



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

Facultad de
MEDICINA

**AISLAMIENTO DE *ACANTHAMOEBA SP. Y*
BALAMUTHIA MANDRILLARIS EN TIERRA
COMERCIAL EN UN SUPERMERCADO DE LIMA**

**ISOLATION OF *ACANTHAMOEBA SP. Y*
BALAMUTHIA MANDRILLARIS FROM
COMMERCIAL SOIL FROM A SUPERMARKET IN
LIMA**

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE LICENCIADO EN TECNOLOGÍA MÉDICA EN LA
ESPECIALIDAD DE LABORATORIO CLÍNICO

ALUMNO(S):

FERNANDO DE JESUS FERNANDEZ COSTILLA

KATHYA LINETTE MIMBELA BARRERA

ASESOR:

ALFONSO MARTIN CABELLO VILCHEZ

LIMA - PERÚ

2021

JURADO

Coordinador del Jurado : Dr. Jesús Humberto Tamariz Ortiz

Profesor calificador : Dra. Maritza Mercedes Calderón Sánchez

Profesor calificador : Mg. Steev Orlando Loyola Sosa

Fecha de sustentación : 15 de junio de 2021

Calificación : Aprobado

ASESOR DE TESIS

ASESOR

Dr. Alfonso Martín Cabello Vílchez MSc, PharmD, PhD

Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt

Laboratorio de Protozoarios y Endosimbiontes Patógenos

ORCID: 0000-0003-2284-6042

DEDICATORIA

Dedicamos esta tesis a nuestros padres porque son nuestra inspiración y el esfuerzo y metas alcanzadas reflejan el amor que nos brindado día con día.

Agradecemos a nuestro asesor de tesis quien con su experiencia, conocimiento, motivación y paciencia nos ha guiado de manera excepcional a lo largo de esta investigación.

AGRADECIMIENTOS

A nuestros docentes que con sabiduría, ejemplo y apoyo nos motivan a desarrollarnos personal y profesionalmente.

A la Universidad Peruana Cayetano Heredia por las oportunidades brindadas.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El presente estudio ha sido autofinanciado por el Laboratorio de Protozoarios y Endosimbiontes Patógenos (LPEP) del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt y por los investigadores.

DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERÉS

Los autores declaran que no hay conflictos de intereses potenciales con respecto a la investigación, autoría y/o publicación del presente estudio.

TABLA DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	5
2.1. Diseño de estudio	5
2.2. Población.....	5
2.3. Muestra	5
2.4. Procedimientos y técnicas.....	5
2.4.1. Aislamiento de AVL.....	5
2.4.2. Uso de las claves de identificación morfológica.....	6
2.4.3. Extracción de ADN	6
2.4.4. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	7
2.4.5. Análisis estadístico	8
3. RESULTADOS	9
3.1. Aislamiento de amebas de vida libre por cultivo.....	9
3.2. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	9
4. DISCUSIÓN	10
5. CONCLUSIONES	19
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
7. TABLAS Y FIGURAS.....	27

RESUMEN

Antecedentes: Los altos índices de letalidad en casos de infecciones humanas causadas por amebas de vida libre y su papel como reservorio de microorganismos patógenos ha impulsado su identificación en ambientes como la tierra. Actualmente, se utilizan insumos para preparación de sustratos de plantas ornamentales en jardinería siendo la tierra de chacra uno de los más empleados porque puede mezclarse con otros materiales denominándose “mezclas de tierra”. Esta tierra comercial es distribuida en nuestro país. **Objetivo:** Aislar e identificar *Acanthamoeba spp.* y *Balamuthia mandrillaris* a partir de muestras de tierra comercial de un supermercado de Lima obtenidas en el mes de agosto del año 2019. **Diseño de estudio:** Se realizó un estudio tipo observacional descriptivo transversal. **Materiales y métodos:** Se utilizaron 30 bolsas con tierra comercial, las muestras de tierra obtenidas de cada bolsa se sembraron en Agar No Nutritivo (ANN) enriquecido con *Escherichia coli* ATCC 25922, la identificación de amebas de vida libre se realizó por PCR de los cultivos positivos. **Resultados:** Se aisló *Acanthamoeba spp.* y una ameba sugerente del género *Vahlkampfia* en el 66,7% (20/30) y 3,3% (1/30) de muestras de tierra comercial, respectivamente. No se aisló *Balamuthia mandrillaris*. **Conclusiones:** Se identificaron amebas potencialmente patógenas en tierra comercial distribuida en un supermercado en Lima Metropolitana siendo las amebas del género *Acanthamoeba* las más frecuentes. **Palabras clave:** *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, suelo.

ABSTRACT

Background: The high lethality rates in cases of human infections caused by free-living amoebae and their role as pathogenic microorganisms prompted their identification in environments such as soil. Currently, inputs are used to prepare substrates of ornamental plants in gardening, being farmland soil one of the most used because it can be mixed with other materials called "soil mixtures". This commercial soil is distributed in our country. **Objective:** To isolate and identify *Acanthamoeba spp.* and *Balamuthia mandrillaris* from samples of commercial soil from a supermarket in Lima obtained in August 2019. **Study design:** A cross-sectional descriptive observational study was conducted. **Material and methods:** 30 bags with commercial soil were used, each soil sample from bags was sowed on Non-Nutrient Agar (ANN) enriched with *Escherichia coli ATCC 25922*, the identification of free-living amoebae was performed by PCR of the positive isolates. **Results:** *Acanthamoeba spp.* and one suggestive amoeba of the genus *Vahlkampfia* were isolated from 66.7% (20/30) and 3.3% (1/30) of commercial soil samples, respectively. *Balamuthia mandrillaris* was not isolated. **Conclusions:** The presence of potentially pathogenic amoebae in commercial soil distributed in a supermarket of Lima was evidenced, being the amoebae genus *Acanthamoeba* the most frequent. **Keywords:** *Acanthamoeba*, *Balamuthia mandrillaris*, soil.

1. INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre (AVL) son microorganismos protistas eucariotas. Una nueva clasificación taxonómica revisada en el 2012, basada en filogenia molecular, clasifica a los eucariotas en supergrupos: *Amoebozoa*, *Opisthokonta*, *SAR* (*Stramenopiles*, *Alveolata*, *Rhizaria*), *Archaeplastida* y *Excavata*; en los cuales encontramos a la mayoría de AVL en los supergrupos *Amoebozoa* y *Excavata* (1).

Las AVL patógenas penetran a través de las vías respiratorias y piel ulcerada o heridas causando lesiones a nivel de Sistema Nervioso Central (2). *Acanthamoeba* spp. y *Balamuthia mandrillaris* provocan Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG); no obstante, *Acanthamoeba* spp. genera otras tres entidades clínicas como queratitis amebiana, rinosinusitis y acantamebiasis diseminada que es común en pacientes inmunosuprimidos y/o con VIH/SIDA (2-4).

Król-Turmińska, et al. informa que cerca de 200 casos de EAG han sido causados por *Balamuthia mandrillaris* y más de 150 casos por *Acanthamoeba* spp. con tasas de letalidad de 90 – 94%; asimismo, menciona más de 3000 casos de infecciones oculares por *Acanthamoeba* spp. (4). Solamente se ha reportado un caso de Encefalitis Amebiana por *Sappinia pedata* por Gelman, et al. en el 2001 (5); sin embargo, se ha encontrado *Sappinia* spp. en tierra, agua y heces de animales en Europa, Norteamérica, Egipto, Japón, Medio Oriente e India Occidental (3,4). Cabello-Vílchez, et al. mencionan que hasta 2013 se reportaron 177 casos de infecciones por *Balamuthia mandrillaris* a nivel del mundo de los cuales 153 pertenecen al continente americano (6). En Perú se han descrito 55

casos de EAG por *Balamuthia mandrillaris* hasta el 2011 en los departamentos de Piura, La Libertad, Lima e Ica (7).

En el tratamiento de infecciones causadas por AVL se utilizan fármacos como anfotericina B, fenotiazinas, rifampicina, macrólidos, pentamidina, sulfadiazina, 5-flucitosina, azoles y miltefosine (4). Sin embargo, el diagnóstico temprano es esencial para la eficacia del tratamiento (6). Asimismo, la información que brinda la historia clínica y conocer los ambientes a los que estuvo expuesto el paciente son datos claves para el diagnóstico de laboratorio y tratamiento de manera adecuada e inmediata; ya que, muchas de las enfermedades causadas por AVL suelen desencadenarse por contacto directo de una persona susceptible con estos microorganismos que se encuentran en diversos ambientes (3,4,6).

Si bien algunas AVL pueden causar infecciones en el ser humano de manera directa, se ha evidenciado el papel potencial de las AVL como reservorio de patógenos humanos (8). Siddiqui, et al. en su artículo de revisión mencionan que *Acanthamoeba spp.* puede albergar bacterias, hongos, virus y otros protistas (3). Barker, et al. evidencian la interacción dinámica entre *Escherichia coli* O157:H7 y *Acanthamoeba polyphaga* y sugiere que la no disminución de las poblaciones procariotas frente a procesos de tratamiento podría deberse a la internalización de estos microorganismos en las AVL (8). Asimismo, las bacterias pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a estresores ambientales como demuestra Lambrecht, et al. , quienes evaluaron ocho estresores físicos y químicos frente a quistes de *Acanthamoeba castellanii*, cepas únicas de monocultivos bacterianos, bacterias intraquísticas y bacterias después del pasaje intraquístico (bacterias liberadas del quiste) y concluyeron que las bacterias intraquísticas

fueron más tolerantes a factores estresantes en comparación a los monocultivos bacterianos que fueron sensibles a todos los tratamientos físicos y químicos (9).

Respecto a la presencia de patógenos humanos en tierra, Brevik et al, recalcan a *Acanthamoeba spp.* como un protista patógeno que se encuentra en tierra causante de EAG, así como, queratitis amebiana de distribución mundial y se reconoce su papel como reservorio de microorganismos patógenos como *Legionella spp.* (10). Schuster menciona que, por razones desconocidas, es probable que amebas del género *Acanthamoeba*, más que otras AVL presentes en tierra, alberguen bacterias endosimbióticas; asimismo, refieren que estos endosimbiontes detectados en *Acanthamoeba spp.* son de considerable interés (11).

En los hábitats terrestres existe diversidad de especies de AVL, Mrva, et al., muestran la biodiversidad de la microfauna en muestras de hojarasca y musgo recolectados en bosques de Bratislava e identificaron 25 especies pertenecientes a las familias *Amoebidae*, *Hartmannellidae*, *Leptomyxidae*, *Vermamoebidae*, *Paramoebidae*, *Vannellidae*, *Mayorellidae*, *Dermamoebidae*, *Thecamoebidae*, *Acanthamoebidae* y *Filamoebidae* (12).

En nuestro país, existe una gran preocupación por la preservación de áreas verdes e incluso las actividades de jardinería son realizadas ampliamente por diferentes personas como parte de su rutina diaria o debido al aumento en la demanda de plantas ornamentales en viveros públicos y privados (13). Por ello, con el fin de realizar actividades de jardinería se utilizan insumos para la preparación de sustratos los cuales son distribuidos comercialmente (14). Un sustrato es un material sólido que puede ser de origen natural, sintético, residual, orgánico o mineral en forma pura o en mezcla que permite el anclaje de las raíces y

proporciona nutrientes para facilitar el óptimo desarrollo de la planta dentro del espacio limitado en el que se encuentre como macetas, jardineras y bolsas (15); además debe contar con propiedades físicas, químicas y biológicas determinadas para este fin (13).

Existen insumos para la preparación de sustratos como aserrín, compost, turba, estiércol, musgo y la tierra de chacra, los cuales son los más empleados para la obtención de plantas ornamentales en el Perú (13, 16). La tierra de chacra es uno de los insumos más abundantes ya que se extrae de campos de cultivo y es el que se mezcla de forma más frecuente con otros materiales para elaborar sustratos que se emplean en jardinería (15). Estas actividades de jardinería pueden llevarse a cabo dentro de los hogares, donde las personas están expuestas (17, 18) y cuya adquisición de infecciones dependerá de factores de riesgo como su sistema inmunológico debilitado, enfermedades subyacentes, embarazo, desnutrición, alcoholismo, uso excesivo de esteroides y antibióticos (4, 19).

Debido a los altos índices de letalidad en los casos descritos por AVL, es necesario identificarlas en ambientes donde los seres humanos estén expuestos (4). Además, de su capacidad patogénica, poseen un rol como reservorio de bacterias, hongos, virus y otros protistas (3). La patogenicidad de estos microorganismos ha impulsado la necesidad de identificar estas AVL y sus posibles simbiosis (8). Por lo mencionado anteriormente, se realizó el presente estudio con el objetivo de aislar e identificar *Acanthamoeba spp.* y *Balamuthia mandrillaris* en muestras de tierra comercial utilizadas para la preparación de sustratos de plantas ornamentales de un supermercado de Lima Metropolitana en agosto del año 2019.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Diseño de estudio

El estudio realizado fue de tipo observacional descriptivo transversal.

2.2. Población

Para el presente estudio la población estuvo constituida por los terrenos de cultivo aledaños a Lima Metropolitana de la empresa “4 estaciones” de donde se extrae la tierra para preparar sustrato agrícola y tierra de jardinería.

2.3. Muestra

La muestra para nuestro estudio fue una porción de ese terreno de cultivo aledaño a Lima metropolitana perteneciente a la empresa “4 Estaciones” del cual proviene la producción de bolsas con tierra comercial que se vende en los supermercados de Lima Metropolitana. Para el presente estudio utilizamos solo 30 bolsas de esa tierra comercial disponibles para venta al público que fueron adquiridas en el supermercado en un día del mes de agosto del año 2019. Se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia.

2.4. Procedimientos y técnicas

2.4.1. Aislamiento de AVL

De cada bolsa de tierra comercial se recolectó una muestra de tierra con un hisopo de algodón estéril humedecido con Solución Salina para Amebas de Page (Page’s Amoeba Saline Solution), se sembró en forma de toques en 5 posiciones distintas en toda la placa Petri con Agar No Nutritivo (ANN) cubriendo la superficie del agar con una suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 según lo descrito por Page (20). Las placas fueron examinadas cada 48 horas por microscopía óptica para evaluar el crecimiento de AVL (trofozoitos o quistes). Luego, se llevó a cabo

el método de migración para clonar amebas descrito por Page (20) el cual consiste en extraer fragmentos de agar de la zona de crecimiento de AVL y transferirlos sucesivamente a nuevas placas con ANN que se conservaron a temperatura ambiente. Este proceso se llevó a cabo de 8 a 10 repeticiones en virtud de coger quistes o trofozoítos para conseguir cultivos con crecimiento homogéneo de AVL sin contaminación. Para *Acanthamoeba spp.* el tiempo de crecimiento es corto, entre 1 día hasta 14 días (19). En el caso del aislamiento para *Balamuthia mandrillaris* su crecimiento varía entre 30 – 50 días por cada cultivo (21,22). Así se le dio el tiempo necesario para su crecimiento como está establecido en los estudios de Schuster, et al. (18) y Cabello-Vílchez, et al. (21). Se cumplieron todas las condiciones para aislar *Acanthamoeba spp.* y *Balamuthia mandrillaris*.

2.4.2. Uso de las claves de identificación morfológica

Se emplearon las claves de identificación morfológica para AVL con el fin de establecer parámetros que ayuden a describir y comparar géneros de AVL del medio ambiente. Las principales claves de identificación morfológica fueron: Page (20), Page, et al. (23) y Smirnov, et al. (24). La información recolectada de la caracterización morfológica fue documentada mediante fotografías.

2.4.3. Extracción de ADN

Antes de llevar a cabo la extracción de ADN, se siguieron los procedimientos descritos por Astorga (25). Al conseguir cultivos con crecimiento homogéneo y sin contaminación, se agregó Solución Salina para Amebas de Page, con el propósito de resuspender trofozoítos y quistes en la placa con ANN. Este procedimiento consiste en agregar Solución Salina para Amebas de Page con una pipeta Pasteur a cada placa con cultivos de AVL hasta cubrir la superficie del agar

y dejar reposar durante 30 minutos. Luego, raspar la superficie del agar con el asa de siembra para remover quistes y trofozoítos. Como siguiente paso, se debe traspasar la Solución Salina para Amebas de Page con quistes y trofozoítos a un tubo Falcon de 15 ml y centrifugar. Finalmente, decantar el sobrenadante y conservar el pellet. Terminado este paso se puede realizar la extracción de ADN, la cual se llevó a cabo usando el kit de extracción: GeneJET™ Genomic DNA Purification Kit.

2.4.4. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Dependiendo de la identificación de AVL en los cultivos, se llevó a cabo la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para confirmar que los aislamientos caracterizados morfológicamente pertenecían al género *Acanthamoeba*, se realizó la técnica de PCR. Se siguió el protocolo empleado en el Laboratorio de protozoarios y endosimbiontes patógenos del Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt (IMT-AvH) para identificación de *Acanthamoeba spp.* por PCR. La mezcla de reacción para un volumen final de reacción de 50 µl se preparó con 25 µl PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific) (1.25 U de Taq ADN polimerasa, buffer de reacción, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM de cada dNTP), 0.3 µM de cada cebador, 10pg - 1µg de ADN templado y se completó con agua libre de nucleasas para 50 µl de volumen final. La técnica de PCR se realizó en el termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific). Para el estudio, se utilizaron los cebadores JDP1 y JDP2:

- **Cebadores o primers específicos para *Acanthamoeba spp.* (26)**
- JDP1 : 5' – GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA – 3'

- JDP2 : 3' – TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA – 5'

Los cebadores JDP1 y JDP2 amplificaron una región de 423 - 551 pb del gen ARNr 18S correspondiente a la región ASA.S1 (*Acanthamoeba Specific Amplimer*) que incluía el Fragmento de Diagnóstico 3 (DF3) (26).

Los fragmentos de ADN amplificados fueron separados en gel de agarosa al 1% con Tris-Acetato-EDTA (TAE) (Panreac Applichem) empleando Gel Loading Dye Blue (6X) (Thermo Fisher Scientific) en electroforesis a 90 voltios durante 40 minutos. Los fragmentos de ADN amplificados se revelaron en el transiluminador Chemi-Doc (Biorad) con el software ImageLab. Se empleó como control positivo una cepa de *Acanthamoeba sp.* genotipo T4 secuenciado por Macrogen. El tamaño del ADN se verificó con Plus Opti-DNA Marker 100 bp (Applied Biological Material Inc.) obteniendo productos de PCR de aproximadamente 500 pb.

2.4.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron registrados en una base de Excel. Las variables del presente estudio fueron de naturaleza cualitativa nominal; por tanto, el análisis de estos datos se llevó a cabo mediante tablas de frecuencia.

3. RESULTADOS

3.1. Aislamiento de amebas de vida libre por cultivo

Se evaluaron 30 muestras de tierra comercial correspondientes a 10 muestras de tierra preparada, 10 muestras de tierra de chacra, 10 muestras de tierra de almacigo (Ver Tabla N°1). De las 30 muestras (100%) de tierra comercial, se aislaron AVL en 20 de ellas (66,7%) las cuales fueron 8 muestras de tierra preparada, 6 de tierra de chacra y 6 de tierra de almacigo (Ver Tabla N°2). Asimismo, de esas 20 muestras de tierra comercial en las cuales se identificaron AVL, se aisló *Acanthamoeba spp.* y otro tipo de ameba sugerente del género *Vahlkampfia* (Figuras N°1, N°2, N°3, N°4).

3.2. Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los 20 cultivos de *Acanthamoeba spp.* fueron sometidos a PCR, obteniendo resultados positivos para esta técnica. Esto nos confirmó el género de la ameba; por consiguiente, la PCR ha sido una herramienta útil para confirmar la morfología (Ver Figura N°5-A y Figura N°5-B). No se realizó la PCR para confirmar el aislamiento de la ameba sugerente al género *Vahlkampfia* pues el objetivo del estudio pretendía aislar e identificar *Acanthamoeba spp.* y *Balamuthia mandrillaris*; además, no se disponía de los cebadores universales para eucariotas y así llevar a cabo la técnica molecular para esta AVL. Sin embargo, mediante las claves de identificación de Page, et al. (23) fue posible establecer la familia de la ameba por el morfotipo.

4. DISCUSIÓN

La tierra sirve como reservorio de múltiples patógenos humanos y sus vectores asociados, tal como lo mencionan Brevik, et al., quienes reiteran la importancia de la tierra para la salud humana como un planteamiento aceptado por la comunidad científica y añaden que la contaminación química, la presencia de microorganismos y macroorganismos en tierra, así como, los suministros de nutrientes presentes en ella debe considerarse como determinantes claves que influyen en la salud humana (10).

En el presente estudio se aislaron AVL en el 66,7% (20/30) del total de muestras de tierra comercial utilizada para la preparación de sustratos de plantas ornamentales de las cuales se identificó *Acanthamoeba spp.* en todas ellas, tal como evidencian los resultados anteriormente expuestos. Asimismo, el aislamiento de amebas del género *Vahlkampfia* en uno de los cultivos también es importante; ya que, no solamente *Acanthamoeba spp.* provoca queratitis amebiana, sino que hay estudios previos que sugieren que los géneros de AVL como *Vahlkampfia* y *Hartmanella* pueden causar queratitis amebiana en simbiosis (27). Si bien no hay estudios realizados donde evalúan de manera directa las bolsas con tierra comercial, este porcentaje es comparable con otros estudios en los cuales se ha identificado amebas del género *Acanthamoeba* en muestras de tierra; por ejemplo, en Sudamérica, Pertuz, et al. y Wagner, et al. establecen una frecuencia de 66,6% y 51,8% de *Acanthamoeba spp.* en sus muestras de tierra correspondientes a áreas recreativas y áreas pobladas por comunidades indígenas, respectivamente (28,29). En otras regiones del mundo, la presencia de

Acanthamoeba ha variado desde un 30,1% y 31,3% en Irán (30,31), 62,5% en la isla de Gran Canaria (32) y un 63,9% en Jamaica (33).

Los porcentajes de aislamiento del género *Acanthamoeba* en tierra de los estudios de Pertuz, et al. (28), Reyes, et al. (32) y Todd, et al. (33) son cercanos al obtenido en el presente estudio, a pesar de que, los tamaños muestrales empleados en los dos primeros son pequeños comparados al de Todd, et al. (33). Estos trabajos no describen en detalle el muestreo empleado. Asimismo, podemos observar un menor porcentaje de aislamiento de *Acanthamoeba spp.* en los trabajos de Pazoki, et al. (30) y de Meighani, et al. (31) respecto a los demás estudios. Existe evidencia que demuestra que las AVL responden a los cambios abióticos (3,19,23). Los periodos estacionales pueden albergar diferente biota en distintos periodos del año (34). Esto podría explicar las diferencias en el porcentaje de aislamiento de *Acanthamoeba spp.* en los trabajos de Pazoki, et al. y Meighani, et al. respecto a los demás estudios; ya que, la zona geográfica de Pakdasht y Markazí en Irán donde se recolectaron las muestras de tierra tienen clima seco (30,31), mientras que las zonas de recolección correspondientes a los otros estudios ya mencionados se caracterizan por tener climas con altas concentraciones de humedad y altas temperaturas (28,29,32,33). Estos trabajos corroboran lo descrito por Rodríguez-Zaragoza, et al. en el cual aislaron un mayor número de AVL en temporada húmeda respecto a temporadas con condiciones climáticas secas y se menciona que la presencia de AVL en tierra está influenciada por el contenido de humedad, el carbono orgánico y la textura de la tierra (34). Los sustratos utilizados en jardinería facilitan las condiciones óptimas para el desarrollo de la semilla y posteriormente de la planta (16). En este caso, la

tierra de chacra al mezclarse con musgo y compost genera sustratos que aumentan la retención de humedad del producto (13), sabiendo esto, es posible predecir el hallazgo de algunas especies de AVL. Por lo tanto, es importante establecer la composición de la tierra, puesto que este dato permitiría seleccionar la mejor tierra para los jardines de cultivo y evitar alguna exposición en los casos futuros.

Mondragón menciona que la tierra de chacra se extrae de campos de cultivo (15). Del mismo modo, otros insumos utilizados como sustratos se obtienen de zonas altoandinas (16). En el presente estudio, se adquirieron tres tipos de tierra comercial: tierra de chacra, tierra preparada y tierra de almacigo; lo cuales tienen como insumo en común la tierra de chacra que proviene de terrenos de cultivo aledaños a Lima Metropolitana, según la ficha técnica del producto (35); por lo tanto, el aislamiento de AVL en la tierra comercial podría estar relacionado con el lugar de origen de la tierra de chacra (30,36) que se empleó para la elaboración del producto comercial en nuestro estudio; ya que, hay trabajos que demuestran la presencia de AVL en tierra de cultivo como los realizados por Pazoki, et al. y Cruz en los cuales aislaron amebas del género *Acanthamoeba* y otras AVL como *Vermamoeba vermiformis*, *Thecamoeba spp.* y *Naegleria Canariensis* (30,36). Asimismo, es importante recalcar que este proceso de elaboración del sustrato incluye una serie de pasos intermedios como el zarandeo de componentes para extraer piedras o elementos ajenos a la tierra; mezcla de componentes zarandeados; desinfección del sustrato para eliminación de huevos y larvas de insectos, nematodos, hongos y semillas de maleza; envasado y transporte hasta el punto de venta en el cual se adquiere un sustrato en una bolsa sellada (15,37). Sin

embargo, a pesar de emplear métodos físicos o químicos para desinfección, hemos podido aislar e identificar AVL en tierra comercial, en el presente estudio.

A nivel mundial, existen legislaciones que regulan el mercado de productos fertilizantes, abonos y sustratos de cultivo en los cuales se menciona como uno de los requisitos de este tipo de productos que no sean portadores de plagas y/o agentes patógenos causantes de enfermedades (13,14). Respecto al marco normativo de nuestro país, existen normas técnicas acerca de la clasificación y requisitos de estos insumos; no obstante, estas legislaciones no mencionan a las AVL dentro de los límites microbiológicos de este tipo de productos (38). Los estudios sobre AVL en tierra en Perú y Sudamérica son escasos (6). Si bien hay casos clínicos sobre infecciones por AVL, en ellos rara vez se establece el posible origen de infección. EE. UU y Perú reportan el mayor número de casos de infección por AVL en el continente (6,21). Muchos pacientes reportan haber estado en contacto con tierra (17,18); por tanto, este hecho debe ser considerado y analizado en profundidad debido a que la tierra puede albergar AVL potencialmente patógenas (10). Si bien se requieren más investigaciones, las legislaciones deberían considerar la presencia de estos microorganismos en este tipo de productos elaborados con tierra porque la exposición a estas AVL potencialmente patógenas podría causar infecciones de manera directa y actuar a la vez como reservorio de otros patógenos humanos evitando su disminución frente a procesos de tratamiento debido a su internalización dentro de las AVL (8).

En el presente estudio, el medio de cultivo empleado permitió la recuperación de AVL de manera adecuada (19). En el trabajo de Mrva, et al. evaluaron la

eficiencia de seis medios de cultivo para el aislamiento de veinticuatro especies de AVL (39). El ANN con una suspensión de *Escherichia coli* ATCC 25922 continúa siendo el más empleado en estudios de aislamiento de AVL en muestras ambientales y muestras clínicas debido a la facilidad de preparación y posibilidad de la axenización (18,21,22,27,28,29,30,31,32,33,36,39). Interesantemente, poca información acerca de los requerimientos nutricionales en condiciones de laboratorio se ha logrado establecer para *Acanthamoeba spp.* y *Balamuthia mandrillaris*, lo cual es motivo para futuras investigaciones (3,19,39,40). Sin embargo, en un estudio realizado por Weekers, et al. emplearon diez cepas bacterianas para evaluar las preferencias nutricionales de *Acanthamoeba spp.*; estos autores demostraron que *Escherichia coli* y *Enterobacter aerogenes* vivas fueron mejores fuentes nutricionales frente a las demás cepas bacterianas evaluadas (40). También pueden emplearse levaduras y protozoos como sustrato de alimento, pero su uso suele ser problemático debido a su compleja preparación, prolongados períodos de crecimiento y difícil eliminación para obtención de cultivos axénicos (19). Por otro lado, cuando el número de amebas en las placas con ANN es inferior al esperado podría deberse a que el sustrato bacteriano no es el adecuado y las amebas evitan consumirlo debido a la capacidad de algunas bacterias propias de la tierra en producir pigmentos tóxicos que dañan estructuras importantes de la membrana, de esta manera, la recuperación de *Acanthamoeba spp.* se ve disminuido por estas bacterias que causan toxicidad (40). En nuestro estudio no hemos observado estos fenómenos. La importancia de un medio de cultivo con un sustrato de alimento adecuado permitieron que nuestras cepas

hayan sido axenizadas eficientemente. Este proceso es importante para futuros estudios bioquímicos y moleculares.

Si bien las claves de identificación morfológica son necesarias para el aislamiento de AVL, la fuerza iónica del medio puede afectar la forma de las paredes del quiste de *Acanthamoeba spp.* y otras AVL en algún grado reduciendo la fiabilidad de la morfología del quiste para la identificación de género (26). Sin embargo, los morfotipos ya se han establecido y al día de hoy existen 19 (24). La ameba sugerente al género *Vahlkampfia* hallada en nuestro estudio es compatible con el morfotipo monotáctico que corresponde a la familia *Vahlkampfiidae*, con este morfotipo se suele optar por la especie más parecida al morfotipo clásico el cual es sugerente a *Vahlkampfia spp.* Durante la evaluación de los cultivos de AVL se observó la pared interna de los quistes de *Acanthamoeba spp.* con forma poligonal y estrellada (20,23,24); no obstante, era necesario llevar a cabo la técnica de la PCR mediante la utilización de cebadores JDP1 y JDP2 que permitió la amplificación de la región ASA.S1 o Amplicón Específico de *Acanthamoeba* para confirmar que las AVL evaluadas por criterios morfológicos correspondían al género anteriormente mencionado.

Balamuthia mandrillaris tiene una tasa de crecimiento lento de aproximadamente 30-50 días (21,22). En nuestro estudio, no se aisló dicha AVL, a pesar de que, se cumplieron todas las condiciones necesarias para aislamiento. Durante el tiempo de cultivo no se observaron las formas pleomórficas características de *Balamuthia mandrillaris* bajo el agar en los cultivos originales y sus réplicas, a pesar que se observaron constantemente durante el tiempo estipulado y teniendo en cuenta lo realizado en los estudios de Schuster, et al. (18) y Cabello-Vílchez et al. (21)

quienes emplearon el método convencional para el aislamiento de AVL que implica el uso de ANN (20,23,24) con *Escherichia coli* (40) para aislar *Balamuthia mandrillaris* en muestras de tierra. Al no observarse formas pleomórficas sugerentes de *Balamuthia mandrillaris*, en el agar y bajo el agar, no se llevó a cabo la PCR, debido al costo que implica el empleo de técnicas moleculares a todas las muestras cultivadas. Probablemente, *Balamuthia mandrillaris* haya estado presente en nuestras muestras, pero en una proporción muy pequeña; de tal manera que, no ha sido posible detectarlo por microscopía. La investigación de Pazoki et al. buscó identificar AVL utilizando criterios morfológicos y pruebas moleculares obteniendo resultados positivos para *Acanthamoeba spp.*, *Naegleria canariensis* y *Vermamoeba vermiformis*; asimismo, pretendían aislar *Balamuthia mandrillaris* por criterios morfológicos, y a pesar de no observar formas pleomórficas sugerentes con esta ameba en los cultivos, de igual manera se ejecutó la PCR obteniendo resultados negativos (30). Además; Cabello-Vílchez, et al. menciona que el aislamiento de *Balamuthia mandrillaris* es un evento poco frecuente (21) y solamente ha sido posible aislar a esta AVL en muestras ambientales en ocho ocasiones, de las cuales se ha aislado *Balamuthia mandrillaris* en tierra en los países de Irán, México, Perú y Jamaica contando el estudio realizado por Niyiyati, et al. publicado en el año 2016 (22). A pesar de conocer que el aislamiento de *Balamuthia mandrillaris* en tierra es poco frecuente, se decidió hacer la búsqueda de esta AVL en tierra por su patogenicidad y alta tasa de letalidad (4). Asimismo, hay informes clínicos de infecciones por *Balamuthia mandrillaris* de pacientes que han tenido contacto con tierra en jardines como el caso descrito por Paucar, et al. sobre un paciente con

afición a la jardinería en su domicilio y meses después presentó lesiones a nivel de la rodilla (17) y el estudio de Schuster, et al. quien identificó *Balamuthia mandrillaris* en tierra de la maceta de la casa de un niño que falleció a causa de encefalitis amebiana por esta AVL (18). Por lo tanto, la búsqueda e identificación de esta AVL en este tipo de productos empleados en jardinería es importante en futuras investigaciones.

A nivel metodológico, el estudio presentó las siguientes limitaciones: 1) La realización de un muestreo no probabilístico influyó en los resultados de la investigación pues estos solamente son válidos para los elementos evaluados en el presente estudio; mas no se puede generalizar o extrapolar los resultados obtenidos hacia la población o universo. A pesar de ello, los resultados obtenidos nos han brindado información útil que nos permitirá mejorar las decisiones a nivel metodológico en futuras investigaciones. 2) el número de bolsas de tierra comercial seleccionadas fue reducido debido a la disponibilidad de los productos para venta en el supermercado; así como, las implicancias logísticas, económicas y de tiempo que conlleva el procesamiento y mantenimiento de los cultivos obtenidos de cada bolsa. 3) Si bien se conoce que las bolsas con tierra comercial pertenecen a una porción de terreno de cultivo aledaño a Lima Metropolitana, se desconocen datos más específicos sobre el origen de este tipo de tierra. Por tanto, para futuras investigaciones sería importante considerar datos como la parcelación de los terrenos de cultivo, la existencia de lotes de producción los cuales no se detallan en la ficha técnica ni bolsa del producto; así como, la procedencia y formas de obtención de los otros componentes que se mezclan con la tierra de chacra para generar los otros tipos de tierra. 4) Si bien hay estudios que aplican el

algoritmo diagnóstico empleado para identificar AVL en tierra, creemos que el algoritmo diagnóstico nos podría estar llevando a un posible subreporte de la positividad. Si este fuera un escenario probable y real, el aislamiento de AVL en muestras de tierra comercial sería una problemática más grave de lo que estamos observando con nuestros resultados.

Finalmente, el presente estudio aisló AVL en tierra comercial utilizada para la preparación de sustratos de plantas ornamentales y se identificó amebas del género *Acanthamoeba* con mayor frecuencia. La identificación de AVL en este tipo de productos que son distribuidos a la población debe ser considerada para futuras investigaciones, debido a la capacidad de algunas AVL para producir infecciones en el ser humano y animales por sí solas; así como, su capacidad como reservorio de otros microorganismos patógenos a humanos.

5. CONCLUSIONES

El presente estudio demostró la presencia de amebas potencialmente patógenas con una frecuencia de aislamiento del 66,7% en tierra comercial distribuida en un supermercado de Lima Metropolitana en el mes de agosto del año 2019, siendo el género *Acanthamoeba* la ameba más frecuentemente identificada.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adl S M, Simpson AGB, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, et al. The Revised Classification of Eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* [Internet]. 2012 Sep [cited 2019 Feb 14];59(5):429–493. doi: 10.1111/j.1550-7408.2012.00644.x
2. Cabello-Vílchez AM. *Acanthamoeba spp.* un agente oportunista en infecciones humanas. *Revista de Investigación de la Universidad Norbert Wiener* [Internet]. 2019 jul [citado 01 dic 2019];4(1):11–32. Disponible en: <https://revistadeinvestigacion.uwiener.edu.pe/index.php/revistauwiener/article/view/34>
3. Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit Vectors* [Internet]. 2012 Jan 10 [cited 2019 Jan 02];5(6):1756-3305. doi: 10.1186 / 1756-3305-5-6
4. Król-Turmińska K, Olender A. Human infections caused by free-living amoebae. *Ann Agric and Environ Med* [Internet]. 2017 Feb [cited 2018 Dec 19];24(2):254–260. doi: 10.5604/12321966.1233568
5. Gelman BB, Rauf SJ, Nader R, Popov V, Borkowski J, Chaljub G, et al. Amoebic encephalitis due to *Sappinia diploidea*. *JAMA* [Internet]. 2001 May 16 [cited 2018 Nov 21];285:2450–2451. doi: 10.1001 / jama.285.19.2450
6. Cabello-Vílchez AM, Rodríguez-Zaragoza S, Piñero J, Valladares B, Lorenzo-Morales J. *Balamuthia mandrillaris* in South America: An emerging potential hidden pathogen in Perú. *Exp Parasitol* [Internet]. 2014 Nov [cited 2019 Mar 02];145:S10–S19. doi: 10.1016/j.exppara.2014.05.007

7. Cabello-Vílchez AM. *Balamuthia mandrillaris* en el Perú, lesiones cutáneas, meningoencefalitis y métodos de cultivo. Infectio [Internet]. 2016 [citado 01 dic 2019];20(2):107-119. doi: 10.1016/j.infect.2015.10.006
8. Barker J, Humphrey T, Brown M. Survival of *Escherichia coli* 0157 in a soil protozoan: implications for disease. FEMS Microbiol Lett [Internet]. 1999 Apr [cited 2019 Apr 14];173(2):291-295. doi: 10.1111/j.1574-6968.1999.tb13516.x
9. Lambrecht E, Baré J, Sabbe K, Houf K. Impact of *Acanthamoeba* Cysts on Stress Resistance of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* 4/O:3, *Listeria monocytogenes* 1/2a and *Escherichia coli* O:26. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2017 Jun 30 [cited 2019 Apr 18];83(14):e00754-17. doi: 10.1128/AEM.00754-17
10. Brevik E, Slaughter L, Singh B, Steffan J, Collier D, Barnhart P, et al. Soil and Human Health: Current Status and Future Needs. Air, Soil and Water Research [Internet]. 2020 Jun 22 [cited 2020 Dec 12];13(1):1–23. doi: 10.1177/1178622120934441
11. Schuster F. Cultivation of Pathogenic and Opportunistic Free-Living Amebas. Clin Microbiol Rev [Internet]. 2002 Jul [cited 2018 Dec 10];15(3):342–354. doi: 10.1128/CMR.15.3.342-354.2002
12. Mrva M. Epigeic microfauna: Active naked amoebae (Amoebozoa: Lobosa, Conosa). In: Holecová M, Christophoryová J, Mrva M, Roháčová M, Stašiov S, Štrichelová J, et al. Biodiversity of soil micro- and macrofauna in oak-hornbeam forest ecosystem on the territory of Bratislava [Internet]. Bratislava: Comenius University; 2012 [cited 2019 Jan 10]. p. 19–22. ISBN: 978-80-223-

- 3319-1. Available from:
<http://www.akademickyrepozitar.sk/sk/repozitar/biodiversity-of-soil-micro-and-macrofauna-in-oak-hornbeam-forest-ecosystem-on-the-territory-of-bratislava.pdf>
13. Jaulis JC, Pacheco A. Producción de Marigold (*Tagetes patula* cv. Durango orange) en diferentes medios de crecimiento, bajo condiciones de vivero de la Universidad Nacional Agraria La Molina. *Anales Científicos* [Internet]. 2015 [citado 24 may 2019];76(1):38-43. doi: 10.21704/ac.v76i1.762
14. Real Decreto 865/2010 [Internet]. España: Ministerio de la presidencia; 2010 [citado 12 feb 2019]. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/pdf/2010/BOE-A-2010-11153-consolidado.pdf>
15. Mondragón GF. Evaluación del crecimiento de plántulas de *Caesalpinia Spinosa*, *Sapindus Saponaria* y *Tecoma Stans* en diferentes sustratos durante su propagación en vivero [Tesis de Licenciatura en Internet]. Lima: Universidad Agraria La Molina; 2016 [citado 04 mar 2019]. 85 p. Disponible en: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/2641/K10-M6553-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
16. Jaulis JC, Pacheco A, Martínez A, Moreno S. Insumos orgánicos en la preparación de sustratos para el crecimiento de *Dianthus chinensis* y *Fuchsia sp.* *Anales Científicos* [Internet]. 2018 [citado 12 abr 2019];79(2):360–367. doi: 10.21704/ac.v79i2.1248
17. Paucar K, Del Solar M, Bravo F, Salomón M, Puell L, Feria K, et al. Balamutiasis primaria cutánea. *Folia Dermatol* [Internet]. 2010 [citado 16 mar 2019];21(2):105–109. Disponible en: <http://www.cidermperu.org/php/fovia/pdf/f0244.pdf>

18. Schuster F, Dunnebacke T, Booton G, Yagi S, Kohlmeier C, Glaser C. Environmental Isolation of *Balamuthia mandrillaris* Associated with a Case of Amebic Encephalitis. J Clin Microbiol [Internet]. 2003 Jul [cited 2019 Feb 18];41(7):3175–3180. doi: 10.1128/JCM.41.7.3175–3180.2003
19. Khan NA. *Acanthamoeba*: biology and increasing importance in human health. FEMS Microbiol Rev [Internet]. 2006 Jul 01 [cited 2019 Feb 20];30(4):564–595. doi: 10.1111/j.1574-6976.2006.00023.x
20. Page FC. A new key to freshwater and soil Gymnamoebae: With instructions for culture. Ambleside: Freshwater Biological Association; 1988. 122 p.
21. Cabello-Vílchez AM, Batlle MR, Montalbán E, Martín CM, López A, Elias R, et al. The isolation of *Balamuthia mandrillaris* from environmental sources from Peru. Parasitol Res [Internet]. 2014 Apr 30 [cited 2019 Mar 10];113(7):2509-13. doi: 10.1007 / s00436-014-3900-2
22. Niyiyati M, Ahmad S, Lorenzo-Morales J, Lasjerdi Z. Isolation of *Balamuthia mandrillaris* from soil samples in North-Western Iran. Parasitol Res [Internet]. 2016 Feb [cited 2019 May 19];113(7):2509–2513. doi: 10.1007/s00436-014-3900-2
23. Page F, Siemensma P. Nackte Rhizopoda and Heliozoa. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag; 1991. 297 p.
24. Smirnov A, Brown S. Guide to the methods of study and identification of soil Gymnamoebae. Protistology. 2004;3(3):148-190.
25. Astorga B. Ecología de *Acanthamoeba spp.* en Chile: identificación fenotípica y genotípica en agua, suelos y vegetales [Tesis doctoral en Internet].

Zaragoza: Universidad de Zaragoza; 2016 [citado 14 may 2019]. 277 p.
Disponible en: <https://zagan.unizar.es/record/47883/files/TESIS-2016-067.pdf>

26. Schroeder J, Booton G, Hay J, Niszl I, Seal D, Markus M, et al. Use of Subgenic 18S Ribosomal DNA PCR and Sequencing for Genus and Genotype Identification of *Acanthamoebae* from Humans with Keratitis and from Sewage Sludge. J Clin Microbiol [Internet]. 2001 May [cited 2019 Mar 22]; 39(5):1903–1911. doi: 10.1128 / JCM.39.5.1903-1911.2001

27. Niyiyati M, Lorenzo-Morales J, Rezaie S, Rahimi F, Martín-Navarro CM, Mohebbi M, et al. First report of a mixed infection due to *Acanthamoeba* genotype T3 and *Vahlkampfia* in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. Exp Parasitol [Internet]. 2010 Sep [cited 2019 May 22];126(1):89–90. doi: 10.1016 / j.exppara.2009.10.009

28. Pertuz S, Jiménez N, Chacín L. Amebas de vida libre en muestras provenientes de fuentes de agua, suelo, aire y exudados nasales en la Ciudad de Maracaibo, Venezuela [Internet]. Maracaibo (Venezuela): Universidad del Zulia, Instituto de investigaciones clínicas; 1997 [citado 01 abr 2019]. 21 p. doi: 10.13140/RG.2.1.5177.1123

29. Wagner C, Batlle MR, Hernán A, Rojas E, Pérez G, López A, et al. High occurrence of *Acanthamoeba* genotype T4 in soil sources from Bolivar State, Venezuela. Acta Parasitol [Internet]. 2016 Sep 01 [cited 2019 May 05];61(3):466–470. doi: 10.1515 / ap-2016-0063

30. Pazoki H, Niyiyati M, Javanmard E, Iasjerdi Z, Spotin A, Mirjalali H, et al. Isolation and Phylogenetic Analysis of Free-Living Amoebae (*Acanthamoeba*, *Naegleria*, and *Vermamoeba*) in the Farmland Soils and Recreational Places in

Iran. Acta Parasitol [Internet]. 2020 Mar [cited 2020 Dec 13];65(1):36-43. doi: 10.2478/s11686-019-00126-9

31. Meighani M, Eslamirad Z, Hajihosseini R, Ahmadi A, Saki S. Isolation and Genotyping of *Acanthamoeba* from Soil Samples in Markazi Province, Iran. Open Access Maced J Med Sci [Internet]. 2018 Dec 16 [cited 2021 May 07];6(12):2290-2294. doi: 10.3889/oamjms.2018.454

32. Reyes M, Todd C, Martín C, López A, Cabello-Vílchez AM, González A, et al. Isolation and characterization of *Acanthamoeba* strains from soil samples in Gran Canaria, Canary Islands, Spain. Parasitol Res [Internet]. 2014 Apr [cited 2019 May 11];113(4):1383-8. doi: 10.1007/s00436-014-3778-z

33. Todd C, Reyes M, Martín C, Dorta A, López A, Martínez E, et al. Isolation and genotyping of *Acanthamoeba* strains from soil sources from Jamaica, West Indies. J Eukaryot Microbiol [Internet]. 2015 May-Jun [cited 2019 Feb 19];62(3):416-21. doi: 10.1111/jeu.12197

34. Rodríguez-Zaragoza S, Mayzlish E, Steinberger Y. Vertical distribution of the free-living amoeba population in soil under desert shrubs in the Negev desert, Israel. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2005 Apr [cited 2019 May 19];71(4):2053-60. doi: 10.1128/AEM.71.4.2053-2060.2005

35. Promart Homecenter. Tierra de chacra [Internet]. Lima: Homecenters peruanos S.A. [citado 22 de junio de 2021]. Disponible en: <https://www.promart.pe/tierra-de-chacra-30kg/p>

36. Cruz A. Aislamiento de amebas en suelo agrícola de Canarias [Tesis de grado en Internet]. Canarias: Instituto Universitario de Enfermedades Tropicales y Salud Pública de Canarias, Departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría,

Medicina Preventiva, Toxicología, Medicina Legal y Forense y Parasitología; 2017 [citado 18 ago 2019]. 22 p. Disponible en: <https://riull.ull.es/xmlui/handle/915/6785?locale-attribute=en>

37. Oliva M, Vacalla F, Pérez D, Tucto A. Vivero Forestal para producción de plantones de especies forestales nativas: Experiencia en Molinopampa, Amazonas, Perú [Internet]. Chachapoyas: Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana; 2014 [citado 10 May 2021]. 20 p. Disponible en: <http://www.iiap.org.pe/upload/publicacion/publ1419.pdf>

38. NTP 311.557 (Norma Técnica Peruana 311.557) Fertilizantes: Productos orgánicos usados como abonos o fertilizantes y enmiendas o acondicionadores de suelo. Perú: Instituto Nacional de Calidad; 2013.

39. Mrva M, Garajová M. The Efficiency of Cultivation Media in Recovering Naked Lobose Amoebae from Freshwater Environments. *Zool Stud* [Internet]. 2018 Mar 8 [cited 2021 May 07];57:e9. doi: 10.6620/2018.ZS.57-09

40. Weekers P, Bodelier P, Wijen J, Vogel G. Effects of grazing by the free-living soil amoebae *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1993 Jul [cited 2019 Mar 29];59(7):2317–2319. doi: 10.1128 / AEM.59.7.2317-2319.1993

7. TABLAS Y FIGURAS

Tabla N°1. Resultados del aislamiento de amebas de vida libre a partir de muestras de tierra comercial

Cód. de muestra	Tipo de tierra	Detección en cultivo	Detección por PCR	Género de ameba de vida libre
TP-A	Tierra preparada	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TP-B	Tierra preparada	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TP-C	Tierra preparada	Negativo	NTM	NI
TP-D	Tierra preparada	Negativo	NTM	NI
TP-E	Tierra preparada	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TP-F	Tierra preparada	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TP-G	Tierra preparada	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TP-H	Tierra preparada	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TP-I	Tierra preparada	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TP-J	Tierra preparada	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TCH-A	Tierra de chacra	Negativo	NTM	NI
TCH-B	Tierra de chacra	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TCH-C	Tierra de chacra	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TCH-D	Tierra de chacra	Negativo	NTM	NI
TCH-E	Tierra de chacra	Negativo	NTM	NI
TCH-F	Tierra de chacra	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TCH-G	Tierra de chacra	Negativo	NTM	NI
TCH-H	Tierra de chacra	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TCH-I	Tierra de chacra	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TCH-J	Tierra de chacra	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TA-A	Tierra de almacigo	Negativo	NTM	NI
TA-B	Tierra de almacigo	Negativo	NTM	NI
TA-C	Tierra de almacigo	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TA-D	Tierra de almacigo	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TA-E	Tierra de almacigo	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TA-F	Tierra de almacigo	Positivo	NTM	Ameba sugerente al género <i>Vahlkampfia</i>
TA-G	Tierra de almacigo	Negativo	NTM	NI
TA-H	Tierra de almacigo	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TA-I	Tierra de almacigo	Positivo	Positivo	<i>Acanthamoeba spp.</i>
TA-J	Tierra de almacigo	Negativo	NTM	NI

NTM: No se realizó técnica molecular

NI: No se identificó

Tabla N°2. Frecuencia de muestras de tierra comercial con cultivo positivo y negativo para AVL según el tipo de tierra comercial utilizada para la preparación de sustratos de plantas ornamentales comercializada en un supermercado de Lima Metropolitana en el mes de agosto del año 2019

Muestras de tierra comercial	<u>TOTAL</u>		Muestras de tierra comercial con cultivo positivo		Muestras de tierra comercial con cultivo negativo	
	n=30	%	n=20	%	n=10	%
Tipo de tierra comercial						
Tierra preparada	10	33.3	8	26.7	2	6.7
Tierra de chacra	10	33.3	6	20.0	4	13.3
Tierra de almácigo	10	33.3	6	20.0	4	13.3

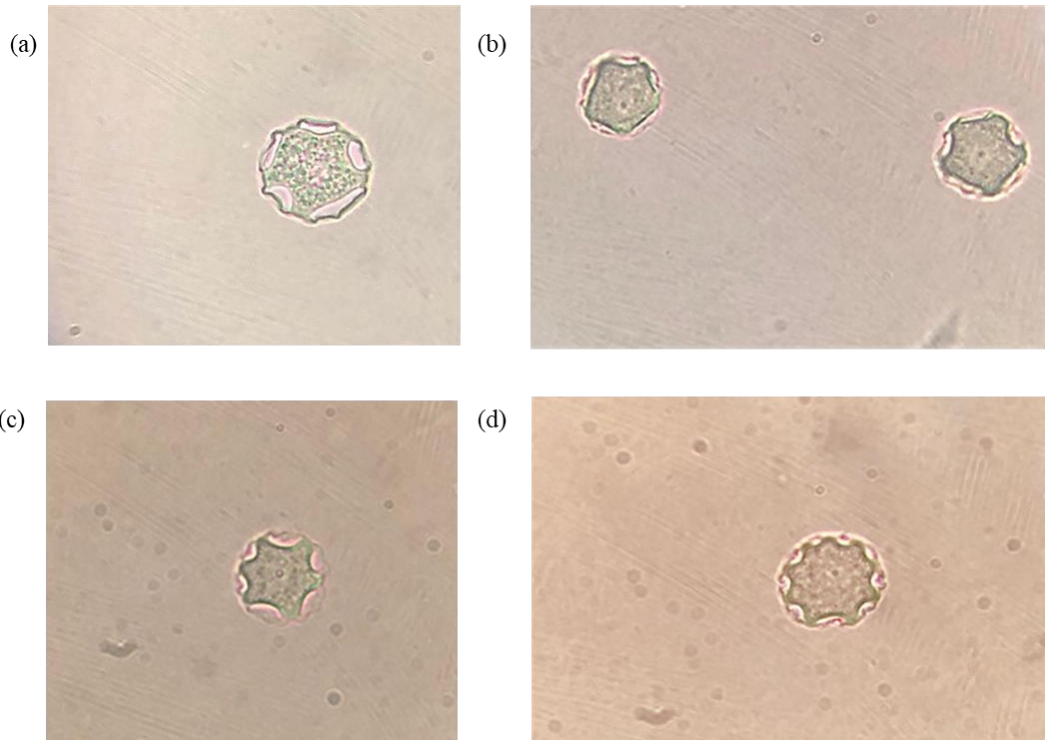


Figura N°1. Quistes de *Acanthamoeba spp.* aislados de tierra comercial correspondiente a tierra preparada: Muestra TP-J(a), Muestra: TP-F(b), Muestra: TP-A(c), Muestra: TP-I(d).

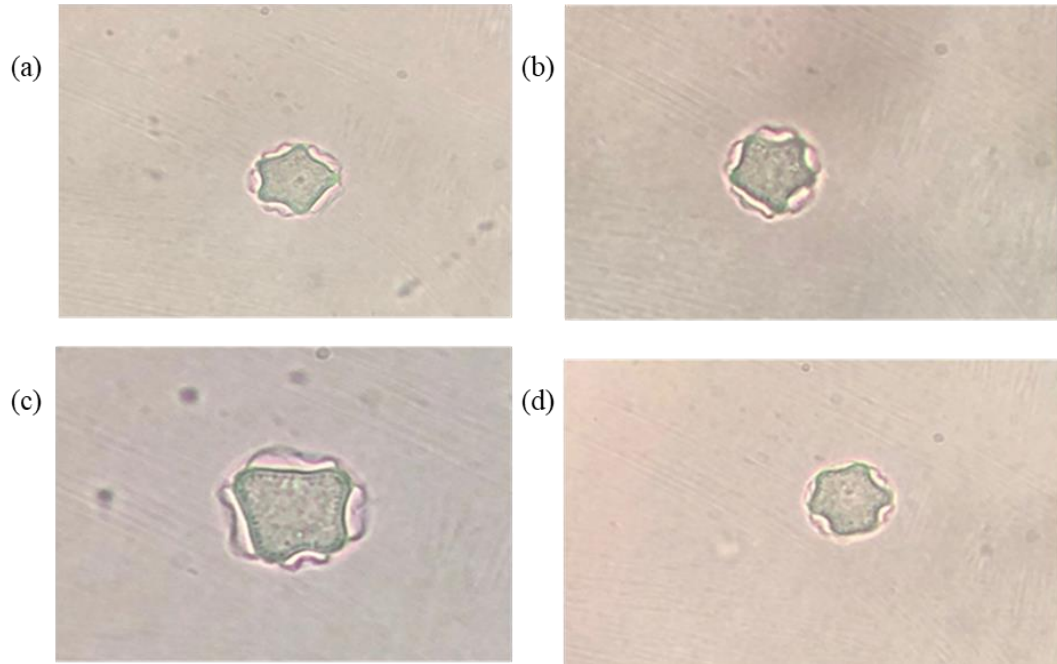


Figura N°2. Quistes de *Acanthamoeba spp.* aislados de tierra comercial correspondiente a tierra de chacra: Muestra TCH-H(a), Muestra TCH-F(b), Muestra TCH-C(c), Muestra TCH-J(d).

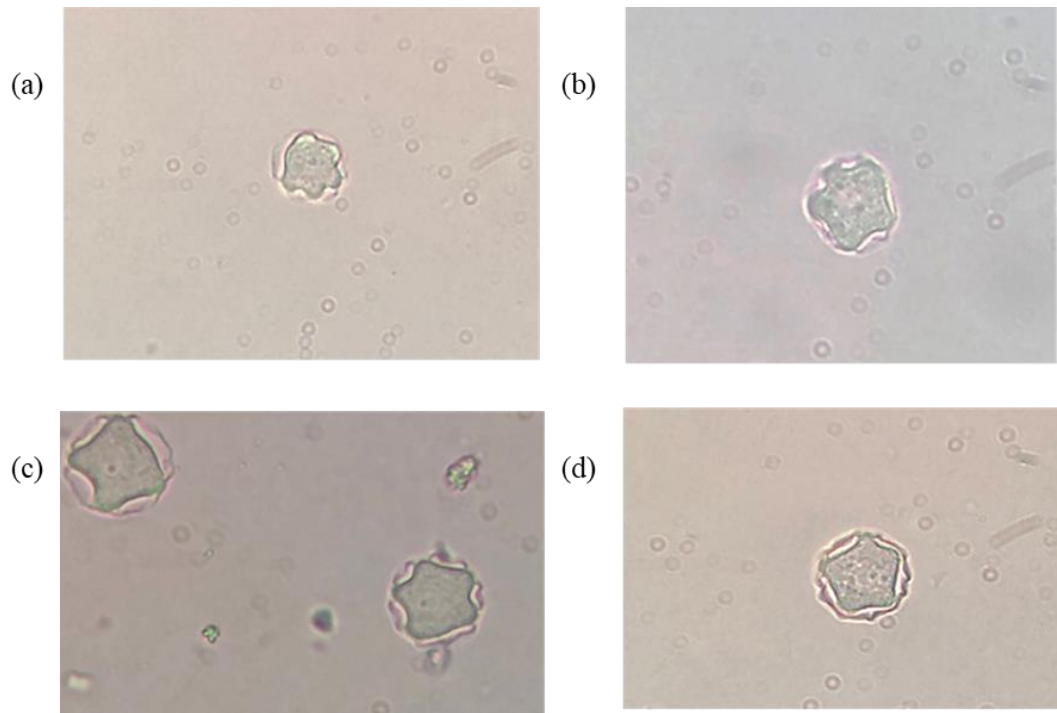


Figura N°3. Quistes de *Acanthamoeba spp.* aislados de tierra comercial correspondiente a tierra de almácigo: Muestra TA-H(a), Muestra TA-C(b), Muestra TA-E(c), Muestra TA-D(d).

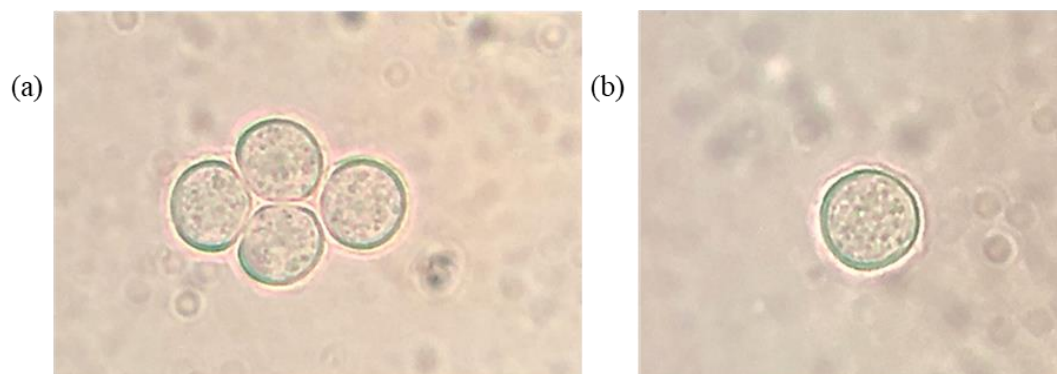


Figura N°4. Quistes de ameba del género *Vahlkampfia* aislada de tierra comercial correspondiente a tierra de almácigo (a) y (b): Muestra TA-F.

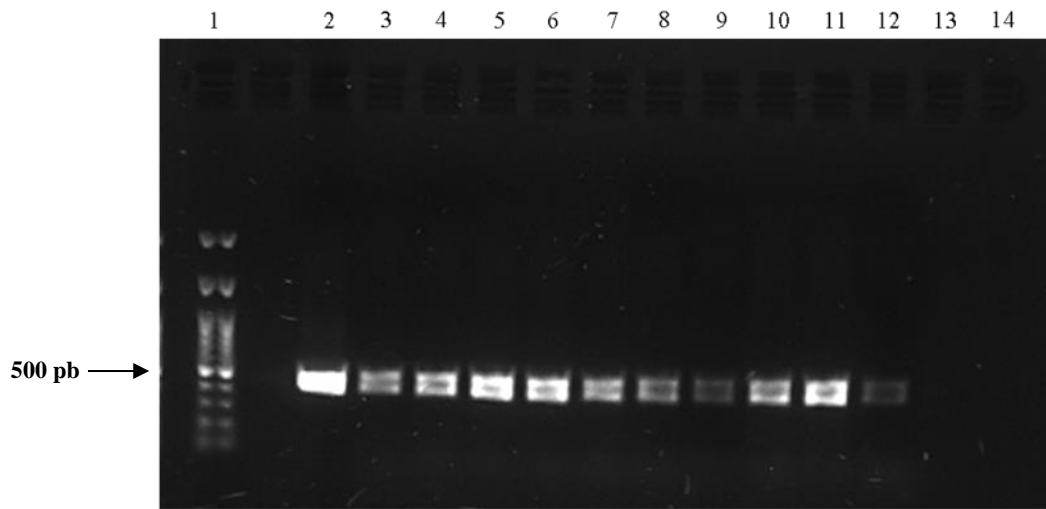


Figura N°5-A. Amplificación por PCR de la región ASA.S1 del gen ARNr 18S.
Carriles: Marcador de peso molecular de 100 pb (Carril 1); Control positivo (Carril 2); Cultivos positivos (Carriles 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12); Control negativo (Carriles 13 y 14).

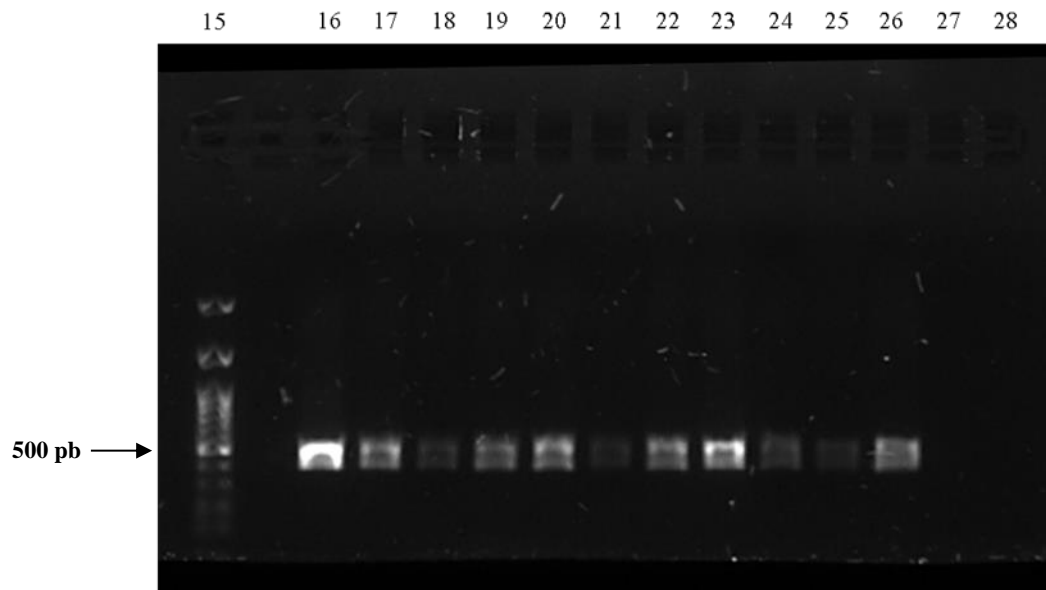


Figura N°5-B. Amplificación por PCR de la región ASA.S1 del gen ARNr 18S.
Carriles: Marcador de peso molecular de 100 pb (Carril 15); Control positivo (Carril 16); Cultivos positivos (Carriles 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26); Control negativo (Carriles 27 y 28).