dedo, se observan mejor a 1000x son cortos de 10µm de longitud. Esta

cepa es altamente pleomórfica con un rango de tamaño de 25 a 70µm. Interesantemente consume la bacteria mucoide (diplobacilar) que crece cerca de ella y también es posible establecer que consume levaduras y hongos filamentosos. Pues, siempre se veía estas estructuras muy cerca de ellas, a pesar de haberlas intentado separarlas, esto fue imposible. No soportan temperatura iguales o superiores 37°C.

5. CONCLUSIONES:

- En todos los (2) ambientes estudiados se ha podido establecer la presencia de AVL.
- Algunas especies observadas no se han podido identificar debido a que no aparecen en las claves de identificación de *Gymnamoebas*.
- Se han identificado cepas de *Acanthamoeba sp* en fuentes de agua que podrían ser potencialmente patógenas para algunos residentes humanos que concurren esas piletas.
- Durante el desarrollo de esta investigación hemos observado también que algunas cepas no muestran ser patógenas debido a que no toleran temperaturas mayores o iguales a 37°C.
- Se han identificado al menos 4 morfotipos (fan-shaped, acanthopodian, reticulate e *Insertae Sedis*) y 2 de ellos de importancia médica (*Acanthamoeba* y *Vannella*).

DECLARACION DE CONFLICTOS DE INTERES

El autor declara no tener conflictos de interés

FINANCIAMIENTO

Financiado por el Laboratorio de Protozoarios y Endosimbiontes Patógenos del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Page, F.C. (1988) *A new key to fresh water and soil amoebae*. Freshwater Biological Association Scientific Publications, Cumbria, UK, pp. 1–122.
2. Pages, F.C. (1976) *An Illustrated Key to Freshwater and Soil Amoebae with Notes on Cultivation and Ecology*. The Ferry House Far Sawrey, Ambleside, Cumbria: Freshwater Biological Association. pp. 155.
3. Levine ND, Corliss JO, Cox FE, Deroux G, Grain J, Honigberg BM, Leedale GF, Loeblich AR 3rd, Lom J, Lynn D, Merinfeld EG, Page FC, Poljansky G, Sprague V, Vavra J, Wallace FG. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 1980; 27(1):37-58
4. Cabello-Vílchez A M. *Acanthamoeba spp.* Un agente oportunista en Infecciones Humanas. *Revista de Investigación de la Universidad Nibert Wiener.* 2015 (4); 11-32
5. Page FC. *Nackte Rhizopoda*. In: *Nackte Rhizopoda und Heliozoa* (Eds. Page F.C. and Siemensma F.J.). G. Fischer Verlag, Stuttgart-New York, 1991; pp. 1–170.
6. Bamforth SS. Symposium on “Protozoan Ecology”: the role of protozoa in litters and soils. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 1985; 32(3): 404 – 409
7. Marciano-Cabral, F. and Cabral, G. (2003) *Acanthamoeba spp.* as agents of disease in humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(2): 273–307.
8. Smirnov A. Amoebas, *Lobosea*. 2012. In book: *Eukaryotic Microbes*. Edition: 2nd. Publisher: Academic Press and Elsevier. Amsterdam. Editors: Schaechter
9. Cavalier-Smith T. The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002; 52(Pt 2):297_354.
10. Amaral Zettler, L. A., Nerad, T. A., O’Kelly, C. J., Peglar, M. T., Gillevet, P. M., Silberman, J. D., & Sogin, M. L. A molecular reassessment of the *Leptomyxid amoebae*. *Protist.* 2000;151: 275- 282.
11. Adl SM, Simpson AGB, Farmer MA et al. The new higherlevel classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryotic Microbiol.* 2005; 52: 399–451.

12. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE et al, The Revised Classification of Eukaryotes. *Journal of Eukaryotic Microbiology*.2012; 59: 429–514.
doi: 10.1111/j.1550- 7408.2012.00644.x
13. Smirnov AV, Goodkov AV. An illustrated list of the basic morphotypes of *Gymnamoebia* (*Rhizopoda*, *Lobosea*). *Protistology*.1999; 1: 20—29
14. Butler H, A. Rogerson. Naked amoebae from benthic sediments in the Clyde Sea area, Scotland. *Ophelia*.2000; (53) 37-54.
15. Cutler, D.W. The action of protozoa on bacteria when inoculated into sterile soil. *Ann. Appl.Biol.* 1923; 10:137-141.
16. Waksman, S.A. Studies on soil. *Soil Sci.* 1916. 1:135-152
17. Stout, J.D.; Heal, O.W. Protozoa. In *Soil Biology protozoa*. Ed. by A. Burges and F. Raw. London, Academic. Press. 1972. p. 149-189
18. Singh, B.N. A method of estimating the numbers of soil protozoa, especially amoebae, based on the differential feeding on bacteria. *Ann. Appl. Biol.*1946; 33:112
19. Stout, J.D. 1980. The role of protozoa in nutrient cycling and energy flow. *Advances in microbial ecology* 4:1-50
20. Singh, B.N.; Crump, L. The effect of partial sterilization by steam and formalin on the numbers of amoebae in field soil. *J. Gen. Microbiol.*1953; 8:421- 426.
21. Darbyshire, J.F. Effect of water suctions on the growth in soil of the ciliate *Colpoda steinii* and the bacterium *Azotobacter chroococcum*. *J. Soil Sc.*1976; 27:369-376
22. Clarholm, M. Protozoan grazing of bacteria in soil impact and importance. *Microb. Ecol.*1981; 7:343-35
23. Smirnov AV y Brown S. Guide to the methods of study and identification of soil *Gymnamoebae*. *Protistology*. 2004; 3 (3), 148-190
24. Finlay B.J. Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science*.2002; 296, 1061-1063.
25. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 1-26.
26. Gelman, B. B., Popov, V., Chaljub, G., Nadler, R., Rauf, S. J., Nauta, H. W. & Visvesvara, G. S. Neuropathological and ultrastructural features of amebic

- encephalitis caused by *Sappinia diploidea*. J. Neuropathol. Exp. Neurol.2003; 62:990–998.
27. Shatilovich, A.V., Shmakova, L.A., Gubin, S.V., Gudkov, A.V., Gilichinsky, D.A. Viable protozoa in late pleistocene and holocene permafrost sediments. Doklady Biol. Sci.2005; 401, 136–138.
 28. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Parasit Vectors. 2012; 10:5(6)1-13
 29. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev. 2006;30(4):564-95
 30. Page FC. Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *Journal of Protozoology*. 1967; 14: 709–724.
 31. Pussard M & Pons R Morphologies de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (protozoa, Amoebida) Protistologica. 1977; 13:557-610.
 32. Stothard DR, Schroeder-Diedrich JM, Awwad MH, Gast RJ, Ledee DR, Rodriguez-Zaragoza S, Dean CL, Fuerst PA, Byers TJ. The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. J. Eukaryot. Microbiol. 1998; 45: 45–54
 33. Qvarnstrom Y, Nerad TA, Visvesvara GS. Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* Species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. J Eukaryot Microbiol. 2013;60(6):626-33
 34. Magnet A, Henriques-Gil N, Galván-Díaz AL, Izquierdo F, Fenoy S, del Aguila C. Novel *Acanthamoeba* 18S rRNA gene sequence type from an environmental isolate. Parasitol Res. 2014;113(8):2845-50
 35. Iva Dyková, Jiří Lom, Jill M. Schroeder-Diedrich, Gregory C. Booton and Thomas J. Byers. *Acanthamoeba* Strains Isolated from Organs of Freshwater Fishes. J. Parasitol.1999; 85(6):1106-1113
 36. Patterson D. J., Simpson A. G. B., Rogerson A. Amoebae of uncertain affinities. In: An Illustrated Guide to the Protozoa (Eds. J. J. Lee, G. F. Leedale, P. Bradbury). Society of Protozoologists, Lawrence Kansas. 2^{ed}.2000.
 37. Patterson D. J. Free-Living Freshwater Protozoa: A Color Guide 1st Edition 1996.
 38. Kudo R. Protozoología. by Charles C Thomas. Publisher. cuarta edición. 1954.

39. Smirnov A.V. 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*. 2003; 3; (1) 47-57
40. Instituto Nacional de Estadística e Informática (INEI), 2012 Julio. Perú: Anuario De Estadísticas Ambientales, “Concentración promedio de polvo atmosférico sedimentable en las estaciones de muestreo de la red de lima metropolitana, 2006–2011”. Oficina Técnica de Estadísticas Departamentales, Lima, pp. 267
41. Michel R, Schmid EN, Böker T, Hager DG, Müller KD, Hoffmann R, Seitz HM. *Vannella* sp. harboring Microsporidia-like organisms isolated from the contact lens and inflamed eye of a female keratitis patient. *Parasitol Res*. 2000; 86(6):514-20
42. Michel R, Müller KD, Hoffmann R. Enlarged Chlamydia-like organisms as spontaneous infection of *Acanthamoeba castellanii*. *Parasitol Res*. 2001;87(3):248-51
43. Smirnov A.V, Nassonova ES, Chao E, Cavalier- Smith T. Phylogeny, Evolution, and Taxonomy of *Vannellid* Amoebae. *Protist*. 2007; (158): 295-324
44. Visvesvara GS, Moura H, Schuster FL. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50: 1-26.
45. Garaycochea M, Beltrán M, Morón C. Patogenicidad de las amebas de vida libre aisladas de fuentes de agua en Lima. *Rev Peru Med Exp Salud Pública*. 2008; 25(2): 204-7.

Anexos

Tabla N°1: Muestras ambientales y volúmenes obtenidos en la recolección.

	Tipo de muestra	N° de muestras	Cantidad de muestra
PL	Suelo	5	60g
	Agua	1	60mL
SM	Agua	4	60mL
	Agua	4	60mL

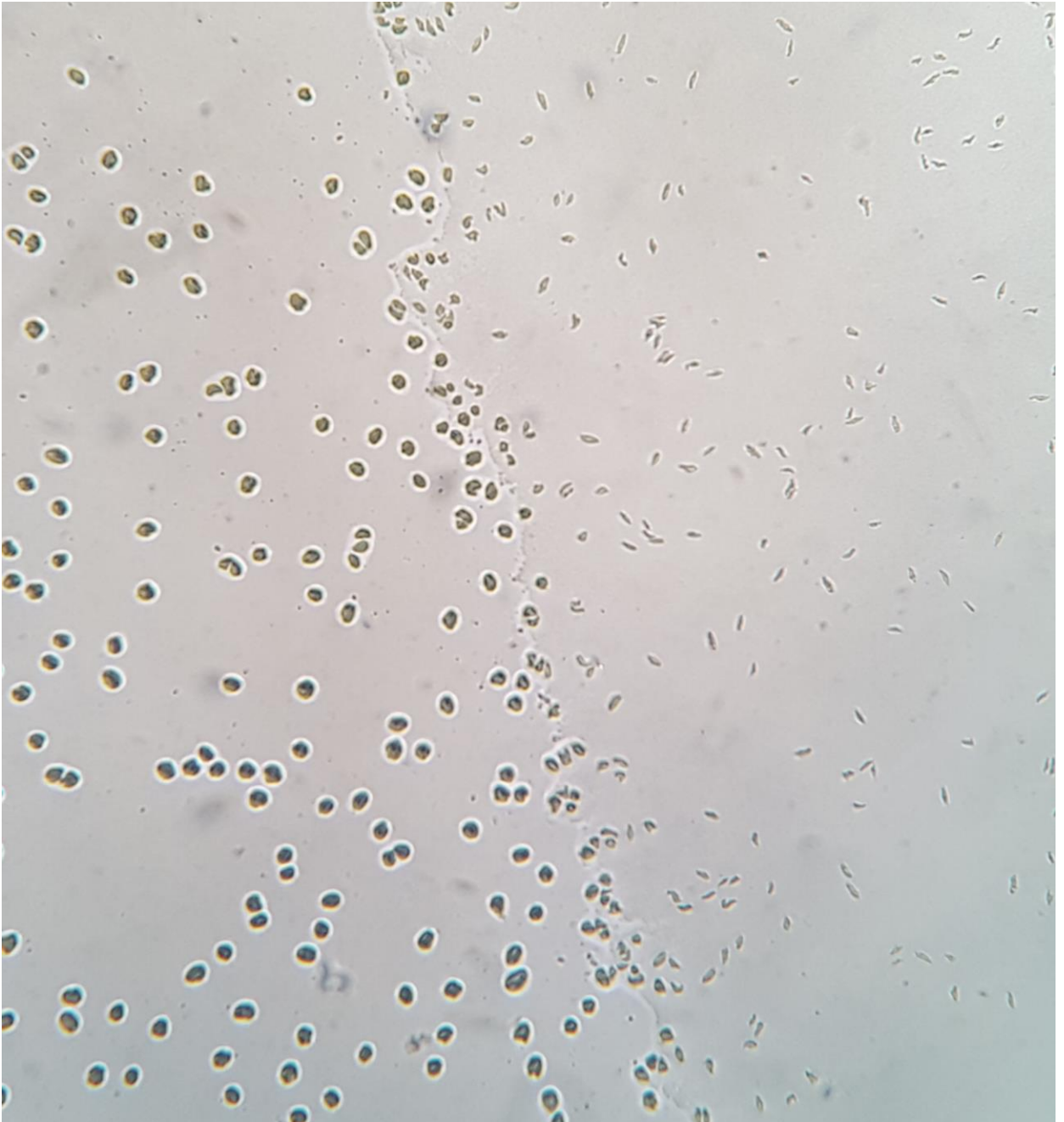
Tabla N° 2: Distribución de amebas de vida libre halladas en muestras ambientales.

Descripción	Número de muestras	Cepa aislada
Imagen 1	Muestra N° 1 (MSP-1)	<i>Insertae sedis</i>
Imagen 2	Muestra N° 2 (MSP-2)	<i>Insertae sedis</i>
Imagen 3	Muestra N° 3 (MSP-3)	<i>Insertae sedis</i>
Imagen 4	Muestra N° 6 (MSP-6)	<i>Insertae sedis</i>
Imagen 5	Muestra N° 4 (AP-4)	<i>Vannella</i>
Imagen 6	Muestra N° 1 (AP-1B)	<i>Acanthamoeba</i>
Imagen 7	Muestra N° 2 (AP-2B)	<i>Acanthamoeba</i>
Imagen 8	Muestra N° 3 (AP-3B)	<i>Acanthamoeba</i>
Imagen 9	Muestra N° 4 (AP-4B)	<i>Insertae sedis</i>

Tabla N° 3: Distribución de amebas de vida libre según tipo de muestra y lugar de recolección de muestra.

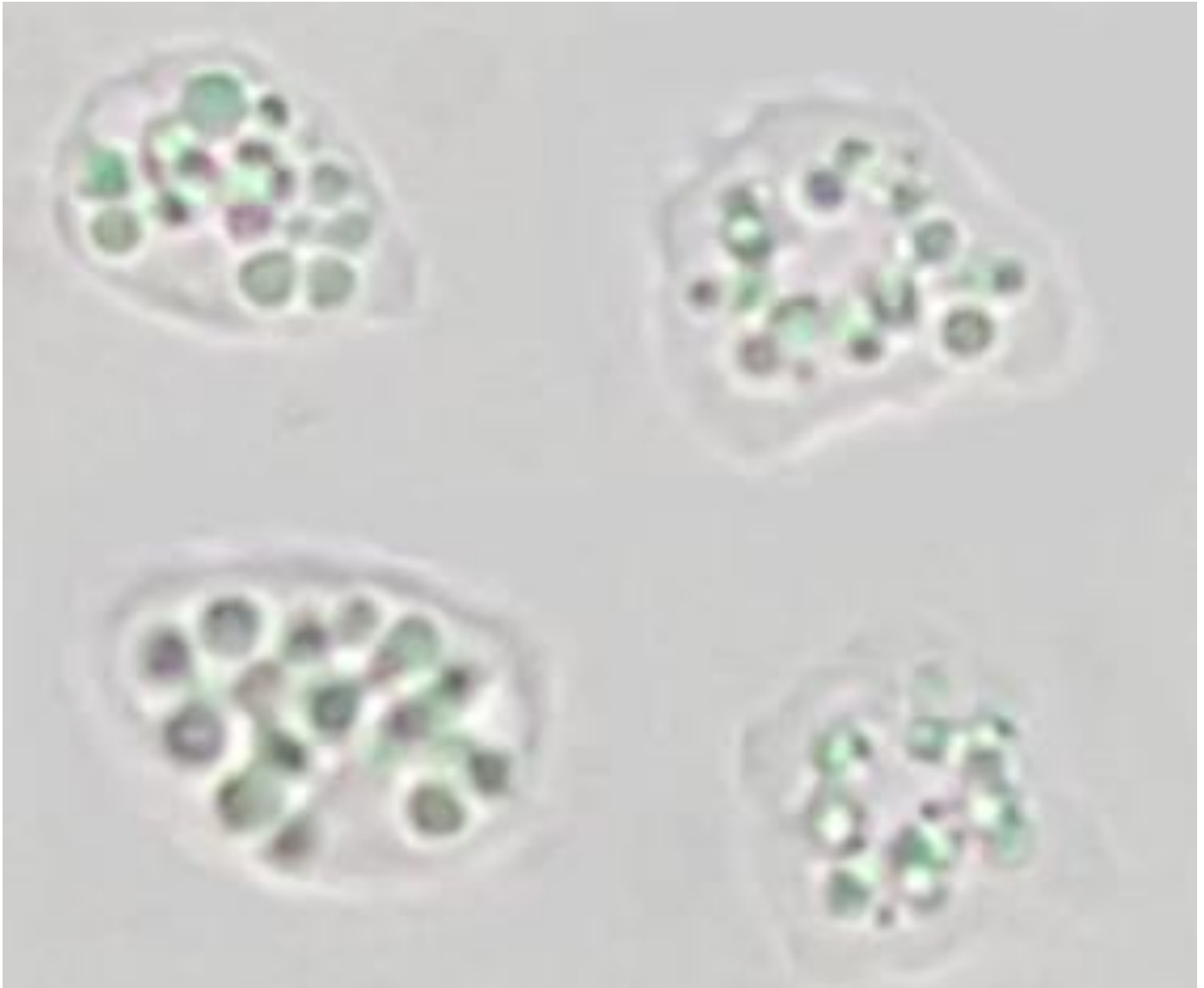
Lugar (Distrito)	Código	Tipo de muestra	Resultado
Parque Las Américas (Pueblo Libre)	MSP-1 (invierno 2017)	Suelo	<i>Insertae sedis</i>
	MSP-2 (invierno 2017)	Suelo	<i>Insertae sedis</i>
	MSP-3 (invierno 2017)	Suelo	<i>Insertae sedis</i>
	MSP-4 (invierno 2017)	Suelo	No hubo crecimiento
	MSP-5 (invierno 2017)	Suelo	No hubo crecimiento
	MAP-6 (invierno 2017)	Agua	<i>Insertae sedis</i>
Agua de Pileta (San Martín de Porres)	AP-1 (invierno 2017)	Agua	No hubo crecimiento
	AP-2 (invierno 2017)	Agua	No hubo crecimiento
	AP-3 (invierno 2017)	Agua	No hubo crecimiento
	AP-4 (invierno 2017)	Agua	<i>Vannella sp</i>
	AP-1b (invierno 2017)	Agua	<i>Acanthamoeba sp</i>
	AP-2b (invierno 2017)	Agua	<i>Acanthamoeba sp</i>
	AP-3b (invierno 2017)	Agua	<i>Acanthamoeba sp</i>
	AP-4b (invierno 2017)	Agua	<i>Insertae sedis</i>

Imagen 1:



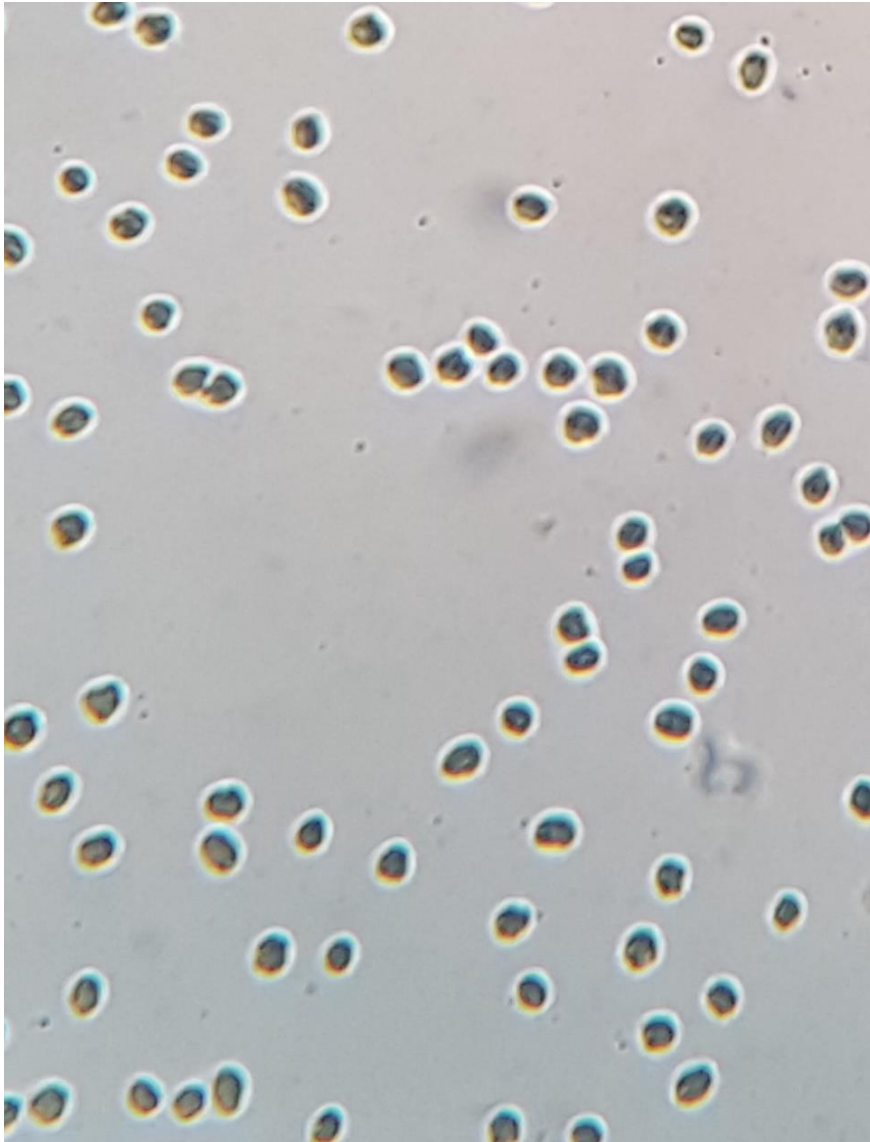
Cepa MSP-1: ameba de vida libre de 10 micras y morfología redonda a ovalada con bordes regulares, difícilmente se observa los pseudópodos, no se observó quiste.

Imagen 2



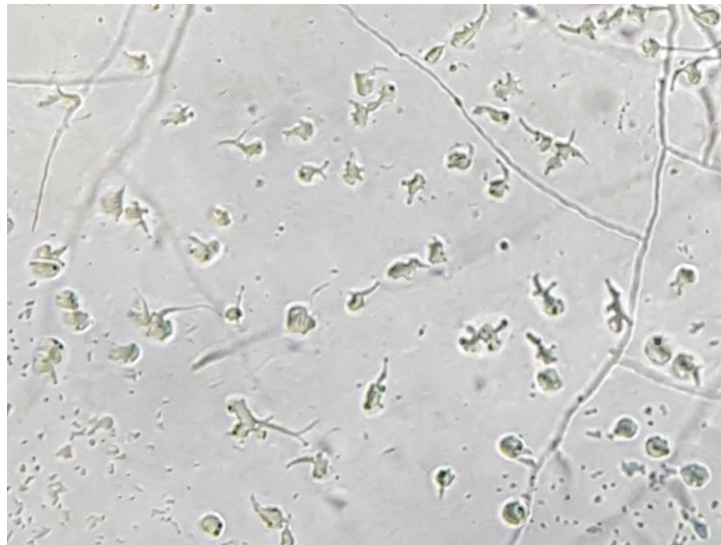
Cepa MSP- 2: ameba de vida libre de 20 – 40 micras con núcleo excéntrico y con múltiples granulaciones intracitoplasmáticas, de morfología ovalada, se observó pseudópodos muy cortos, no forman estadio de quiste. A una temperatura prolongada de 37°C, se lisan.

Imagen 3

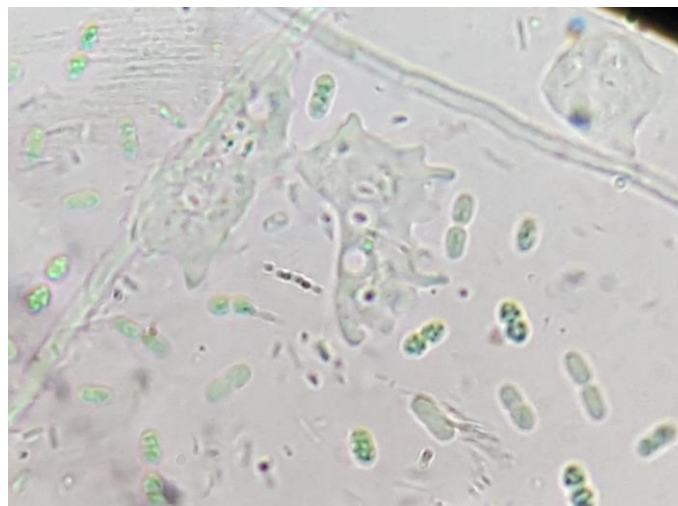


Cepa MSP- 3: ameba de vida libre de 10 micras y morfología redonda a ovalada con bordes regulares, difícilmente se observa los pseudópodos, no se observó quiste. MSP-1/ MSP-3; al parecer son las mismas cepas.

Imagen 4

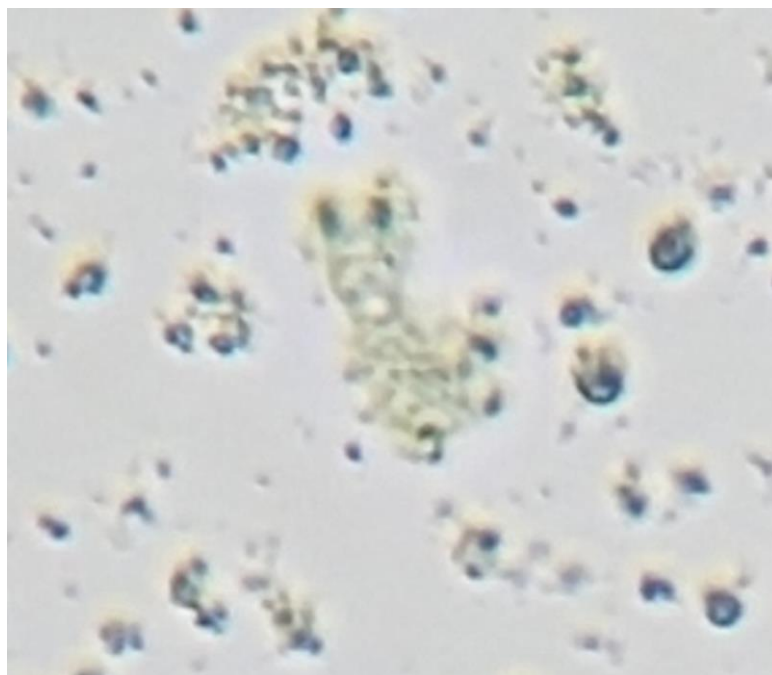
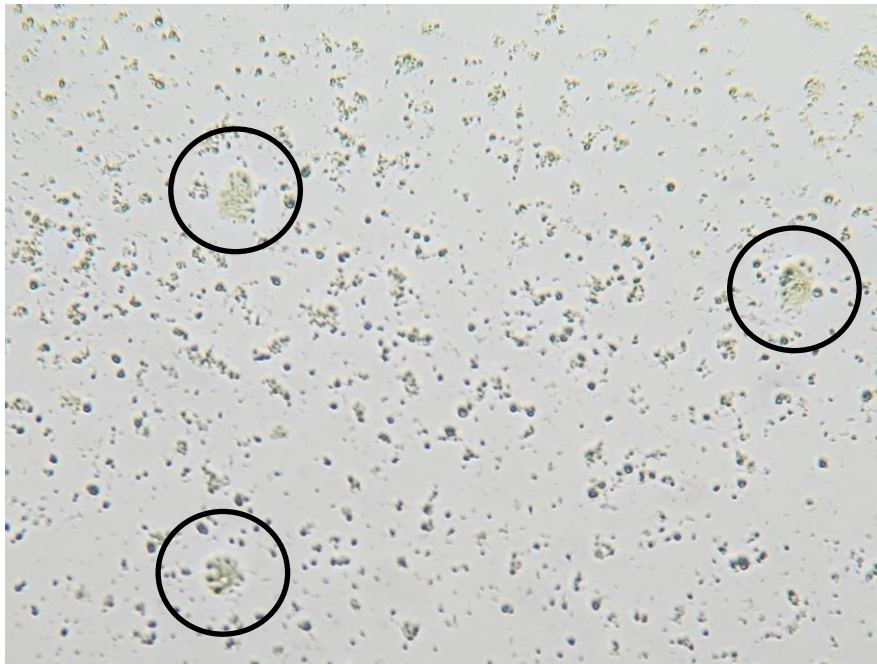


Ceba MSP-6: la muestra aislada del agua del parque. Morfología irregular / pleomórfica, con bordes irregulares, prolongaciones citoplasmáticas muy extensas. En algunos organismos se observa el núcleo central, se evidencio el estadio de quiste. Hubo unas limitaciones en su alimentación, guardaba una estrecha relación con una bacteria de morfología diplobacilar Gram negativa, la colonia bacteriana era de aspecto mucoso y de rápido crecimiento. La temperatura de incubación fue de 19-22°C. Se pudo observar que sometido a un tiempo prolongado a 37°C se lisaban totalmente.



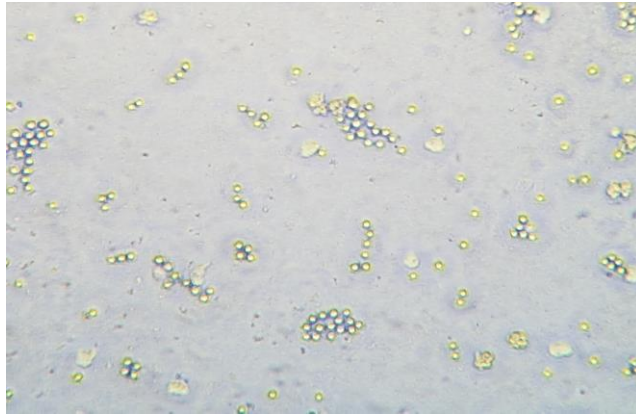
Ceba MSP-6: observada a 1000x. Se observa una estructura amebode emitiendo sus prolongaciones citoplasmáticas en forma de dedo y cambiando de forma constantemente. A su alrededor se pueden apreciar levaduras e hifas, que posiblemente constituye parte de su dieta en el medio ambiente.

Imagen 5:



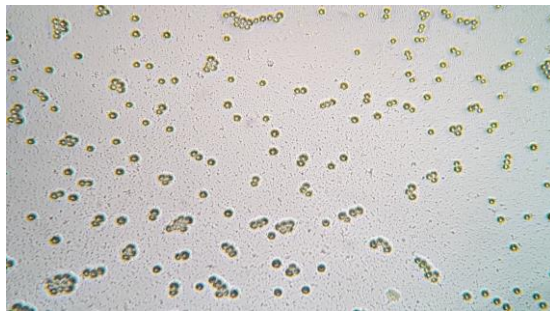
Cepa AP-4: Amebas de vida libre en forma de abanico y alargada con ausencia de pseudópodos. Con núcleo y vacuola central, motilidad limitada, de crecimiento rápido (48hras). Esta ameba se identificó morfológicamente con el género *Vannella*.

Imagen 6:



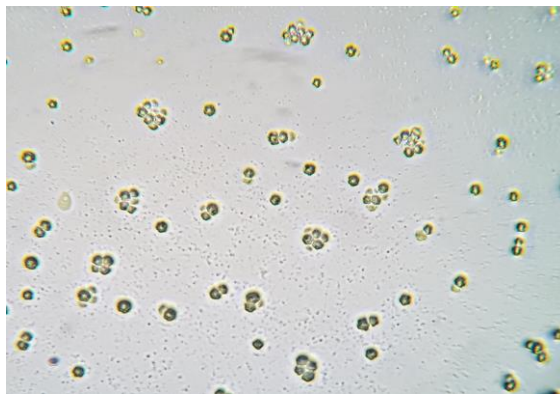
Cepa de *Acanthamoeba* AP-1B: Se observan los quistes agrupados.

Imagen 7:



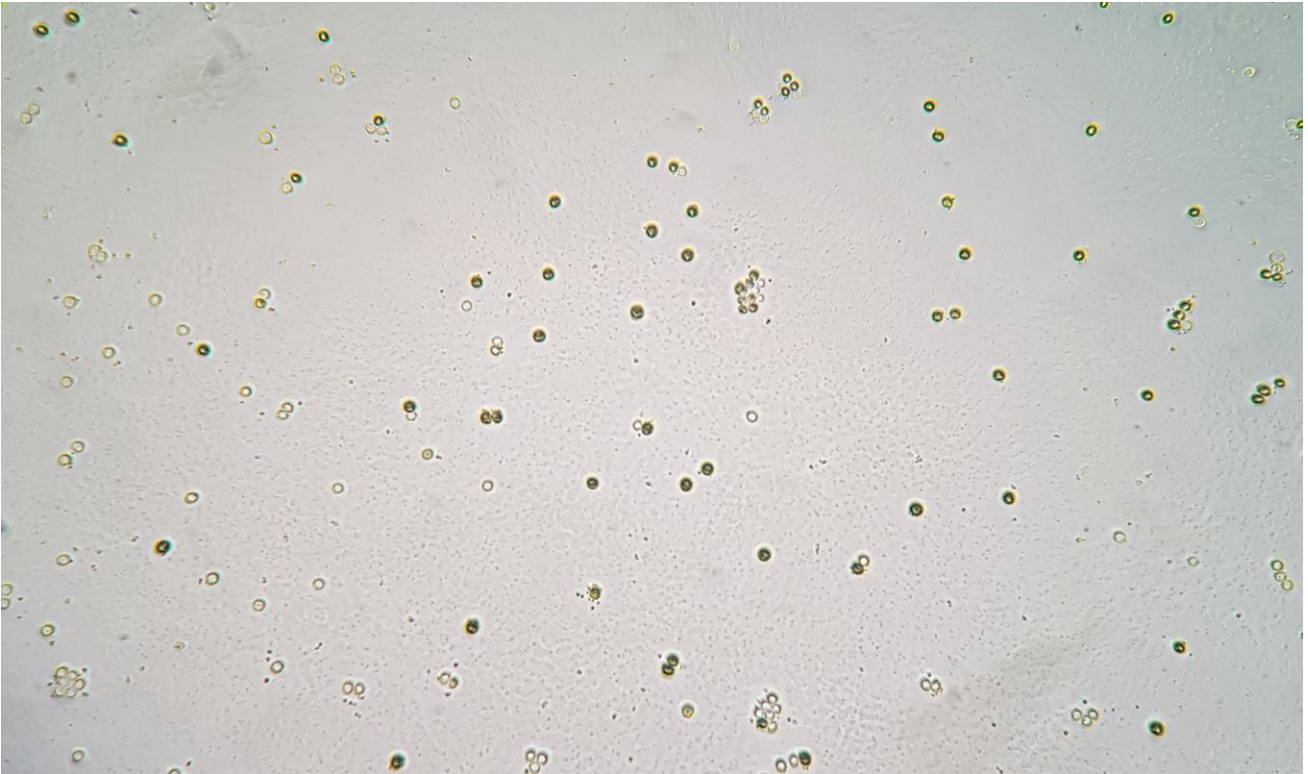
Cepa de *Acanthamoeba* AP-2B: Se observan los quistes agrupados

Imagen 8:



Cepa de *Acanthamoeba* AP-3B: Se observan los quistes agrupados

Imagen 9:



Cepa AP-4B: se observan quistes redondos y lisos de bordes bien definidos, estas estructuras pertenecen a una especie de ameba de gran tamaño que emite pseudópodos de aproximadamente 5 – 10 μm , poseen baja motilidad y se reproducen lentamente. Se enquista muy rápido.