



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

QUERATITIS AMEBIANA EN MEXICO

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARITZA OMAÑA MOLINA

DIRECTOR DE TESIS: DR. FERMIN RIVERA AGUERO

LOS REYES IZTACALA

MAYO 1994





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

I RESUMEN	pág. 6
II INTRODUCCION	pág. 7
Queratitis Amebiana	pág. 8
Ecología de <u>Acanthamoeba</u>	pág. 10
Antecedentes	pág. 13
Epidemiología de <u>Acanthamoeba</u>	pág. 14
Factores de riesgo	pág. 17
Patogenicidad de <u>Acanthamoeba</u>	pág. 18
Cuadro Clínico de la Queratitis Amebiana	pág. 19
Diagnóstico Clínico	pág. 21
Tratamiento	pág. 23
Profilaxis de la Queratitis Amebiana	pág. 25
III JUSTIFICACION	pág. 27
IV OBJETIVOS	pág. 28
V MATERIAL Y METODOS	pág. 29
Obtención de las muestras	pág. 30
Medios de Cultivo	pág. 30
Descripción Biológica de los organismos	pág. 31
Pruebas de Patogenicidad	pág. 33
Pruebas de sensibilidad a Fármacos	pág. 34
VI RESULTADOS	pág. 36
Reporte del caso No. 1	pág. 37
Reporte del caso No. 2	pág. 39
Reporte del caso No. 3	pág. 40
VII DISCUSION	pág. 50

VIII CONCLUSTON	pág. 55
IX APENDICES	pág. 58
X BIBLIOGRAFIA	pág. 65

DEDICATORIA

Dedico éste trabajo con todo mi amor, gratitud y entusiasmo :

IN MEMORIAM

A MI MADRE

En éste homenaje póstumo hacia ti querida mamá, quiero darte las gracias por todas las cosas hermosas que me diste...sobre todo por tu entereza, tu dedicación, tu inquebrantable convicción de seguir de frente el camino de la vida y por ese espíritu de lucha que demostraste hasta el final de tu camino, que me han enseñado que la vida vale la pena vivirla con la frente en alto y dispuesta a entregar lo que sea necesario para triunfar en ella.

A MI PADRE

A pesar del tiempo tu recuerdo vive en mí como un presente constante esa niña frágil que no comprendía los porqués de la vida y la muerte se convirtió en una mujer y me doy cuenta que para el amor no existen fronteras de tiempo y de distancia ... te doy las gracias por todas las cosas bellas que me diste.

A MI ABUELITO

Porque a tu lado emprendí una aventura entusiasta donde conocí un mundo maravilloso lleno de conocimientos y me enseñaste que los límites del aprendizaje los determina el mismo hombre. Juntos navegamos por mares de conceptos y de ideas novedosas ... de este modo el investigar un mundo nuevo ha representado más que una obligación una fantástica travesía por la vida.

A MI ESPOSO

Tu representas para mi veredas nuevas, dónde el despertar cada día significaba darle gracias a la vida por haberte conocido. Hemos compartido sinsabores y alegrías por lo mismo deseo que nuestros senderos nunca se separen gracias por mostrarme el hermoso camino del AMOR.

A MIS HIJOS

Ustedes son para mi alegría y razón de ser crecimos juntos tal vez por ello a veces los miro como amigos y confidentes. Gracias por comprenderme e impulsarme en los momentos difíciles y sobre todo por apoyarme en esta aventura del conocimiento ... porque a su lado mi papel de madre no ha sido una limitante para alcanzar todas las metas que como ser humano me he fijado, al contrario, su presencia y entusiasmo me invitan a seguir ascendiendo en el camino.

A MIS SOBRINOS

Con ustedes he podido despertar a la niña que hay en mi y disfrutar los momentos aparentemente intrascendentes que en realidad marcan la diferencia entre pasar inadvertido por el mundo y vivir.

A MIS HERMANOS

Por los momentos gratos que hemos pasado juntos ... Por las alegrías y sinsabores ... Por las anécdotas que nos unen ... Por los recuerdos ... Porque los amo, quiero compartir con ustedes mi trabajo.

A MI ABUELITA Y A MI TIA ARACELY

Con gratitud y cariño por sus cuidados y atenciones gracias por dedicarme su tiempo y compañía y dejarme ser parte de su vida.

A MIS AMIGOS

A todas las personas que de una u otra manera han compartido momentos importantes de mi vida les agradezco profundamente su mano amiga que me ha demostrado su apoyo a lo largo de ella . Gracias porque con su presencia en las buenas y en las malas me demuestra que los lazos de sangre no son los únicos que importan para que los considere parte de mi familia.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis compañeros y amigos del proyecto CyMA por sus atenciones, apoyo y sobre todo por su recibimiento en el proyecto que me ha permitido integrarme nuevamente en mi carrera.

De manera muy especial agradezco al Dr. Fermin Rivera A. su apoyo, y atenciones durante la dirección de mi trabajo de tesis.

RESUMEN

La Queratitis Amebiana es una patología asociada en la mayoría de los casos a usuarios de lentes de contacto, siendo éstos un factor de riesgo de gran importancia. Los individuos susceptibles a contraerla son generalmente sanos e inmunocompetentes.

El daño que producen en córnea casi siempre es grave ya que, en la mayoría de los casos es necesario hacer un trasplante de córnea, sin que por ello se asegure la erradicación de estos organismos anfibioicos.

Son varios los factores que dificultan la detección temprana de ésta patología que si bien por su poca insidencia no puede ser considerada como un problema de salud pública, en la mayoría de los casos las consecuencias que trae consigo esta infección llegan a ser devastadoras.

Los factores más relevantes que impiden el reconocimiento de esta patología son:

- a) A las amebas no se les toma en cuenta en los diagnósticos diferenciales iniciales, siendo común que se prescriban fármacos antibacterianos, antimicóticos o antivirales.
- b) La toma de la muestra por lo general se lleva a cabo de manera muy superficial en la córnea, aunado a la escasa cantidad de ésta.
- c) Las técnicas utilizadas para su observación al microscopio no son las adecuadas para su plena identificación.

En colaboración con el Hospital para evitar la ceguera en México se realizó una búsqueda que incluyó 200 raspados corneales de pacientes con sospecha de padecer la Queratitis amebiana en base a los siguientes signos y síntomas: Infección unilateral, ser usuario de lentes de contacto, tener una lesión corneal menor, severo dolor ocular, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, presencia de hipopión y enrojecimiento de la conjuntiva.

Las muestras se obtuvieron con ayuda de la lámpara de hendidura y una pequeña espátula para la remoción de un fragmento de epitelio, el cual se colocó en agar no nutritivo con *Enterobacter aerogenes* muerta por calor, se incubaron a 30° C por 24 horas.

Se encontraron tres casos positivos donde se comprobó el papel de amebas del género *Acanthamoeba* como agente etiológico en la Queratitis. La metodología inicial consideró la toma de la muestra corneal de modo superficial con hisopos y transporte con medio basal de Bold. El primero correspondió a la muestra No 142, el segundo a la muestra 192 y tercero a la muestra 198. La detección del segundo y tercer caso se vieron favorecidas porque a partir del primero, se establecieron los siguientes criterios del diagnóstico:

Se realizó un raspado profundo de la córnea con un bisturí, el cual involucró al estroma.

Se consideró a la ameba como posible agente etiológico desde el inicio del padecimiento.

Se utilizó Calcoflúor blanco para teñir las muestras obtenidas. Se comprobó su poder patógeno en modelos experimentales en ratón y dadas las condiciones de temperatura ambiente a las que se desarrollan se recomienda que se les tenga en cuenta como organismos oportunistas capaces de causar daño si las condiciones son óptimas para su invasión en córnea o a través de otras vías con consecuencias en la mayoría de los casos devastadoras.

Por lo anterior se considera de gran importancia tomar en cuenta los parámetros mencionados para un diagnóstico oportuno de la patología, además de difundir en los círculos médicos información sobre éstas amebas anfibioicas.

INTRODUCCION

Las amebas de vida libre representan a un grupo de protozoos cuya importancia va más allá de la simple curiosidad que estos puedan despertar al ser observados bajo el microscopio pues algunas especies pueden ser nocivas para el ser humano.

El término "organismos anfizoicos" introducido por Page en 1976 explica lo expuesto con anterioridad ya que, las amebas por lo general se encuentran en su hábitat natural (aire, agua, suelo) en una fase exozoica no parasítica o de vida libre y cuando las condiciones del medio son favorables para su invasión al hospedero pueden transformarse en parásitos.

En su fase endozoica o parasitaria pueden invadir y causar daño en sitios como el sistema nervioso central (con consecuencias en la mayoría de los casos mortales), la piel, el pulmón, el riñón, el útero, la próstata y la córnea entre otros órganos. (Rondanelli, 1987).

Acanthamoeba presenta dos fases de viabilidad biológica a saber: la fase vegetativa o proliferativa y la fase quística.

En su fase vegetativa los trofozoitos son fácilmente reconocibles y diferenciables de otras amebas por la presencia de dos tipos de pseudópodos: uno o dos pseudópodos amplios y hialinos llamados lobópodos y a lo largo del perímetro celular, finas proyecciones llamadas filópodos o acantópodos que aparecen y desaparecen durante la locomoción de la amibas (Pussard, 1986).

Los trofozoitos presentan una longitud promedio de 16-47 micrómetros. Pueden presentar formas ovales, alargadas, o irregulares.

El citoplasma es granuloso con gran cantidad de vacuolas (contractiles y digestivas) con un solo núcleo y un gran nucléolo central (Page, 1988).

Estos organismos se reproducen de manera asexual (metamitosis) donde la membrana nuclear desaparece al momento en que se lleva a cabo la división celular. (Page, 1988), (Johns, 1993).

A nivel ultraestructural, los trofozoitos de *Acanthamoeba* presentan las características típicas de una célula eucariótica y no exhiben diferencias significativas entre las especies descritas. La membrana citoplasmática presenta una estructura trilaminar de 9 nm de grosor sin presentar otra cubierta celular.

La fase quística está representada por estructuras redondeadas con un diámetro medio de 10 - 25 micrómetros. Con una doble pared: La pared externa o exoquiste y una pared interna o endoquiste, separadas entre sí, sólo en determinados puntos se unen para formar orificios de salida o poros que se cierran por un tapón denominado opérculo (Page, 1988).

Pussard y Ponds utilizan el término de exina e intina para denominar al exoquiste y al endoquiste respectivamente, debido a que el término endoquiste puede ser impreciso ya que considera al complejo formado por la intina y el protoplasma amebiano al cual se encuentra fuertemente adherido.

La pared del exoquiste esta constituida de celulosa.

Los quistes son verdaderamente resistentes pues llegan a ser viables por mas de un año.

La morfología quística ha sido de gran utilidad en la taxonomía de estos organismos que pertenecen al género *Acanthamoeba*, ya que permite organizarlos en tres grandes grupos:

GRUPO I

Las paredes externa e interna del quiste están separadas entre si y solamente se juntan por extensión del endoquiste a través de los brazos o rayos que presenta. El número de brazos y de poros es el mismo.

GRUPO II

El endoquiste tiene forma estrellada o poligonal de modo que las dos capas se juntan en esquinas más que en brazos del endoquiste y pueden presentar una forma mas o menos redondeada.

GRUPO III

En este grupo el exoquiste es muy delgado y a veces se dificulta su observación mientras que el endoquiste es mas o menos redondeado y no presenta brazos debido a que las paredes están muy juntas (Tabla No. 1).

Estas amebas en general son capaces de soportar grandes rangos de temperatura, asi pues las encontramos tanto en aguas termales como en el Artico. Su alimentación es a base de bacterias, hongos y otros microorganismos del medio. (Martínez, 1985).

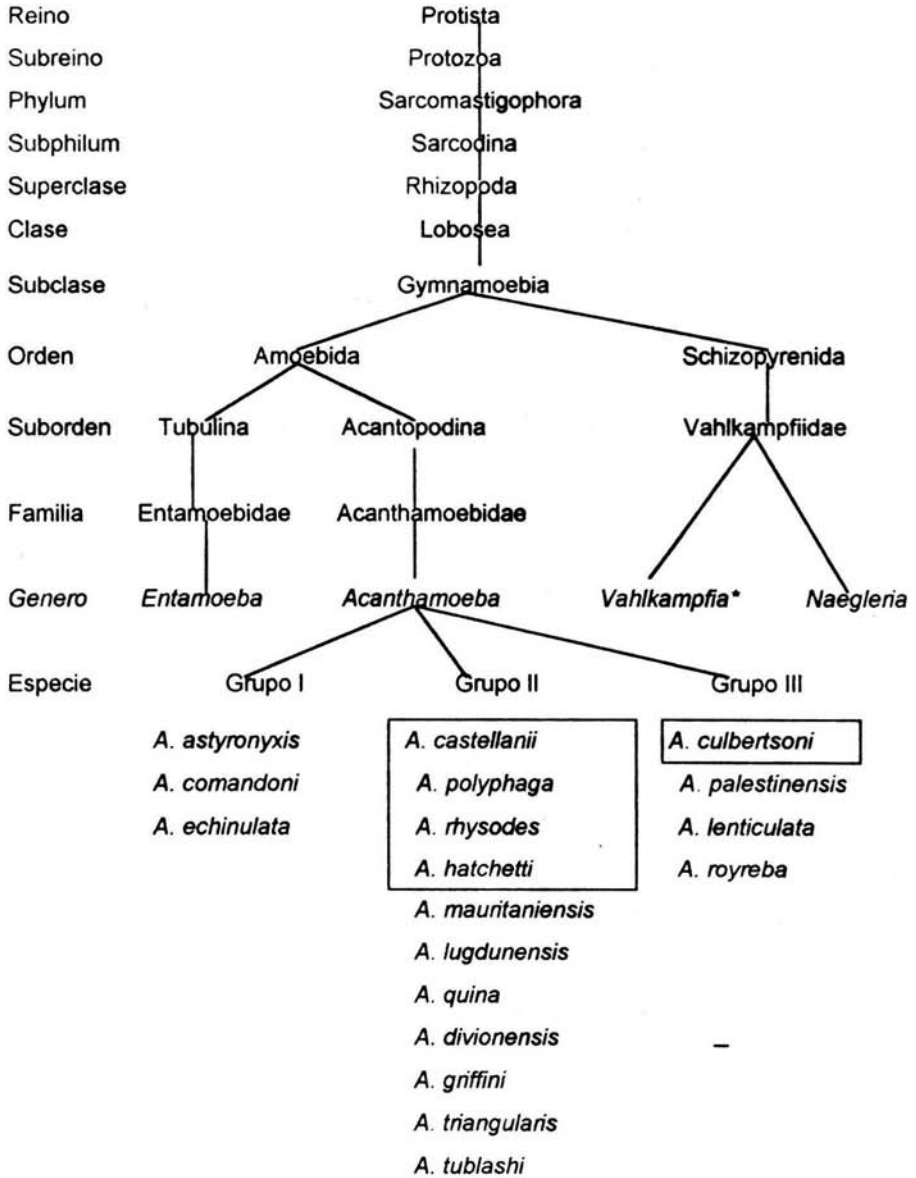
Acanthamoeba es uno de los géneros de amebas anfitoicas con gran importancia desde el punto de vista médico. La encefalitis amebiana granulomatosa (EAG) es uno de los padecimientos más graves que ocasiona. Las personas afectadas por esta patologia por lo general son enfermos crónicos e inmunodeprimidos, incluyendo a pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (González, 1986), o bien que hayan sido sometidas a terapias inmunosupresoras (Martínez, 1980).

QUERATITIS AMEBIANA

Se define a la Queratitis Amebiana como una infección corneal crónica causada por amebas anfitoicas del género *Acanthamoeba*, cuya frecuencia va en aumento, por lo general se desarrolla en un periodo que va de semanas a meses. Es una infección que si no

TABLA 1

TAXONOMIA DE ACANTHAMOEBA



□ Especies que causan queratitis

* Un probable caso

es manejada de modo adecuado puede causar la pérdida de la visión e incluso hasta la pérdida del ojo afectado (John, 1993).

La Queratitis Amebiana ocupa un lugar relevante dentro de las patologías causadas por estos organismos.

La Queratitis Amebiana es una infección corneal poco común y sin embargo el número de casos va en aumento a medida que se incluye en los diagnósticos diferenciales y las técnicas para su detección temprana se perfeccionan. En la actualidad son más de 400 casos reportados en el mundo. Es una patología con consecuencias devastadoras para la que por desgracia aún no se ha encontrado un tratamiento óptimo a fin de erradicarla sin dejar secuelas de importancia para el paciente que la padece (Berger, 1990).

De todas las especies que conforman el género *Acanthamoeba* 5 son las especies involucradas en la Queratitis Amebiana:

Acanthamoeba catellanii
Acanthamoeba polyphaga
Acanthamoeba hatchetti
Acanthamoeba culbertsoni
Acanthamoeba rhyodes (Cohen, 1987)
(Tabla No.2)

ECOLOGIA DE ACANTHAMOEBIA

Son protozoos cosmopolitas por lo que es relativamente sencillo encontrarse en contacto con éstos, especialmente en medios con contaminación orgánica (agua, aire, suelo, etc.). Así pues se han aislado de agua dulce, agua de mar, sedimentos oceánicos, aguas de sitios a muy bajas temperaturas, del suelo, de tubos de aire acondicionado (Keleti, 1992), de piscinas de hidromasaje, unidades de fisioterapia (Visvesvara, 1989), de unidades de diálisis - donde constituyen un serio problema - (Gunter, 1992). También se han aislado de personas saludables a las que se les han practicado exudados faríngeos (Rivera, et al 1981), de lavados bronquiales (Curtis, 1992), de muestras de esputo (Allen, 1992), de aguas embotelladas (Rivera, et el 1981). Son de gran importancia los estudios realizados por Rivera y cols. sobre las amebas de vida libre que se encuentran en la atmósfera de la ciudad de México, donde se muestran las especies potencialmente patógenas para el ser humano.

La Queratitis Amebiana se asocia con un daño o traumatismo corneal en una quinta parte de la población afectada y poco menos de las cuatro partes restantes corresponde a usuarios de lentes de contacto (lentes de contacto blandos en su mayoría). En este grupo las soluciones utilizadas para su preservación juegan un papel importante; es frecuente que se utilicen pastillas de sal disueltas en agua destilada y bajas temperaturas como sistemas de desinfección y no siempre las condiciones en la que ésta se realiza son las adecuadas (John, 1993).

TABLA 2

INFECCIONES HUMANAS CAUSADAS POR ESPECIES DE *ACANTHAMOEBA*

Especies de <i>Acanthamoeba</i>	Infección en SNC	Infección en ojo	Otros tejidos	Referencias
<i>A. astronyxis</i> (1-3)	X		Nodulos linfaticos, piel, tiroides, nasal	Gullet <i>et al.</i> (1979)
<i>A. castellanii</i> (1982) (1-3)	X	X	Prostata, musculo, piel, pulmón, óseo	Martinez Martinez <i>et al.</i> (1977) (1-3) Moor <i>et al.</i> (1985) (2) Borochovitz <i>et al.</i> (1985)(2) González <i>et al.</i> (1986) (3)
<i>A. culbertsoni</i>	X	X	Higado, útero, piel, bazo.	Martínez <i>et al.</i> (1977) (1-3) Wiley <i>et al.</i> (1987) (1-3) Mannis <i>et al.</i> (1986) (2) May <i>et al.</i> (1992) (3)
<i>A. hatchetti</i>		X		Cohen <i>et al.</i> (1987) (2)
<i>A. palestinensis</i>	X			Ofori-Kwakye <i>et al.</i> (1986)(1)
<i>A. polyphaga</i>		X		Linguist <i>et al.</i> (1988) (2)
<i>A. rhyodes</i>	X	X		Cleland <i>et al.</i> (1982) (1).

A diferencia de la EAG la Queratitis amebiana afecta a pacientes jóvenes, saludables e inmunocompetentes. En la mayoría de los casos se da de manera unilateral, es decir en un solo ojo (Auron, 1987). Difícilmente se le toma en cuenta en los diagnósticos iniciales. Es común que se mencionen a bacterias o virus como responsables del daño en primer término, cuando los tratamientos correspondientes no son efectivos se piensa en segundo término en los hongos como los agentes etiológicos del daño. No es sino después de semanas e incluso meses de haberse establecido la enfermedad cuando se piensa en *Acanthamoeba* y desafortunadamente para ese momento el daño en la córnea ya es grave. Esta patología es progresiva y pocas veces responde a tratamientos antimicrobianos convencionales (Ferrante, 1984).

En México hasta 1992 no se había reportado ningún caso de Queratitis causada por *Acanthamoeba* aunque existen situaciones favorables para la existencia del pedecimiento en cualquier momento este no ha sido tomado en cuenta por los círculos médicos, dando como resultado casos sin resolver y pacientes que han perdido la visión por completo o bien con daños irreversibles en la córnea.

Dada la importancia que representa el hallazgo del **primer caso de Queratitis Amebiana en México** es que se elaboró la presente investigación.

ANTECEDENTES

La historia de las amebas de vida libre da inicio en 1841 cuando Dujardin en Francia, describe por primera vez una ameba pequeña de vida libre a la que denominó *Amoeba limax*.

En 1879 se publicó el primer estudio monográfico sobre las *amebas limax* llamadas así por su apariencia semejante a una babosa. Este trabajo lo realizó Leidy.

En 1892 Flexner reportó a una ameba de vida libre como la responsable de un absceso en una mujer de 60 años de edad en Virginia.

El cambio de centuria fue rico en actividades sobre las amebas, se utilizó el término coprozoicas para designarlas y se la asoció a problemas disentéricos.

En 1925 Drbohlor logró con éxito la axenización de una cepa amebiana.

En 1930 Se estandarizó la técnica de cultivo monoxénico, usando bacteria como fuente de alimento.

Singh en 1950 hace un trabajo importante que sienta las bases de la taxonomía moderna de las amebas de vida libre, basado en la división celular de éstas.

Los acontecimientos históricos más relevantes que marcan otra etapa rica en investigaciones sobre las amebas anfitriónicas se da en 1958 cuando Culbertson al hacer pruebas rutinarias de seguridad de la vacuna de la polio en cultivos celulares de tejido de riñón, observó en algunas placas un efecto citopático sugiriendo una contaminación por el virus. El contenido de estas placas se inoculó en ratones y monos por vía intranasal e intracerebral, los cuales murieron en poco tiempo por una meningoencefalitis. Estudios histopatológicos de los órganos afectados y de las placas mismas revelaron la presencia de organismos ameboideos, los cuales fueron identificados más tarde como *Acanthamoeba castellanii* una ameba de vida libre muy común y que se sabía era saprofítica en la naturaleza. Culbertson a partir de ese momento sugirió la posibilidad de presentarse una infección espontánea en humanos (Culbertson, 1959).

Fowler y Carter en 1965 en Australia reportaron los cuatro primeros casos de infección amebiana originada por amebas de vida libre en humanos, denominada más tarde como Meningoencefalitis Amebiana Primaria (MEAP) aunque con sorpresa se identificó a una ameba del género *Naegleria* como la responsable del daño y no una del género *Acanthamoeba* como se pensó en un principio.

Hasta el momento se han descrito 138 casos de MEAP en todo el mundo (Martinez, 1990).

En 1960 se asoció a *Acanthamoeba* con enfermedades del tracto respiratorio.

Al iniciar la década de los setentas se presentó el primer caso de Acanthamebiasis en cerebro, cuando Kenney en 1971 siguiendo a un paciente cuyo suero tenía un título alto de anticuerpos contra *Acanthamoeba culbertsoni*, reportó que al morir el paciente de granulomatosis cerebral, amebas semejantes a *Acanthamoeba* fueron encontradas postmortem en las secciones de cerebro.

Más adelante Jager y Stamm en 1972 encontraron un granuloma cerebral en un paciente con linfoma de Hodgkin y usando la prueba de inmunofluorescencia indirecta y suero de conejo Anti-*Acanthamoeba* demostraron la presencia del organismo en las secciones de cerebro.

Acanthamoeba causa encefalitis de tipo crónico y generalmente en individuos inmunocomprometidos, enfermos crónicos, alcohólicos, aunque puede atacar sitios inmunoprivilegiados como la Córnea de individuos sanos e inmunocompetentes y así causar úlceras y queratitis (Rondanelli, 1987).

En 1980 Martínez denominó a la enfermedad provocada por *Acanthamoeba* en el cerebro como Encefalitis Amebiana Granulomatosa.

En general los padecimientos provocados por *Acanthamoeba* son poco frecuentes y sin embargo las consecuencias pueden ser fatales como en el caso de la EAG. Los padecimientos menos agresivos van desde una gastroenteritis, neumonitis, otitis, vaginitis, hasta una simple diarrea. (Rondanelli, 1987).

EPIDEMIOLOGIA DE LA QUERATITIS AMEBIANA

Las infecciones oculares que no involucran a la córnea son extremadamente raras, se ha reportado un solo caso de uveítis relacionado con una meningoencefalitis como una infección secundaria (Visvesvara, 1989).

El primer caso de Queratitis amebiana se reportó en 1973 en EUA; se trató de un hombre de 41 años de edad del sur de Texas con un traumatismo corneal y exposición de agua contaminada en su ojo.

Hasta la fecha son ya más de 400 los casos descritos en la literatura en todo el mundo (Steher, Green; 1989) (Mapa No. 1).

De 1973 a 1981 solamente se reportaron 5 casos. Este número se incrementó de 1981 a 1984, y la cifra aumentó considerablemente de 1985 a la fecha (Gráfica No. 1).

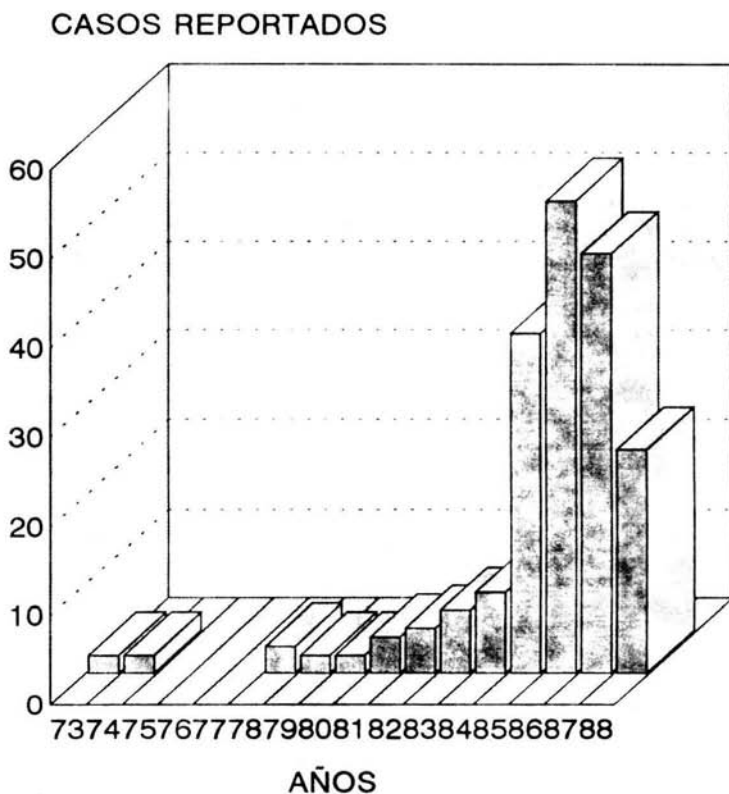
De Jonckheere y cols. (1989) reportaron más de 60 casos de Queratitis amebiana de los cuales 27 se presentaron en Inglaterra, 5 en Noruega, 3 en Francia, 2 en Alemania, y 1 en

MAPA DE LOS CASOS DE QUERATITIS EN EL MUNDO



GRAFICA 1

CASOS DE QUERATITIS AMEBIANA EN E.U.A.



(Stehr-Green, 1989). Casos reportados de 1973 hasta junio de 1988

Suiza. En Japón se han reportado hasta la fecha 7 casos (Endo, 1989) y 1 caso en Brasil

No cabe duda que EUA es el país con mayor número de casos difundidos en diversas revistas, ya que entre 1973 y julio de 1988 se detectaron 208 casos. (Visvesvara, 1989).

FACTORES DE RIESGO EN LA QUERATITIS AMEBIANA

De los casos mencionados aproximadamente el 85% de las infecciones se asocia con usuarios de lentes de contacto (Kilvington, 1990). Un 30% de los casos corresponde a pacientes con algún traumatismo corneal con introducción de un cuerpo extraño y el 2% que resta no presenta asociación o razón aparente de su presencia (Visvesvara, 1989).

Ahora bien basados en el hecho de que *Acanthamoeba* es un organismo cosmopolita y que es relativamente fácil aislarla de las soluciones preservadoras de lentes de contacto de usuarios tanto asintomáticos como sintomáticos de Queratitis amibiana (Larkin, 1990) además de los hábitos higiénicos inadecuados que propician la preparación de soluciones caseras contaminadas, lo que constituye un factor de riesgo muy importante para los usuarios de lentes de contacto (Stehr, 1987).

Los lentes de contacto blandos son más susceptibles a ser contaminados por las amebas, el material del cual se elaboran juega un papel importante, ya que se ha probado que los trofozoitos se adhieren con facilidad a estos (Stehr- Green 1989); (Thomas, 1989); (Moore, 1991) . (Tabla No. 3)

TABLA 3

TIPO DE LENTES DE CONTACTO ASOCIADOS A LA QUERATITIS AMEBIANA

TIPO DE LENTE	PORCENTAJE DE CASOS
Lentes de contacto suaves de uso diario	56 %
Lentes suaves de uso prolongado	19 %
Lentes suaves de tipo desconocido	6 %
Lentes rígidos permeables al gas	7 %
Lentes rígidos	2 %
Otro tipo de lentes	11 %
	total 100 %

PATOGENICIDAD DE *ACANTHAMOEBIA*

No obstante la amplia distribución en el mundo de este organismo existen factores que marcan la pauta para considerarlos como oportunistas y patógenos cuando se presentan las condiciones ideales para su desarrollo en el hospedero (Visvesvara, 1991).

La patogenicidad depende de la biología del organismo específico así como de los hábitos higiénicos y del estado inmunológico del individuo. (John, 1993).

Niederkon en 1992 al hacer un estudio comparativo con dos cepas correspondientes a *Acanthamoeba castellanii* una procedente del suelo y otra de un caso de Queratitis amebiana encontró diferencias significativas entre ambas a pesar de ser organismos de la misma especie, así pues la cepa procedente del caso de Queratitis amebiana fue capaz de adherirse al epitelio corneal y provocar lesión en éste, activaron en gran medida la producción de plasminógeno además de inducir un efecto citopático en el epitelio corneal, lo que no sucedió con la cepa procedente del suelo, lo que indica que el potencial patógeno de estas amebas varía incluso en individuos de la misma especie según el hábitat donde se desarrollan.

Se ha demostrado que la actividad colagenolítica en *Acanthamoeba castellanii* es la responsable de la ruptura del epitelio estroma que propicia la infiltración de neutrófilos (Yu Guang, 1990).

Además de las patologías mencionadas en párrafos anteriores, se ha asociado recientemente a *Acanthamoeba* con el llamado "Síndrome de enfermedades en lugares encerrados" que se caracteriza por una variedad de síntomas como:

Trastornos respiratorios, fiebre, disnea y náusea

No obstante se desconocen los mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba* en este síndrome en particular.

En lo que se refiere a la Queratitis amebiana se ha propuesto un posible mecanismo de patogenicidad específicamente en usuarios de lentes de contacto blandos: Al parecer el material del cual están hechos propicia la adherencia en la córnea (polimetil acrilatos y copolímeros hidrofóbicos).

Puerta de entrada de la Queratitis amebiana.- El epitelio corneal es la única puerta de entrada, hasta el momento no se han reportado casos de invasión secundaria a la córnea de lesiones en el sistema nervioso central o de otros órganos afectados.

Periodo de incubación.-Este varía de acuerdo con la especie y el tipo de lesión que se presenta en la córnea.

Se considera que para que se establezca la ameba en la córnea ésta reciba un traumatismo

menor o bien los trofozoitos estén bien adheridos al lente de contacto blando. Desafortunadamente muchos pacientes reciben instrucciones deficientes del modo en el cual deben hacer uso de sus lentes de contacto y de los sistemas de desinfección, así que es frecuente encontrar personas que los "limpian" con sus propia saliva sin saber que ésta pueda ser un medio de contaminación del lente de este tipo de organismos oportunistas.

Por otra parte, los sistemas de desinfección y las soluciones preservadoras han probado ser efectivas contra bacterias más no contra amebas, las cuales en realidad no eran tomadas en cuenta como posibles patógenos de la córnea (Steven, 1987).

Las lentes de contacto comprometen la superficie corneal al evaporarse los líquidos de esta evitando la acción de lisozimas y beta lisinas (Lemp, 1990). Moore, (1990) propuso

un mecanismo de patogenicidad de *Acanthamoeba* en usuarios de lentes de contacto. De igual modo John en 1989 indicó algunos pasos importantes en la invasión de estos organismos en la córnea. (ver diagramas)

CUADRO CLINICO DE LA QUERATITIS AMEBIANA

La infección por lo general se presenta en individuos sanos, jóvenes e inmunocompetentes. Casi siempre se presenta de manera unilateral, no obstante se han reportado casos donde la infección involucró a los dos ojos.

Los síntomas incluyen:

enrojecimiento

sensación de cuerpo extraño

fotofobia

conjuntivas enrojecidas

presencia de nódulos esclerosantes (Moore, 1986).

También se puede presentar ptosis reactiva, el epitelio corneal puede permanecer intacto en el curso inicial de la enfermedad o bien puede haber pseudodendritas (Johns et al., 1987), de igual modo casi siempre se presenta un infiltrado anular en diferentes formas según el caso. El epitelio que cubre el infiltrado puede permanecer intacto o bien pueden presentarse erosiones recurrentes, las cuales son difíciles de tratar. El infiltrado anular es considerado como signo patognomónico de la enfermedad (Mathers, 1987). Lesiones satélites pueden aparecer, incluso anillos dobles. Cuando la infección progresa el estroma corneal se pierde y se forma un descematocele (Manis, 1986).

Las ulceraciones corneales llegan a progresar tanto que prácticamente la perforan (Lindquist et al, 1988)

POSIBLES MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE LA QUERATITIS AMEBIANA EN USUARIOS DE LENTES DE CONTACTO. MOORE, (1990)

Traumatismo menor en córnea o simplemente la presencia de la lente en el ojo por tiempos prolongados

Lentes de contacto contaminadas



Adherencia de la ameba en la córnea



muchos organismos
y-o
alta virulencia



Queratitis de difícil resolución



Queratoplastía

Lentes de contacto no contaminadas



Utilización de agua contaminada

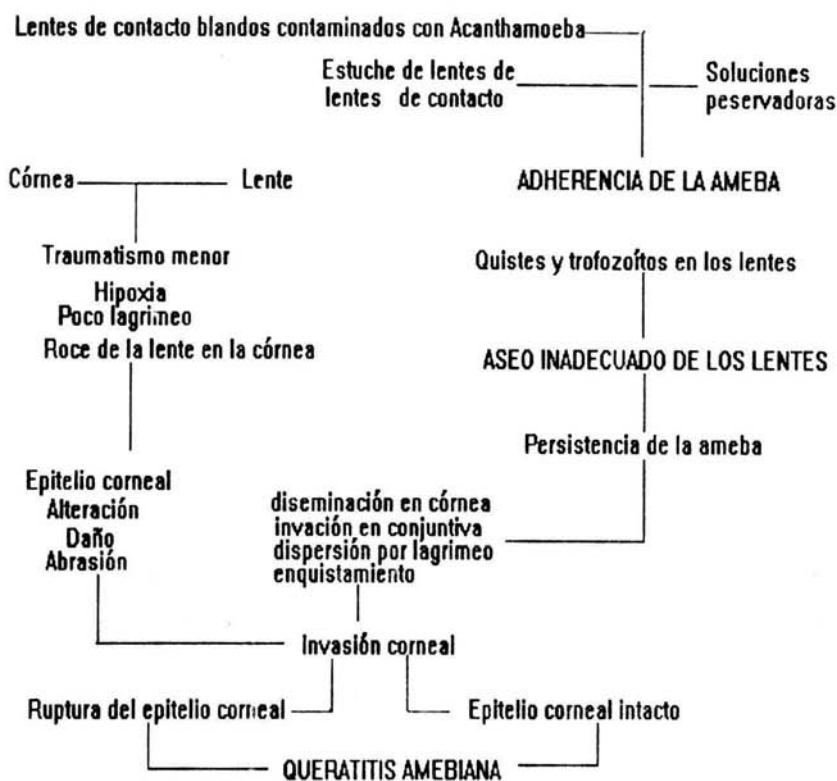


pocos organismos
y-o
poca virulencia



Queratitis de rápida resolución

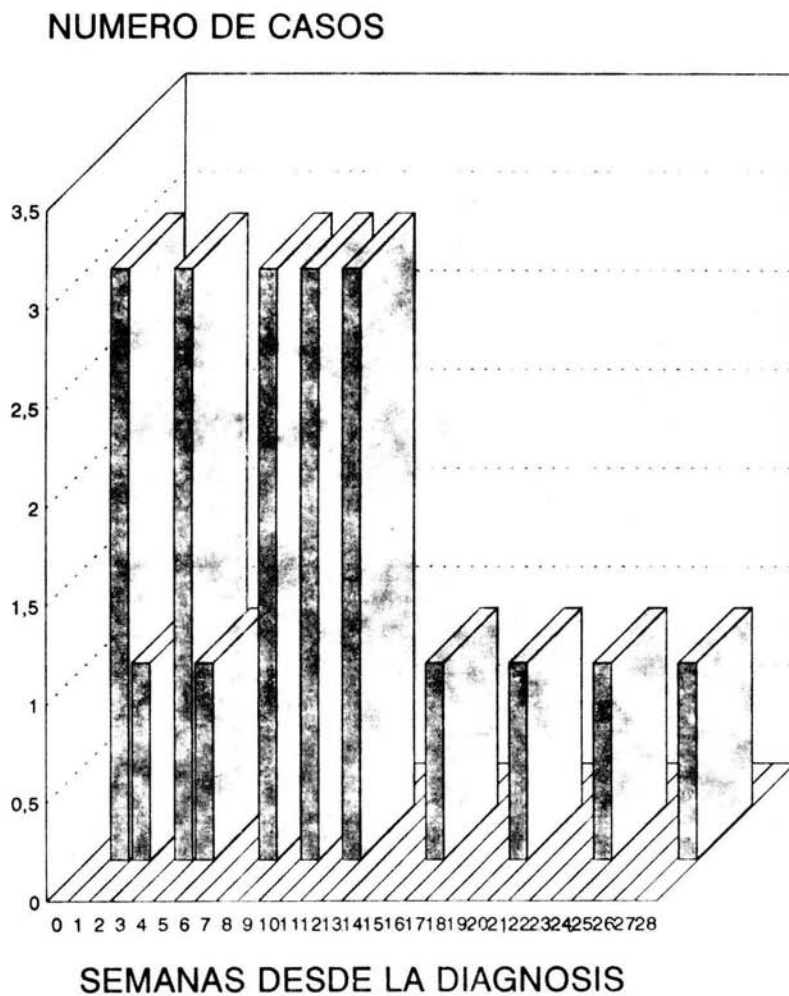
Mecanismos de patogenicidad según John



DIAGNOSTICO CLINICO

Difícilmente se toma en cuenta a la Queratitis amebiana en los diagnósticos diferenciales iniciales. Es común que se mencionen a bacterias o virus como los responsables del daño en primer término, cuando los tratamientos no son efectivos se piensa en los hongos como los agentes etiológicos de la patología. No es sino después de semanas e incluso meses de haberse establecido la enfermedad cuando se piensa en *Acanthamoeba* y desafortunadamente para entonces el daño en la córnea es bastante grave (Cohen et al., 1985)(Gráfica 2).

GRAFICA 2 RETRASO EN LA DIAGNOSIS



Comúnmente también se llega a diagnosticar como un Herpes simplex probablemente por la apariencia no supurativa del estroma, con el epitelio intacto o la formación de la pseudodendritas. (Mannis, 1986).

Muchas ocasiones aunque se incluya a *Acanthamoeba* en los diagnósticos iniciales, éste es difícil de confirmar. Si se hacen raspados superficiales de la córnea lo mas seguro es que no aparezcan *Acanthamoebas* en ellos, más aún si el daño está localizado en el estroma y el epitelio superficial se ha restablecido después de haber sufrido algún trauma o algún cuerpo extraño ha sido extraído del mismo. (HamM, 1988).

Para poder emitir un posible diagnóstico a los raspados corneales se les puede teñir con las técnicas de: Giemsa, Wright, Gram, Calcoflúor blanco; este último es el más recomendable para poder observar a los quistes y trofozoitos. También pueden utilizarse anticuerpos fluorescentes. Es importante recalcar que las técnicas tradicionales de tinción nos dan resultados muy pobres. (Wilhelmus, 1986).

Es recomendable hacer biopsias corneales en aquellos casos donde la sospecha de la presencia de *Acanthamoeba* sea muy alta. (Kathleen, 1988).

Por otra parte si el paciente es usuario de lentes de contacto, éstas y las soluciones preservadoras deben ser analizadas para buscar bacterias, hongos y por supuesto *Acanthamoeba*. Las soluciones preservadoras pueden filtrarse con membranas que tengan poros de 5.0 micras posteriormente el filtro se coloca en una caja con el medio adecuado para su crecimiento. Si el cultivo resulta ser positivo para *Acanthamoeba*, estos organismos migran hacia el agar y son fácilmente reconocibles bajo el microscopio. (Donzis, 1989).

Cuando en un inicio no se toma en cuenta a *Acanthamoeba* como el agente etiológico del daño se hace necesario un trasplante de córnea, por lo que se recomienda que una porción de ésta se coloque en solución salina estéril y conservarla a una temperatura ambiente hasta ser llevada al laboratorio para cultivarla en una caja de Petri con medios específicos, esperando la proliferación de los microorganismos después de 24 horas. De igual modo otra fracción de la córnea extraída se debe utilizar para hacer estudios histopatológicos, microscopía electrónica, inmunofluorescencia y la técnica de tinción con Calcofluor blanco. (Moore, 1990), (John, 1993).

TRATAMIENTO

El tratamiento óptimo para erradicar a la Queratitis Amebiana no se ha encontrado, más bien es controversial ya que, muchas veces se duda en dar tratamiento médico en espera de reducir el número de organismos para realizar una queratoplastia penetrante o bien efectuar primero la queratoplastia penetrante en un inicio del padecimiento para remover mecánicamente a todos los organismos. El verdadero problema radica ahí precisamente en poder eliminar a todos los organismos, recordemos que estas amebas anfizoicas presentan

la capacidad de enquistarse cuando las condiciones del medio les son adversas, así que si no se eliminan todos los agentes del daño cuando las condiciones son las ideales para su desarrollo estas exquistas y pueden proliferar de nuevo con la gran desventaja para el paciente que el tejido corneal ha sido removido y un segundo trasplante puede efectuarse con un gran riesgo de que vuelva a contaminarse y de este modo lo más factible es que el paciente pierda la visión por completo.

Son pocos los fármacos que actúan contra *Acanthamoeba*. La fase quística juega un papel muy importante puesto que ayuda a resistir a gran cantidad de compuestos químicos, lo que hace que la patología sea difícil de erradicar y las terapias lleguen a prolongarse por mucho tiempo.

Las pruebas de sensibilidad a fármacos revelan que pocos son los agentes químicos efectivos en contra de *Acanthamoeba*, incluso algunos llegan a ser efectivos in vitro más no in vivo. Por mencionar algunos tenemos:

- Neomicina
- Bacitracina
- Polimixina B
- Paromomicina
- Miconazol
- Isocianato de Propamidina
- ketoconazol
- Corticoesteroides

El primer reporte de un caso de Queratitis Amebiana tratado con éxito fue publicado por Wright en 1985 y la quimioterapia consistió en una combinación de dibromopropamidina e isocianato de propamidina además de gotas de neomicina. Cabe mencionar que otros autores han probado con éxito este tratamiento (Cohen, 1987., Linquist, 1988., Moore, 1989). Otro tratamiento que ha logrado ser efectivo en algunos casos es la utilización de propamidina y miconazol tópicamente y ketoconazol de manera sistémica (Whilhelmus, 1986).

Ishibashi (1990) utilizó con éxito en tres pacientes con Queratitis un antifúngico llamando Itraconazol administrado de manera oral y miconazol de manera tópica.

No obstante las limitantes se recomienda en un inicio utilizar Isocianato de propamidina y polimixina B a intervalos que van desde 15 minutos hasta cada hora, esto durante el día y en las noches combinar polimixina B, Neomicina cada 2 horas en la primera semana, a medida que se observe una respuesta favorable se recomienda reducir las dosis hasta llegar a 4 gotas en un día. (Moore, 1990)

Es muy importante hacer notar a los pacientes de que se trata de una terapia prolongada donde es vital seguir al pie de la letra el tratamiento y no se debe interrumpir la administración de los fármacos. A veces es necesario esperar hasta un año para reducir las

dosis de una a dos veces por día dependiendo de la respuesta clínica.

El uso de corticoesteroides no es muy recomendable, si bien reducen notablemente la inflamación, la supresión de la respuesta inmunológica va en detrimento de la eliminación del organismo. Por otra parte si la terapia se prolonga por mucho tiempo es muy probable que se forme glaucoma o cataratas.

La Queratoplastia si se decide llevar a cabo entonces se recomienda que se haga en un periodo inicial de la enfermedad con el objeto de remover la mayor cantidad de organismos resistentes a los agentes quimioterápicos. Aunque no por ello se debe dejar de administrar fármacos en diferentes dosis y si es necesario probar diferentes esquemas quimioterápicos.

En ocasiones es difícil delimitar la zona donde se encuentran los organismos y a pesar de realizar la Queratoplastia en un inicio, el botón transplantado se contamina.

Se han reportados casos de Queratitis recurrentes en las que el fragmento de córnea del donador se contamina. Estas infecciones secundarias son más difíciles de manejar que las infecciones primarias de manera que es muy factible que se presenten complicaciones (Moore, 1987).

PROFILAXIS DE LA QUERATITIS AMEBIANA

Como ya he mencionado con anterioridad las amebas anfitriónicas se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo del planeta, así que es factible entrar en contacto con ellas en cualquier tipo de medio. Lo importante es tomar las medidas necesarias para evitar que éstas puedan introducirse a la córnea como organismos patógenos. En el caso específico que nos ocupa debemos tomar en cuenta los factores de riesgo de la Queratitis Amebiana:

Presentar alguna lesión corneal
Ser usuario de lentes de contacto
Higiene deficiente de los lentes de contacto

De estos el primero no es posible evitarlo, no así los dos siguientes puntos los cuales dependen de un aseo adecuado y la utilización correcta de soluciones preservadoras de las lentes. A este respecto el comité de infecciones oculares de la Asociación de Oftalmólogos que prescriben lentes de contacto en EUA, ha presentado una serie de recomendaciones entre las que se encuentran las de evitar lavar las lentes con soluciones salinas preparadas en casa, evitar el uso de los lentes mientras se nada o practica algún deporte acuático y evitar ponerlos en la boca y "limpiarlos" con saliva para colocarlos en los ojos de nuevo.

Otras medidas prácticas para la prevención y control de las infecciones oculares incluiría la educación del público, así como un mayor conocimiento de la comunidad médica sobre el

problema potencial que implica el contacto con estos organismos anfibios (Moore, 1988).

Recientemente se han probado sistemas de desinfección en contra de *Acanthamoeba*:

- Desinfección con calor 70°C - 80°C 10 min
- H₂O₂ al 3% durante 2 -3 horas
- Timerosal con edetato al 0.001% durante 4 horas
- Cloruro de benzalconio al 0.005% durante 4 horas
- Clorhexidina al 0.004% durante 1 hora

(Nauheim, 1990)

Kilvington ha demostrado que la desinfección por calor es la más efectiva para poder eliminar a quistes y trofozoitos de *Acanthamoeba* en lentes de contacto, sin embargo algunas casas comerciales sacan al mercado sus productos sin tomar las precauciones debidas.

JUSTIFICACION

En México no se ha reportado ningún caso de Queratitis causada por amebas de vida libre específicamente por *Acanthamoeba* spp.

Considero que los factores que determinan este hecho son:

a) La tasa de morbilidad de la Queratitis amebiana en el mundo es relativamente baja, hasta el momento se han reportado aproximadamente 400 casos. Considero que no obstante sean pocos los casos reportados éstos deben ser tomados en cuenta para evitar que la cifra aumente sobre todo en la población de alto riesgo (usuarios de lentes de contacto).

b) En los círculos médicos de nuestro país hay una falta de difusión de la existencia de estas amebas como organismos oportunistas. Sólo son conocidas por un grupo de investigadores dedicados a su búsqueda, sin embargo los médicos que enfrentan esta patología en realidad desconocen su papel como agentes patógenos.

c) No hay reportes de estudios retrospectivos en nuestro país sobre esta patología. Existe un número elevado de casos sin resolución que podrían arrojar datos interesantes al respecto.

d) Dificultad para efectuar un diagnóstico inicial de certeza, centrada en los problemas para la observación e identificación de estos organismos, mas aún al tratar de llegar a una identificación a nivel de especie.

e) Es común que en nuestro país los diagnósticos no se apoyen en análisis y pruebas de laboratorio específicas. Mas bien se prescriben fármacos para bacterias y hongos como tratamientos iniciales, lo que favorece la proliferación de estos organismos.

En base a los puntos anteriores se sustenta la importancia de la investigación encaminada a la búsqueda de estas amebas anfitriónicas como uno de los agentes etiológicos de la Queratitis, puesto que de lograrse se comprobará su papel como organismos patógenos en nuestro país.

De tal modo que apoyados en este hecho se podrá difundir su existencia, su poder patógeno, las técnicas de aislamiento e identificación que ayuden al diagnóstico oportuno de la enfermedad y dejar abierta la posibilidad de estudios prospectivos que profundicen en la búsqueda de fármacos que hagan posible la recuperación total de las personas que padecen esta patología.

OBJETIVOS

Aislar amebas del género *Acanthamoeba* de los raspados corneales de aquellos pacientes con Queratitis de difícil resolución.

Identificar las amebas aisladas hasta el nivel de especie con los métodos convencionales basados en el análisis morfológico.

Evaluar la patogenicidad de las cepas encontradas por medio de modelos de experimentación en animales.

Enlistar los signos y síntomas mínimos necesarios para elaborar un buen diagnóstico de la Queratitis Amebiana.

Evaluar la sensibilidad de las cepas encontradas a diversos fármacos.

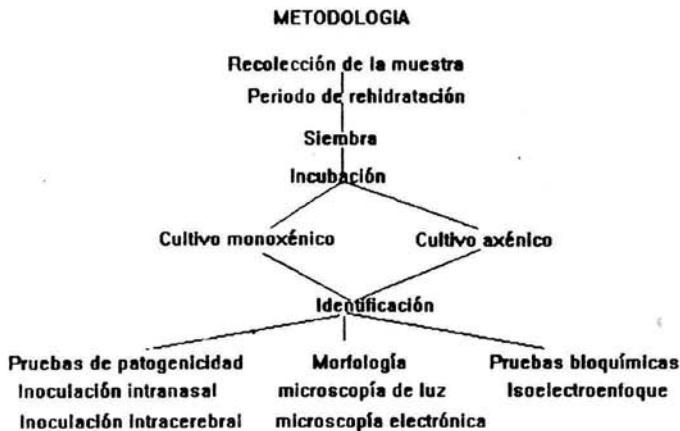
MATERIAL Y METODOS

Esta investigación se realizó en conjunto con el Hospital "Asociación para evitar la ceguera en México". "Dr. Luis Sánchez Bulnes" a través de un convenio de colaboración donde periódicamente se colectaron las muestras de pacientes con sospecha de padecer una Queratitis Amebiana. Para ello establecimos los signos y síntomas más característicos del padecimientos para tomarlos como criterios de partida para el rastreo:

Severo dolor ocular
Sensación de cuerpo extraño
Fotofobia
Tratamiento antimicrobiano sin resultado positivo (de un mes o más tiempo)
Presencia de un infiltrado anular
Ser usuario de lentes de contacto
Traumatismo corneal
Presencia de hipopión
Enrojecimiento de las conjuntivas

Cada una de las muestras fueron tomadas por los oftalmólogos con un hisopo, espátula o bien cuando los raspados debían ser más profundos se hizo necesaria la utilización de un bisturí.

La toma de las muestras se hicieron a través de la observación corneal con lámpara de hendidura para evitar en lo posible provocar una lesión mayor de la que ya se tenía.
(ver diagrama metodológico)



OBTENCION DE LAS MUESTRAS EN MEDIO BASAL DE BOLD

Las muestras obtenidas se depositaron en tubos de vidrio de 100mm x 10mm con 1ml de medio Basal de Bold, utilizado como medio de transporte. Este medio líquido contiene los nutrientes mínimos necesarios para la sobrevivencia de las amebas. (ver apéndice)

Las muestras obtenidas se mantuvieron a temperatura ambiente hasta su traslado al laboratorio.

MEDIOS DE CULTIVO

La utilización de medios de cultivo permite la observación de estos protozoarios bajo un medio ambiente controlado, facilita su observación e identificación. La observación de estos organismos en condiciones de experimentación permite obtener una gran cantidad de organismos en formas tróficas y quísticas y de este modo se pueden llevar a cabo diversos estudios sobre la biología de estas amebas anfitriónicas.

Medio monoxénico (NNE) .- Las muestras contenidas en el medio de transporte se centrifugaron a 2500 RPM durante 10 min, para sembrar el contenido de los tubos en placas de agar no nutritivo, enriquecido con bacteria *Enterobacter aerogenes* muerta. Este medio se conoce como NNE y se prepara con los componentes de la solución salina de Neff y agar bacteriológico a una concentración de 1.5% (De Jonckheere, 1984) (ver apéndice).

Las cajas se dejaron a temperatura ambiente para su posterior observación bajo el invertoscopio (24 horas más tarde).

Cuando se observó crecimiento amebiano se procedió a la axenización de la cepa en cuestión.

Medio axénico.- El proceso de axenización es de vital importancia para poder hacer una evaluación de las cepas encontradas ya que es necesario mantenerlas en cultivos puros para determinar su patogenicidad, pruebas isoenzimáticas etc., Estos medios contienen sales, una fuente de carbono, aminoácidos, glucosa y suero fetal de bovino. Cuando el crecimiento no es el óptimo se hace necesario enriquecerlo con vitaminas e incluso con ácidos nucleicos para favorecer el desarrollo de estas amebas. Por otra parte, con el fin de evitar contaminación bacteriana en este tipo de cultivos axénicos se adicionan antibióticos al medio, seleccionando aquellos que no tengan un efecto tóxico para las amebas de vida libre. Comúnmente se utiliza a la penicilina G sal sódica, estroptomina y kanamicina en concentración de 200mcg-ml (Martínez, 1985).

El medio que se utilizó fue el PBSGM -Chang modificado- (ver apéndice).

DESCRIPCION BIOLOGICA DE LOS ORGANISMOS

IDENTIFICACION DE LOS ORGANISMOS - La identificación de las amebas encontradas en los raspados oculares se realizó a través de los siguientes pasos:

MICROSCOPIA DE LUZ

Con la ayuda del microscopio de contraste de fases (Zeiss Mod III) se observaron las formas tróficas y quísticas de las amebas de tal forma que se pudieron seguir a los organismos en diferentes momentos.

Las muestras se obtuvieron después de hacer un barrido de las cajas de petri con medio NNE con solución de Page o de Ringer para evitar un choque osmótico.

MORFOMETRIA

Esta fase consiste en la medición de los trofozoítos y los quistes, para ello se observaron a través del microscopio de contraste de fases con el aumento seco fuerte. Se midieron un total de 100 trofozoítos y 100 quistes.

A los trofozoítos se les midió la longitud, anchura, así como el diámetro del núcleo. A los quistes se les midió su diámetro. Se hizo un promedio de los valores así obtenidos.

ELABORACION DE MICROCULTIVOS

Esta técnica de microcultivos en cámaras de Pussard se utilizó para observar los diferentes tipos de división celular con el objeto de ubicar taxonómicamente a las diferentes familias de amebas. Sin embargo, en este caso se observó solamente la división celular puesto que la morfología quística nos indicó la familia a la cual pertenecían los organismos encontrados (Acanthamoebidae) (ver apéndice).

PRUEBAS DE TEMPERATURA

Las pruebas de temperatura se llevan a cabo tomando en cuenta que estos organismos de vida libre se desarrollan en hábitats con temperatura diferentes y se ha observado que las amebas patógenas crecen mejor a temperaturas de incubación altas, mientras que otras especies de vida libre lo hacen a temperaturas inferiores. La mayoría de las cepas patógenas son termófilas (Martinez, 1985).

Las temperaturas a las que se observaron las cepas encontradas fueron:

Temperatura ambiente

30°C

37°C

40°C

42°C

La observación se llevó a cabo diariamente en el microscopio de luz. Para observar mejor se utilizaron las cajas con medio monoxénico (NNE). Las pruebas se realizaron por triplicado.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA

Si bien la identificación bioquímica no estaba contemplada en los objetivos del presente trabajo, Consideré necesario hacerla puesto que, a pesar de que la taxonomía de estos organismos este basada en la morfología quística, ésta más bien hace evidente las características genéricas más no las específicas, esto es que la doble pared del quiste y los acantópodos son característicos del género *Acanthamoeba*, sin embargo, para hacer una diferenciación a nivel de especie se hace necesaria la utilización de técnicas isoenzimáticas como apoyo al diagnóstico morfológico. De este modo la identificación de los organismos encontrados es más certera.

La prueba de isoelectroenfoque se basa en la comparación de patrones enzimáticos de las cepas encontradas en los raspados oculares llamadas "cepas problema" con las cepas de referencia.

Esta prueba consiste en la separación de los diferentes componentes de una enzima sobre un sustrato de agarosa con un anfolito. Al hacer pasar una corriente eléctrica de alto voltaje sobre este sustrato y una muestra de amebas, por las propiedades del anfolito, se genera un gradiente de pH hasta alcanzar su punto isoeléctrico.

Con un revelador enzimático adecuado se pueden hacer visibles las bandas de enzimas que responden a un sustrato específico haciendo evidentes aquellas enzimas que sean de utilidad para la identificación de las amebas.

De tal manera que las enzimas de cada organismo pueden ser analogadas con una huella digital. Si una ameba muestra un patrón enzimático semejante a otra ameba, existe una gran probabilidad de que ambos organismos pertenezcan a la misma especie.

Se hicieron pruebas para las siguientes enzimas según el procedimiento descrito por De Jonckheere (1982):

Fosfatasa ácida (FA)

Propionil esterasa (PE)

Alcohol deshidrogenasa (AlcDH)

(ver apéndice No.5)

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Las pruebas de patogenicidad en ratones son de gran utilidad para poder evaluar el daño potencial que las amebas anfitrónicas son capaces de provocar en el ser humano. De tal manera que en el laboratorio es posible hacer un seguimiento de las manifestaciones clínicas que los animales en estudio presentan, así como el tiempo que las amebas tardan en provocarlos, e incluso el tiempo que transcurre entre las inoculaciones y la muerte de estos animales -cuando esto ocurre- y poder determinar el poder de patogenicidad de estas amebas. Así de un modo indirecto podemos determinar la capacidad de provocar daño de estos protozoos al estar en contacto con el ser humano y las condiciones para su desarrollo sean las adecuadas.

La prueba se llevó a cabo en dos fases:

Inoculación intracerebral

Inoculación intranasal

Inoculación intracerebral. - La prueba se inició concentrando las amebas en cultivo con un crecimiento óptimo por centrifugación a 2500 rpm. durante 10 min.

El sedimento se tomó con una jeringa de insulina y se inoculó a un lote de 5 ratones machos de 3 semanas de edad por cada una de las cepas encontradas en los raspados oculares. A cada uno de los ratones se les inoculó un volumen de 0.02 ml del concentrado de amebas, este concentrado nunca fue menor de 10 000 amebas (las amebas fueron contadas con un hematocítmetro)

La inoculación intracerebral se hace a través de los huesos parietales o de la articulación intraparietal, hacia la línea media del cráneo o a la altura de las orejas.

Inoculación intranasal. - El procedimiento a seguir es el mismo que en el caso anterior para la concentración de las amebas. Con una jeringa de 1 ml se ponen 2 gotas (0.02ml) de la suspensión de amebas en los orificios nasales de otro lote de 5 ratones.

Los ratones inoculados por las dos maneras se vigilaron diariamente para observar cambios en sus comportamiento y determinar las manifestaciones clínicas de la patología si es que ésta se presentaba. Se llevó un registro de la ingesta de agua, de los movimientos, respiración, sudoración, reflejos y la fecha del fallecimiento.

A los ratones que murieron en un período comprendido dentro de 21 días contados a partir del momento de la inoculación se les extrajo el cerebro cuando la inoculación se realizó de manera intracerebral y se extrajeron los siguientes órganos cuando la inoculación fue intranasal: cerebro, hígado, pulmón y riñón, para después sembrarlos en cajas de petri con medio NNE a una temperatura de 30°C para recuperar a estas amebas de los diferentes órganos y considerar que éstas fueron las responsables del daño causado a los ratones.

Cuando los ratones no murieron dentro del periodo de 21 días se sacrificaron y también se les extrajeron los órganos y se sembraron de la misma manera.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FARMACOS

(Com.per.Kilvington,1990)

Esta prueba no estaba contemplada en los objetivos iniciales de mi trabajo; sin embargo, considero que es una prueba de gran importancia y es prioritaria, ya que de ella depende en gran medida la resolución del problema de los pacientes que padecen la Queratitis Amebiana, más aún si no existe un fármaco de elección efectivo para detener su avance en la córnea.

Se eligieron algunos fármacos que habían sido probados al menos in vitro con cierta efectividad contra *Acanthamoeba*. Los antibióticos utilizados y las concentraciones que se probaron fueron:

Clorhidrato de Tetraciclina 25, 50, 100, 250 y 500 mcg-ml

Trimetoprim-Sulfametoxazol 18, 25, 50, 100 y 250 mcg-ml

Tobramicina 4, 8, 25, 50 y 100 mcg-ml

Ketoconazol 4, 8, 25, 50 y 100 mcg-ml

Itraconazol 4, 8, 25, 50 y 100 mcg-ml

Isocianato de propamidina

Pentamicina

Además se probaron los efectos de dos plantas medicinales:

La flor de Jacaranda acutifolia.

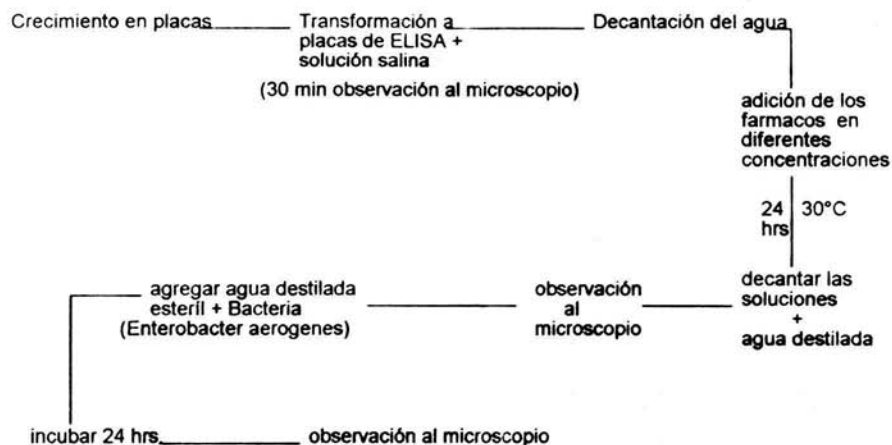
La corteza de Catela tortuosa (las cuales se tenía referencia de ser útiles amebicidas).

Estos extractos fueron diluidos del siguiente modo:

Los extractos de estas plantas medicinales fueron obtenidas en los laboratorios de Productos Naturales de la ENEP Iztacala.

Esta prueba es de tipo semicuantitativo. La metodología que se presenta en el siguiente diagrama de flujo:

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FARMACOS



El proceso se hace por triplicado con quistes y trofozoítos

RESULTADOS

Se hicieron observaciones de 200 raspados corneales de pacientes con sospecha de padecer una Queratitis amebiana procedentes del "Hospital Asociación para evitar la ceguera en México" con base en los signos y síntomas previamente establecidos.

Se encontraron 3 casos positivos donde se observó crecimiento amebiano. El primero correspondió a la muestra No. 142, el segundo muestra No. 192 y el tercer caso correspondió a la muestra 198.

La mayoría de los raspados oculares observados correspondió a pacientes con infecciones de tipo bacteriano, le siguieron las infecciones producidas por hongos y en menor proporción los casos sin agente etiológico aparente (Gráfica No. 3).

Encontramos que en algunos casos las bacterias presentes en los raspados correspondían a especies que forman parte de la flora normal de la córnea que por alguna razón se desarrollaron de modo inusual y causaron daño a las personas; las especies consideradas como flora normal son:

Staphylococcus epidermidis
Corynebacterium spp.

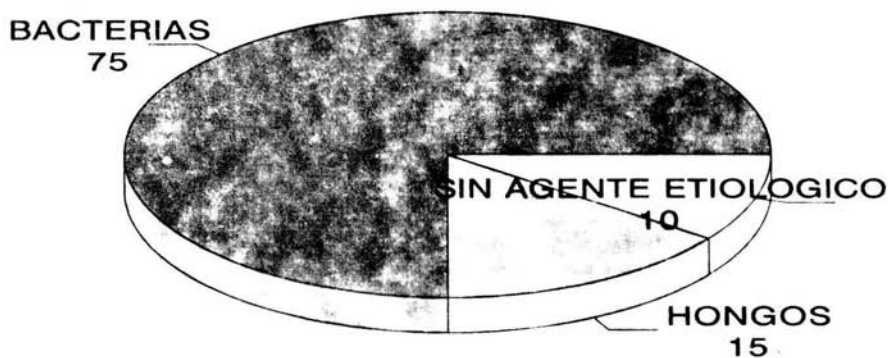
Es importante mencionar que se modificó la metodología en cuanto a la obtención de las muestras. En un inicio las muestras se transportaron en tubos con medio basal de Bold de la primera muestra a la número cien, a partir de esa muestra lo que se llevó a cabo fue el depósito del raspado corneal directamente en las cajas con los medios de cultivo correspondientes después de haber realizado la toma de la muestra.

TINCIÓN CON CALCOFLUOR BLANCO

Parte del raspado corneal fue teñido con Calcoflúor blanco (ver apéndice). A través del microscopio de fluorescencia se observaron numerosos quistes y trofozoitos, lo que confirmó el diagnóstico de Queratitis Amebiana.

Es importante destacar que la técnica de tinción con Calcoflúor blanco no estaba contemplada en un inicio del trabajo, sin embargo a través de la literatura nos dimos cuenta de la utilidad de ésta, es por ello que fue utilizada a partir de la muestra No. 142 lo que nos ayudó a confirmar el diagnóstico presuntivo.

GRAFICA 3
AGENTES ETIOLOGICOS DE LA QUERATITIS EN 200 RASPADOS CORNEALES



REPORTE DE LOS CASOS CLINICOS POSITIVOS
DATOS OBTENIDOS DEL HOSPITAL PARA EVITAR LA CEGUERA EN MEXICO
CASO CLINICO No. 1

El primer caso positivo correspondió a una paciente del sexo femenino de 31 años de edad residente en la ciudad de Mexicali Baja California, la cual acudió a consulta en su ciudad natal por presentar enrojecimiento de la conjuntiva y sensación de cuerpo extraño en su ojo izquierdo, se le extrajo un fragmento de plástico y se le trató tópicamente con dexametasona por un periodo de 3 días. Posteriormente se le administró Gentamicina sin éxito, al no encontrar mejoría se le administró Aciclovir de manera tópica y esteroides de manera sistémica, pero sin resultados positivos por lo que se le administró Ketoconazol vía sistémica y Tobramicina y cefalosporina de manera tópica sin lograr ninguna mejoría, más bien se observó que disminuyó considerablemente la visión de la paciente.

Con los antecedentes mencionados acudió al "Hospital Asociación para evitar la ceguera en México" donde se tomaron en cuenta los siguientes signos y síntomas:

- fotofobia
- dolor ocular severo
- disminución significativa de la visión
- presencia de una úlcera paracentral de 3 mm de profundidad
- hipopión
- enrojecimiento de las conjuntivas
- sensación de cuerpo extraño
- infiltrado estromal presente

La presión ocular era normal, el área afectada se encontraba edematizada y el infiltrado estromal abarcó el limbo y el centro de la córnea.

Clinicamente la lesión fue considerada como una infección micótica (Queratomycosis). Se inició el tratamiento con Ketoconazol y Gentamicina sin lograr cambios positivos.

Se tomó la decisión de hacer una debridación corneal con el objeto de buscar los agentes etiológicos del padecimiento, así es que la muestra se colocó en cajas con medios específicos para el desarrollo de bacterias, hongos, y amebas.

El raspado corneal se realizó en el quirófano y la muestra fue tomada con un bisturí y se depositó directamente en las cajas de Petri con los medios correspondientes, mismas que fueron incubadas a 37°C durante 24 horas, después de las cuales se observaron numerosos quistes y trofozoitos.

La presencia de los quistes fue confirmada de inmediato a través de la tinción con Calcoflúor Blanco y la posterior observación al microscopio de Fluorescencia.

Después de la observación de los trofozoitos y quistes en las cajas en incubación y confirmar el papel de las amebas como agentes etiológicos de la Queratitis de la paciente se modificó el esquema terapéutico. Se le administró Itraconazol por vía oral con una dosis de 150 mcg. una vez al día, de manera tópica se administró Tobramicina en gotas (10.6mg-ml) cada dos horas.

Dos días después se practicó una pequeña intervención quirúrgica, la cual consistió en cubrir a la córnea con el tejido conjuntival. Lo que al cabo de dos días redujo notablemente el dolor, por otra parte no se observaron trofozoitos en la conjuntiva necrotizada.

Una semana más tarde el hipopión se redujo casi en su totalidad, así como el dolor y la fotofobia, la úlcera se redujo y su diámetro era de 3 mm aproximadamente.

Catorce días posteriores al tratamiento la úlcera se redujo aún más midiendo 1 mm de diámetro, el hipopión y la fotofobia desaparecieron, por lo que se redujo la administración de la tobramicina a una gota cada 6 horas.

Al mes del tratamiento desaparecieron los defectos estromales y epiteliales y solamente quedó un Leucoma denso. La quimioterapia tópica se suspendió no así el Itraconazol, el cual dejó de administrarse 6 meses después.

Ocho meses más tarde el Leucoma se redujo notablemente y la visión se recobró notablemente.

CASO CLINICO No. 2

El segundo caso correspondió a un paciente masculino de 26 años, originario y residente del Distrito Federal. Sus antecedentes oftalmológicos refieren ser usuario de lentes de contacto blandos, con poco cuidado y aseo periódico y desproteinización.

En su visita inicial refirió los siguientes signos y síntomas:

Dolor intenso, fotofobia y baja agudeza visual considerable, con una evolución de 10 días, se aplicó gentamicina tópica sin referir mejoría.

Exploración ojo derecho: Agudeza visual: visión de bultos.

Conjuntiva: Hiperémica con congestión periquerática xxx.

Córnea: Úlcera redonda, paracentral a las 8, temporal, con estroma superficial infiltrado, lecho ulcerativo limpio, no hay depósitos retroqueráticos.

Cámara anterior: Reacción inflamatoria, consistente en células y flare xx, no se observa hipopión, cristalino intacto, transparente.

Fondo de ojo: el paciente no coopera con el estudio.

Exploración ojo izquierdo: Agudeza visual 20-20.

Segmento anterior y fondo de ojo normales.

En el diagnóstico inicial se pensó en una úlcera bacteriana, secundaria a la mala higiene por el uso de lentes de contacto.

Se tomó un frotis de la córnea y se sembró el material en una caja de petri con medio NNE enriquecido con *E. aerogenes*. Donde se observó crecimiento amebiano a las 24 horas posteriores a la siembra.

Se inició Tratamiento con Tobramicina tópica reforzada cada hora, Itraconazole oral 300 mgs V.O. diariamente.

48 horas post-tratamiento:

Ojo derecho: mismos hallazgos clínicos.

Una semana post-tratamiento:

Ojo derecho se aprecia disminución en el área de defecto epitelial, con menor fijación de fluoresceína.

El infiltrado estromal corneal no sufrió modificación en cuanto a extensión o profundidad, persistiendo la fotofobia.

10 días post-tratamiento:

Mejoría en cuanto a la lesión epitelial, la cual se muestra reducida en extensión, casi sin fijación de tinte de fluoresceína. La lesión estromal no parece haber aumentado en tamaño ni en profundidad, dada esta mejoría epitelial se consideró que la evolución fue muy favorable, no obstante persistió el dolor y la fotofobia.

15 días post-tratamiento:

No se presentó lesión epitelial, la lesión estromal permaneció con un aspecto estable, con una menor opacidad en el estroma, ya no había reacción inflamatoria en la cámara anterior.

La sintomatología desapareció.

Por desgracia el paciente comenzó a ser irregular en sus vistas, continuó su tratamiento con Itraconazole con una dosis de 150 mgs.

60 días post-tratamiento:

El paciente se presentó con sensación de cuerpo extraño, sin prescripción médica se automedicó gotas de esteroides tópicamente, desarrollando descematocele, por lo que se solicitó tejido corneal urgentemente, practicándose un trasplante corneal de emergencia.

El resultado postoperatorio fue muy satisfactorio, se continuó con esteroide tópico, en esta ocasión se indicó el esteroide tópico por el tejido donador ajeno, además de Tobramicina tópica y solo 150 mgs V.O. de Itraconazole.

El trasplante se encuentra claro, con visión 20-20 15 meses post-tratamiento, sin cuadros de repetición de lesión corneal.

CASO CLINICO No. 3

El tercer caso correspondió a un paciente del sexo masculino de 35 años de edad, residente del D.F., sin antecedentes heredofamiliares y personales patológicos de importancia para el caso.

Los antecedentes oftálmicos refieren ser usuario de lentes de contacto blandos, de 11 años a la fecha, refiriendo buenos hábitos de limpieza, nadó con ellos en piscina 14 días antes.

En su visita inicial refirió los siguientes signos y síntomas:

Dolor muy intenso en su ojo derecho, con 8 días de evolución con baja agudeza visual, por lo que acudió a consulta con un médico general, el cual le indicó esteroides tópicos (Dexametasona), aumentando el dolor y la fotofobia 24 horas después de iniciar el

tratamiento, por lo que acudió a consulta con un oftalmólogo, mismo que lo refirió al Hospital para evitar la ceguera en México, con el diagnóstico de úlcera posiblemente de origen bacteriano.

A la exploración se encontró lo siguiente:

Ojo derecho: Agudeza visual: cuenta dedos a 2 metros.

Córnea: Muestra lesión de 2 mm ulcerada en la región paracentral temporal, con mínima infiltración estromal, bordes epiteliales necróticos. No se presentaron lesiones satélites estromales.

Cámara anterior: Con celularidad aumentada (XX).

Segmento posterior: No valorable.

Ojo Izquierdo: De características normales.

Se tomó frotos y cultivo, dadas las características de excesivo dolor en una lesión pequeña, se sembró la muestra en medio NNE enriquecido con *Enterobacter aerogenes*.

Se inició el tratamiento a base de Tobramicina tópica cada hora 2 gotas y oralmente 300 mgs de Itraconazol.

Dos días después se confirmó la presencia de quistes en las cajas de Petri con *Enterobacter aerogenes*.

72 horas después de iniciado el tratamiento: El paciente refiere menor dolor ocular, persistiendo la fotofobia y la úlcera de 2mm de diámetro, con bordes de aspecto necrótico. Se continuó con el mismo tratamiento.

1 semana más tarde:

la fotofobia era casi nula, el dolor casi había desaparecido por completo, la lesión tenía mejor aspecto en los bordes, además disminuyó la reacción inflamatoria en la cámara anterior.

28 días posteriores a partir de la primer visita al Hospital, se comprobó que el epitelio corneal estaba íntegro, sin lesión estromal. Así mismo la evolución fue asintomática.

Dada la localización paracentral de ésta lesión, la visión es de 20/60 lo cual es muy satisfactorio.

DESCRIPCION BIOLOGICA DE LAS CEPAS RESPONSABLES DE LOS CASOS DE QUERATITIS AMEBIANA

A las cepas responsables de los casos de Queratitis Amebiana se les denominó HCI-1, HCI-2 y HCI-3 respectivamente.

MEDIOS DE CULTIVO

Cultivo en medio monoxénico (NNE) .- Las tres cepas se desarrollaron y crecieron bien en el medio no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes*.

Se hizo un seguimiento del modo en que estas cepas se desarrollaron en las cajas de petri por un periodo de 7 dias.

Se realizó una cuantificación de las amebas por día de crecimiento. La cepa HCI-1 presentó un crecimiento radial, uniforme constante y con gran proliferación amebiana. de tal manera que, un día después de la siembra, las amebas habían salido del cuadro de agar y se encontraban a 0.5 cm de éste y a los 7 días las amebas se encontraban en los extremos de las cajas con el mismo patrón de crecimiento con un 95 % de trofozoitos y un 5 % de quistes aproximadamente. La cepa HCI-2 creció mas bien de manera desordenada, no se presentó un crecimiento radial y uniforme. Al segundo día de la siembra solamente algunas amebas habían salido del cuadro de agar y al tercer día un 60 % de la población estaba enquistada y el otro 40 % estaba formado por trofozoitos dispersos en el medio. La cepa HCI-3 presentó un crecimiento semejante al de la cepa HCI-1, éste fue radial uniforme , constante y con una gran proloferación amebiana. De igual modo al séptimo día de crecimiento en las cajas de Petri la amebas alcanzaban los extremos del agar.

Los quistes fueron viables por un período de un año en el caso de la cepa HCI-1 , la HCI-2 por 4 meses y la cepa HCI-3 por un período de 6 meses. Se dieron diferencias significativas en el crecimiento de las tres cepas a partir del tercer día de su siembra.

Medio axénico.- Para facilitar la descripción biológica de las cepas en cuestión se hicieron siembras de medio monoxénico al medio axénico PBSGM.

Las cepas se adaptaron en un principio con lentitud al medio y poco a poco fueron desarrollandose mas.

Cabe mencionar que el número de trofozoitos en este tipo de medio es menor que en el medio sólido.

IDENTIFICACION DE LOS ORGANISMOS

Para ubicar taxonómicamente a las cepas encontradas se realizaron las siguientes determinaciones:

MICROSCOPIA DE LUZ

Se observaron las formas tróficas y quísticas a través del microscopio de contraste de fases (Zeiss Mod III).

En las tres cepas se observaron los lobópodos y acantópodos, así como las formas quísticas con una doble pared característicos del género *Acanthamoeba*. (ver fotografías).

MORFOMETRIA

Las mediciones de los trofozoitos y de los quistes se llevaron a cabo a través del microscopio de contraste de fases con un aumento de 40 X. Se hicieron mediciones de 100 trofozoitos y 100 quistes.

Los promedios de los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

HCI - 1

TROFOZOITO

Largo	Ancho	Diámetro del Núcleo
-------	-------	---------------------

18 micras	15 micras	2 micras
-----------	-----------	----------

HCI - 1

QUISTE

Diámetro	Número de brazos del quiste maduro
----------	------------------------------------

15 micras	5 -6 brazos
-----------	-------------

HCI - 2

TROFOZOITO

Largo	Ancho	Diámetro del núcleo
-------	-------	---------------------

17 micras	15 micras	2 micras
-----------	-----------	----------

HCI - 2

QUISTE

Diámetro	Número de brazos del quiste maduro
----------	------------------------------------

15 micras	4 - 5 brazos
-----------	--------------

HCI - 3

TROFOZOITO

Largo	Ancho	Diámetro del núcleo
-------	-------	---------------------

17 micras	14.5 micras	2 micras
-----------	-------------	----------

HCI - 3

QUISTE

Diámetro	Número de brazos del quiste maduro
----------	------------------------------------

14 micras	5 - 6 brazos
-----------	--------------

MICROCULTIVOS

Se hizo un seguimiento de estas amebas en los microcultivos durante un periodo de 7 días. A través de las cámaras de Pussard se observó el movimiento de estas amebas, así como la formación de estadios prequísticos y quísticos. Se observó la división celular en ambas cepas. (ver fotografías).

LOCOMOCION

Se observaron los lobópodos característicos de la clase a la que pertenecen las amebas encontradas y las finas proyecciones a lo largo del cuerpo ameboideo que aparecen y desaparecen a medida que se mueven los acantópodos que le dan el nombre al género al que forman parte.

Los movimientos observados son lentos y pareciera ser que no tienen una dirección específica cuando estos organismos se desplazan.

DIVISION CELULAR

La división celular que se observó en las tres cepas es del tipo metamitótico, donde el nucléolo y la membrana celular desaparecen durante la división celular.

La división celular se observó en diferentes momentos a través de las cámaras de Pussard.

QUISTES

Formación de prequistes. - Se comenzaron a observar prequistes entre el cuarto y quinto día de los microcultivos en ambas cepas. Los prequistes son trofozoitos que al disminuir los nutrientes del medio comienzan a adoptar una forma redondeada sin que por ello formen todavía una doble pared característica del género. (ver fotografía)

Formación de quistes. - Los quistes ya formados con su doble pared se observaron a partir del sexto día de haber elaborado los microcultivos.

Se determinó un número de 4 -5 brazos en los quistes de ambas cepas (ver fotografía).

Entre el sexto y séptimo día de haber elaborado los microcultivos, la población en un 95 % estaba formada por quistes, un 4 % por prequistes y el 1% restante por trofozoitos con movimientos más lentos y localizados en los extremos del pozo (tal vez en busca de oxígeno).

PRUEBAS DE TEMPERATURA

Se probó la capacidad de estas cepas para desarrollarse en diferentes temperaturas.

El crecimiento se presentó en mejores condiciones cuando la temperatura era la del ambiente. Temperaturas probadas: T ambiente, 30°C, 37°C, 40°C, 42°C. En lo que se refiere a la T ambiente implica el mantener a las cepas en estudio en el laboratorio, lo que significa que hay variaciones a lo largo del día con el objeto de comprobar la capacidad de las amebas de subsistir en el medio ambiente de la cd. de México

TOLERANCIA A LA TEMPERATURA

HCI - 1

Esta cepa creció mejor a una temperatura ambiente, el crecimiento fue menor a medida que se aumentaba la temperatura, de manera que, a 42°C el crecimiento fue mínimo y rápidamente se enquistaron las amebas.

TOLERANCIA A LA TEMPERATURA

HCI - 2

La forma en la que se comportó ésta cepa de acuerdo a las diferentes temperaturas fue muy irregular. La temperatura ambiente resultó ser la óptima para su crecimiento, sin embargo aún a temperatura ambiente la cepa fácilmente se enquistaba en un periodo de tiempo muy corto (tres días).

TOLERANCIA A LA TEMPERATURA

HCI - 3

Al igual que la cepas anteriores ésta se desarrolló de manera óptima a una temperatura ambiente. El comportamiento fue semejante al de la cepa HCI - 1 , a mayor temperatura, menor crecimiento.

De acuerdo al modo en que se desarrollaron las tres cepas encontradas desprendemos que las tres poblaciones se desarrollan mejor a una temperatura ambiente.

La HCI - 1 presenta un mayor rango de tolerancia a la temperatura, lo que no sucede con la cepa HCI - 2 la cual además de no ser viable a temperaturas mayores de 37°C se enquista en un periodo no mayor de tres días independientemente de la temperatura a la que se esté incubando. La cepa HCI - 3 tolera también rangos amplios de temperatura.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA

A través de las pruebas bioquímicas se ubicaron taxonómicamente las amebas encontradas, las cuales de acuerdo a los corrimientos y las cepas de referencia utilizadas podemos decir sin lugar a dudas que, las cepas HCI - 1 y HCI - 2 corresponden a la especie *Acanthamoeba polyphaga*.

La cepa HCI - 1 presenta similitudes con respecto a las cepas corridas pertenecientes al grupo II , sin embargo no coinciden en su totalidad.

Al encontrar un patrón de corrimiento diferente a los patrones de referencia se envió a la cepa HCI - 1 al laboratorio del Dr. Govinda Visvesvara para su análisis, los resultados que obtuvo coinciden con los nuestros, sugiriendo el Dr. que se trata de una especie diferente a las que hasta el momento se han descrito en las claves de identificación.

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Las pruebas de patogenicidad se llevaron a cabo solamente en las dos primeras cepas, pues en realidad el potencial patógeno de estas ya estaba comprobado al producir un lesión en la córnea de los pacientes afectados.

Se inocularon 4 lotes de ratones machos de 3 semanas de edad a los que se les dividió en dos lotes para su inoculación intracerebral e intranasal respectivamente.

INOCULACION INTRACEREBRAL

HCI - 1

Del lote de cinco ratones dos de ellos murieron al segundo día de la inoculación. Los tres restantes estaban postrados con pocos movimientos y con los reflejos alterados.

Al tercer día después de la inoculación murió el tercer ratón y los dos restantes estaban visiblemente dañados. Uno de ellos con ptosis palpebral izquierda. El consumo de agua fue de 10 ml.

El cuarto y quinto ratón murieron al quinto día después de la inoculación.

A los ratones se les extrajo el cerebro y se colocó en cajas de Petri con medio NNE enriquecido con *Enterobacter aerogenes* para poder recuperar a las amebas. En todos los casos la recuperación fue positiva.

INOCULACION INTRANASAL

HCI - 1

Los cinco ratones murieron según la siguiente tabla:

No. de ratón	Fecha del fallecimiento
1	7 día después de la inoculación
2	9 " " " " " " "
3	12" " " " " " "
4	18" " " " " " "
5	18" " " " " " "

Al segundo día después de la inoculación un ratón presentaba ptosis palpebral en ambos ojos. Los movimientos y la respiración en los demás ratones aparentemente eran normales, de igual modo no se observó sudoración en ellos. Aparentemente el cerebro en estos ratones no sufrió daño.

A estos ratones se les extrajo el cerebro, el hígado, los pulmones y los riñones para evaluar el posible daño en estos órganos por las *Acanthamoebas*.

En el primer ratón solamente se recuperó la cepa del cerebro, del pulmón y del hígado.

De los cuatro ratones restantes se recuperó la cepa de los cuatro órganos extraídos.

Cabe mencionar que el órgano más dañado en todos los casos fue el pulmón.

INOCULACION INTRACEREBRAL HCI - 2

Los cinco ratones utilizados para esta prueba murieron al tercer día después de la inoculación.

Todo el lote presentó las mismas características:

Pocos movimientos

Bajos reflejos

Respiración baja

No presentaban sudoración

La ingesta de agua se redujo al mínimo

A partir del segundo día todos los ratones estaban postrados.

Después de la extracción de los cerebros de estos ratones se observaron las amebas en las cajas de petri con NNE enriquecido con *Enterobacter aerogenes*. De tal forma que la recuperación fue positiva en el 100 % de los casos.

INOCULACION INTRANASAL HCI - 2

En esta prueba solamente dos ratones de los cinco inoculados murieron y tres de ellos sobrevivieron y fueron sacrificados 21 después de haber sido inoculados.

No. de ratón	Fecha del fallecimiento
1	7 día después de la inoculación
2	11 " " " " " " " "
3	* 21 " " " " " " " "
4	* 21 " " " " " " " "
5	* 21 " " " " " " " "

*Estos ratones fueron sacrificados

los dos ratones que murieron bajaron sus reflejos notablemente ,asi como también la ingesta de agua disminuyó considerablemente.

Se extrajeron los órganos de estos ratones y solamente se pudieron recuperar las amebas de los pulmones.

A los ratones que fueron sacrificados se les extrajeron los pulmones, el cerebro, el hígado y los riñones. Sin embargo, en ninguno de estos se pudo recuperar a las amebas.

Los resultados de estas pruebas de patogenicidad se resumen en la tabla No.4

TABLA 4

Cepa HC-1

No. de ratón	Inoculación	No de días de fallecimiento	Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	Intranasal	7	+	+	+	+
2	Intranasal	9	+	+	+	+
3	Intranasal	12	+	+	+	+
4	Intranasal	18	+	+	+	+
5	Intranasal	18	+	+	+	+
1	Intracerebral	1	+			
2	Intracerebral	1	+			
3	Intracerebral	2	+			
4	Intracerebral	4	+			
5	Intracerebral	4	+			

Cepa HC-2

No. de ratón	Inoculación	Días de fallecimiento	Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	Intranasal	7	-	-	-	-
2	Intranasal	11	-	-	-	-
3	Intranasal	-	-	-	-	-
4	Intranasal	-	-	-	-	-
5	Intranasal	-	-	-	-	-
1	Intracerebral	3	+			
2	Intracerebral	3	+			
3	Intracerebral	3	+			
4	Intracerebral	3	+			
5	Intracerebral	3	+			

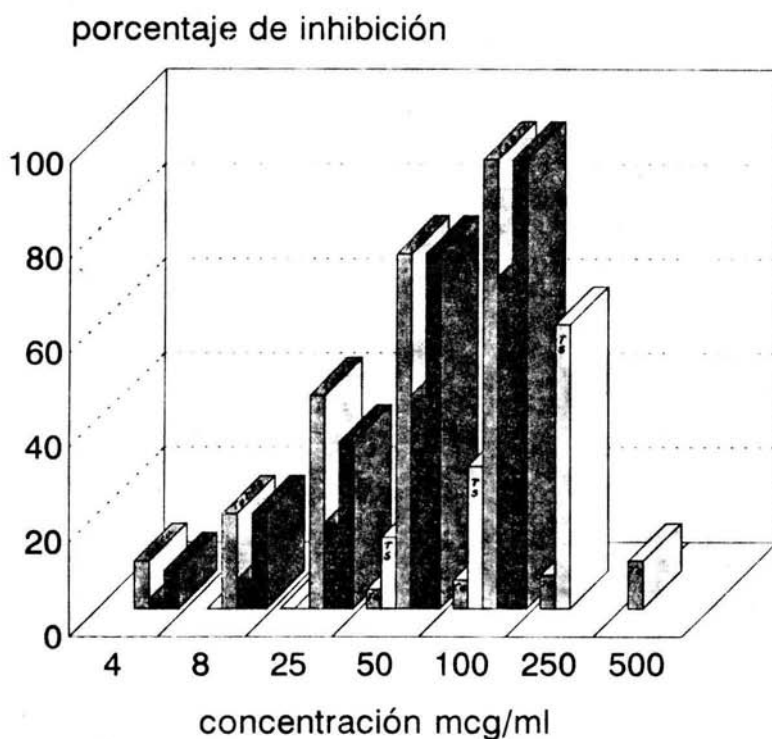
PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FARMACOS

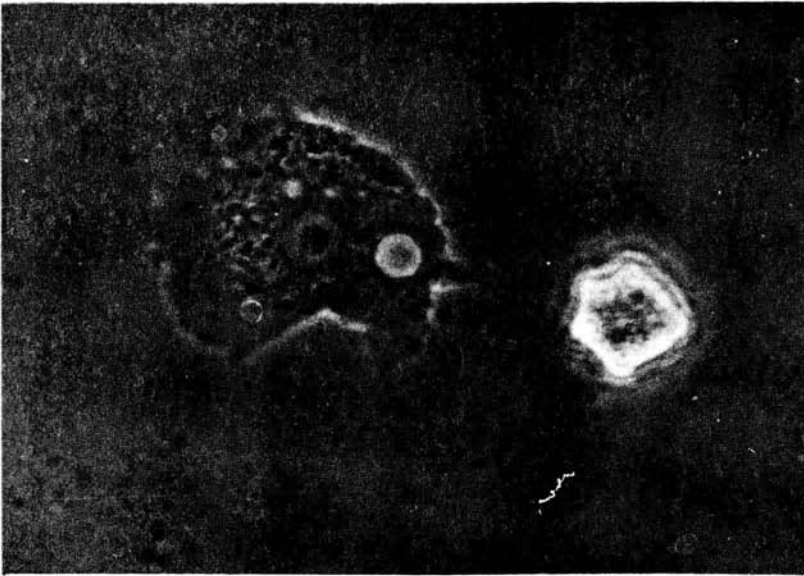
Estas pruebas solamente se realizaron en las primeras dos cepas encontradas, en la cepa HCI - 3 no se hicieron las pruebas in vitro puesto que, se administraron los fármacos efectivos contra las cepas anteriores directamente en la córnea del paciente (Tobramicina e Itraconazol).

Las evaluaciones de éstos fármacos fueron de vital importancia, de ellas dependió el tratamiento y por consiguiente la pronta recuperación de los pacientes

GRAFICA 4

PRUEBA DE SENSIBILIDAD A FARMACOS





TROFOZOITO Y QUISTE DE Acanthamoeba



ESTADO PREQUISTICO DE Acanthamoeba

DISCUSION

Con base en los resultados obtenidos podemos discutir lo siguiente:

Es importante hacer notar que al inicio de la presente investigación la comunidad médica del Hospital "Asociación para evitar la ceguera en México" se mostró escéptica en su mayoría para considerar a las amebas de vida libre como agentes etiológicos de la patología en estudio, de tal modo que no fue tomada en cuenta en gran parte de los diagnósticos diferenciales iniciales.

TOMA DE LAS MUESTRAS

Encontramos diferencias significativas en los resultados obtenidos cuando los raspados corneales fueron más profundos e involucraron al estroma corneal y fueron tomados en quirófano que cuando se realizaron sólo en el epitelio corneal con un hisopo.

Los resultados nos muestran que los datos positivos se presentaron en los casos donde los raspados fueron más vigorosos y la muestra tomada fue abundante e incluso el instrumento con el que se llevó a cabo el raspado fue diferente (bisturí). Por otra parte influyó el hecho de haber depositado la muestra directamente en las cajas con medio nutritivo para el desarrollo de las amebas.

Medio de transporte.- MEDIO BASAL DE BOLD

Considero que la utilización del medio Basal de Bold no es el medio de transporte adecuado para depositar en los raspados corneales ya que, la cantidad de muestra con la que se contaba era muy escasa y ésta en el caso de portar organismos ameboides era factible que se perdieran en diferentes momentos:

a) Al depositar la muestra en los tubos con medio solamente se ponía unos segundos la espátula, hisopo, o el bisturí utilizado para la toma de la muestra en contacto con éste, de manera que la posibilidad de depositar organismos con esa maniobra eran mínimos.

b) El contenido de los tubos con el medio al ser centrifugado no aseguraba en un 100 % la posibilidad de separación de las amebas de las paredes de vidrio. Tomando en cuenta que sólo se trata de un medio de transporte con los requerimientos mínimos necesarios para la sobrevivencia de las cepas más no óptimos para el desarrollo y división celular de los organismos. Así es que el número de organismos (si es que los había) debió ser muy bajo corriendo el riesgo de perder la muestra mientras ésta se trasladaba a los medios adecuados para su desarrollo.

c) Observando los resultados vemos que las muestras que fueron positivas correspondieron a aquellas donde no fue utilizado el medio Basal de Bold como medio de transporte además de conjuntarse otros factores como la toma de la muestra mencionado con anterioridad.

Por lo ya expuesto considero inadecuada la utilización del medio Basal de Bold para el traslado de muestras de raspados corneales. En su lugar sugiero que los raspados sean depositados directamente en medios nutritivos adecuados que faciliten la proliferación de las amebas. En este caso el medio NNE enriquecido con *Enterobacter aerogenes*.

MEDIOS DE CULTIVO

Medio monoxénico (NNE) .-Este medio sólido fue más propicio para el desarrollo de ambas cepas y permitió la observación más detallada de las mismas, además de dar la posibilidad de hacer una comparación del desarrollo en las cajas con su proliferación en la córnea.

La cepa HCI-1 creció en las cajas con medio NNE de un modo radial, homogéneo y abundantemente. Este comportamiento se presentó de manera similar en la córnea del paciente afectado (caso clínico No. 1), puesto que creció e invadió incluso al estroma en un periodo de tiempo relativamente corto (un mes) con las consecuencias ya mencionadas. La viabilidad de estos protozoos en forma de trofozoitos es importante para su división celular y considero juega un papel importante en los mecanismos de patogenidad de este organismo, puesto que le permite proliferar y ganar terreno en la córnea en poco tiempo. Por otra parte los quistes al permanecer viables por un periodo de tiempo de un año permite que al haber las condiciones propicias para su desarrollo asegure su permanencia en el hospedero por un tiempo prolongado.

La cepa HCI-2 se desarrolló de manera desordenada, sin crecimiento radial y en poca cantidad. Esto coincide también en la manera en la que se comportó en el hospedero, las lesiones que causó no fueron tan aparatosas como en el caso anterior. Al hacer el raspado corneal no se encontraron gran cantidad de organismos y más bien había mayor cantidad de quistes que de trofozoitos.

Esto permitió que la lesión del paciente fuera menos agresiva en un inicio.

El hecho de que los quistes fuesen viables por un periodo de cuatro meses da cierta ventaja para probar un tratamiento óptimo y poder asegurar la total recuperación del paciente en un tiempo relativamente corto.

La manera en la cual se comportó la cepa HCI -3 in vitro también se pudo comparar con la forma en la cual causó daño en la córnea del paciente. En un periodo de tiempo relativamente corto (14 Días) había proliferado en la córnea y causado una lesión estromal.

MICROCULTIVOS

A través de los microcultivos fue posible estudiar la diferenciación celular de las cepas encontradas bajo condiciones ideales. En los cultivos jóvenes se observaron trofozoitos con gran movilidad, en constante división celular. Cuando las condiciones del medio ya no fueron lo suficientemente favorables para su desarrollo se identificaron formas prequisticas

y quísticas. Lo anterior nos mostró la forma de vida que tienen estos microorganismos en su fase exozoica o no parasítica. Es interesante hacer notar que estos microorganismos se desenvuelven de manera óptima en la naturaleza y es sorprendente que cuando encuentran las condiciones apropiadas para su crecimiento como los casos ya expuestos, estos pueden encontrar un medio ideal para su proliferación.

PRUEBAS DE TEMPERATURA

Las cepas al desarrollarse mejor a una temperatura ambiente tienen mayores posibilidades de poder encontrarse con organismos en los que puedan proliferar y causarles daño convirtiéndose en parásitos oportunistas. Los estudios realizados por Rivera y cols. (1987;1992). confirman la posibilidad de encontrar a un gran número de amebas de diversas especies en la atmósfera de la ciudad de México y en otras ciudades de la República Mexicana; aumentando así el daño potencial que estos microorganismos puedan causar.

IDENTIFICACION BIOQUIMICA

La identificación bioquímica de las cepas encontradas nos arrojó datos por demás interesantes puesto que, pudimos corroborar la presencia de amebas del género *Acanthamoeba* asociadas a éste tipo de patología, lo cual coincide con la bibliografía consultada dónde solamente se han reportado amebas de éste género como responsables de Queratitis amebiana.

La importancia de la utilización de éstas pruebas bioquímicas radica en el hecho de que nos permitió sin lugar a dudas ubicar a las amebas dentro del grupo II en la tabla de clasificación de éstos protozoos. Por otra parte la cepa HCI -1 al no coincidir con los patrones enzimáticos de las amebas hasta el momento clasificadas taxonómicamente nos hizo pensar que se trata de una especie diferente a las reportadas en la literatura, lo que refuerza la propuesta de utilizar éste tipo de pruebas para una identificación más certera de éstos organismos y no quedar solamente en una identificación basados en parámetros morfológicos.

PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Corroboramos con estas pruebas el daño que éstos organismos son capaces de causar al encontrar los medios adecuados para su invasión. El daño que causaron en la córnea se mencionó con anterioridad al referir los reportes clínicos correspondientes.

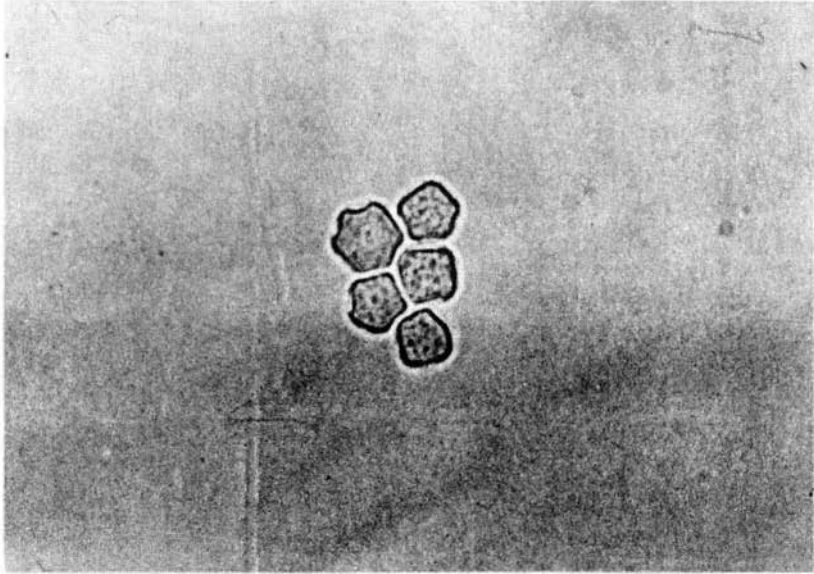
Con los resultados obtenidos de éstas pruebas de patogenicidad en cerebro y los referentes a las pruebas de temperatura encontramos que no se presentó una relación entre la afinidad de las amebas a temperaturas altas y su patogenicidad potencial hacia el ser humano, lo cual no coincide con los reportes del Dr. Martínez (1985), Dónde menciona

que las amebas termófilas por lo general son patógenas.

Por otra parte, el hecho de haber resultado altamente patógenas las cepas que son más afines a una temperatura ambiente nos pone en alerta sobre el énfasis que debe hacerse en la profilaxis de la enfermedad para evitar un contacto con ellas en medios contaminados.

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FARMACOS

La aplicación de estas pruebas de sensibilidad a fármacos fue de vital importancia puesto que, en base a los resultados obtenidos de éstas se pudo dar un tratamiento adecuado a los pacientes que resultaron afectados. Los tres pacientes respondieron de manera positiva a la Tobramicina y al Itraconazol. Es importante destacar que, al presentarse una respuesta adecuada desde el primer caso encontrado favoreció a los dos casos siguientes, los cuales recibieron la terapia en un periodo más corto y por ende la recuperación fue mayor y en mejores condiciones en el tercer caso reportado.



QUISTES DE
Acanthamoeba

CONCLUSION

A través de los tres primeros reportes de Queratitis Amebiana en México se comprobó el papel que juegan las amebas anfitriónicas del género *Acanthamoeba* como agentes etiológicos de ésta patología.

Este hallazgo marca el inicio de una etapa de difusión donde se recomienda que, ésta información sea dirigida hacia los círculos médicos especializados para que sea tomada en cuenta en los diagnósticos diferenciales iniciales.

El hecho de que a éstos protozoos se les tome en cuenta en los diagnósticos diferenciales iniciales es de vital importancia puesto que, de ello depende tomar las medidas necesarias para considerar la terapia a seguir, y por ende minimizar los daños en la córnea de los pacientes afectados.

Los signos y síntomas mínimos que deben tomarse en cuenta son:

- Severo dolor ocular
- Fotofobia
- Infiltrado anular
- Ser usuario de lentes de contacto

Se recomienda que la toma de las muestras sea bajo las siguientes consideraciones:

- Raspados corneales profundos que involucren al estroma.
- Depósito de muestras en medios específicos para el crecimiento de éstos organismos.
- Tinción de las muestras con Calcofluor Blanco.

El hecho de haber encontrado amebas del género *Acanthamoeba* que corresponden a la especie *polyphaga* nos confirma que este género y especie en particular al encontrarse en medios contaminados fácilmente puede convertirse en un patógeno y resulta ser un factor a tomarse en cuenta en la profilaxis de ésta enfermedad. Tal vez sea necesario evaluar más a fondo los mecanismos biológicos de éstas que la hacen participar de un modo más activo en la patogénesis de la Queratitis Amebiana.

La identificación morfológica por se no es una herramienta de utilidad en la ubicación taxonómica de las amebas anfitriónicas, sino que, se hace necesario el utilizar técnicas bioquímicas específicas que nos permitan hacer una diferenciación adecuada de éstas. El hallazgo de una especie diferente a las clasificadas hasta el momento nos hace sugerir un replanteamiento de la taxonomía del género *Acanthamoeba* por los puntos anteriormente expuestos.

Es importante mencionar que, no obstante haber observado 200 raspados corneales solamente 3 de ellos fueron positivos lo que significa que el 1.5 % de la población estudiada fue positiva a la Queratitis Amebiana lo que nos indica que es muy baja, sin embargo si consideramos que el primer caso positivo se presentó a partir del cambio de metodología o sea después del caso 140, esto significaría que el 5 % de 60 casos son

positivos. De tal modo que el porcentaje obtenido en segundo término nos da una idea mas certera de los casos encontrados en el Hospital para evitar la ceguera en México.

De los tres casos positivos encontramos que dos de los pacientes afectados son usuarios de lentes de contacto blandos. Considero que el material plástico del cual estan hechos favorece la permanencia y adherencia de las amebas gracias a los acantópodos que favorecen la infección además de constituir uno de los mecanismos de patogenicidad que le han asegurado una via de invasión importante que cada día aumenta en su insidencia y prevalencia.

Con base a lo anteriormente expuesto propongo el que se prueben diferentes desinfectantes capaces de evitar la adhesión de éstos organismos anfitriónicos en las lentes de contacto permitiendo su utilización con los beneficios por todos conocidos, esto aunado a las recomendaciones necesarias sobre su uso con la higiene adecuada , lo que traería consigo el dejar de considerar a los lentes de contacto (en especial los de tipo blando) como un factor de riesgo en la adquisición de la Queratitis Amebiana.

El haber encontrado una ameba cuya ubicación taxonómica sea diferente a las establecidas hasta el momento me permite proponer estudios capaces de definir sus características biológicas de manera más amplia por ejemplo saber su comportamiento antigénico, su morfología fina a través de su observación al microscopio electrónico, entre otros y comparar los resultados con respecto a las amebas ya definidas y a las de futuros hallazgos, dónde a la par de la identificación morfológica se lleven a cabo estudios izoenzimáticos , lo anterior con el objeto de reunir los elementos necesarios para proponer un nuevo planteamiento taxonómico que sea más completo y este basado en criterios que aporten más apoyo a las nuevas propuestas.

Dada la importancia de administrar un tratamiento oportuno y efectivo que resuelva la problemática de los pacientes afectados propongo también la continuación de los estudios sobre la sensibilidad a diferentes fármacos en pruebas que permitan evaluar a la Tobramicina y al Ketoconazol con una amplia variedad de amebas e incluso con amebas pertenecientes a otros géneros como Naegleria y Hartmannella de importancia médica. Además de la evaluación de éstos en modelos *in vivo* e *in vitro*.

El presente trabajo representa el inicio de una etapa del conocimiento y difusión del panorama real de la Queratitis Amebiana en México, que implica el elaborar estudios retrospectivos y prospectivos que nos permitan describir la distribución epidemiológicas de las amebas anfitriónicas y conocer su participación en los círculos médicos y biológicos de nuestro país.

APENDICE No. 1

MEDIO BASAL DE BOLD (MBB)

El medio basal de Bold es un medio de transporte con los requerimientos mínimos necesarios para la sobrevivencia de microorganismos, en particular fue ideado para el transporte de algas y ha sido probado con éxito en amebas.

Está constituido por macro y microelementos.

MACROELEMENTOS

Se preparan 6 soluciones stock.

Se disuelve el peso indicado de las siguientes sales en 400 ml de agua destilada o desionizada (cada sal se disuelve por separado)

NaNO ₃	10.0 gr
KHPO ₄	7.0 gr
K ₂ HPO ₄	3.0 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	3.0 gr
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.0 gr
NaCl	1.0 gr

de estas soluciones se toman 10 ml de cada una para 1 lt de solución final.

MICROELEMENTOS

Se preparan 4 soluciones stock

a) Solución stock EDTA

50 gr EDTA (ácido etilendiamintetracético)

31 gr de KOH diluido en agua destilada o desionizada.

b) Solución stock H - Fe

4.98 gr de FeSO₄.7H₂O se disuelve en 1 lt de agua acidificada. Esta se prepara adicionando 1 ml de H₂SO₄ concentrado a 999 ml de agua destilada o desionizada.

c) Solución stock H - Boro

11.42 gr de H₃BO₃ se disuelven en 1 lt de agua destilada o desionizada.

d) Solución stock de H -H5

ZnSO ₄ .7H ₂ O	8.82 gr
MnCl ₂ .4H ₂ O	1.44 gr
MoO ₃	0.71 gr
CuSO ₄ .5H ₂ O	1.57 gr
Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O	0.49 gr

Todo lo anterior se disuelve en un litro de agua acidificada.

1 ml de cada solución stock de microelemntos se adiciona a un litro de solución final.

La solución final se esteriliza a 15 lb de presión durante 15 min.

APENDICE No. 2

MEDIO DE CULTIVO MONOXENICO NO NUTRITIVO (NNE)

NaCl	0.12 gr
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.004 gr
CaCl ₂ .2H ₂ O	0.004 gr
Na ₂ HPO ₄	0.142 gr
KH ₂ PO ₄	0.136 gr
Bactoagar	15.0 gr
Agua destilada	1 000 ml

Se mezclan las sales y el agar, se agrega el agua y se pone a hervir durante un min. Se esteriliza a 15lb de presión durante 15 min.

Se vacía en cajas de Petri estériles 15/20 ml del medio preparado y se deja solidificar perfectamente.

Al medio solidificado se le agrega 0.5 ml de un concentrado bacteriano de *Enterobacter aerogenes* disuelto en agua destilada y se extiende por toda la caja para que quede un monocapa de bacteria, se deja desecar el exceso de agua y se almacena en refrigeración.

Las cajas ya preparadas se guardan en bolsas de plástico en el refrigerador.

APENDICE No. 3

Medio axénico PBSGM (Rivera, et al., 1987) (Medio Chang modificado)

Biotriptasa	16.6 gr
Dextrosa	2.7 gr
NaH ₂ PO ₄	1.5 gr
KH ₂ PO ₄	0.9 gr
Agua destilada	1 000 ml

Se mezclan los componentes en seco, se disuelven en agua destilada y se vierten 2.7 ml en tubos con tapón de rosca de 16 x 125 mm. Se esterilizan a 15 lb de presión durante 15 min y se almacenan en refrigeración hasta ser utilizados.

PREPARACION DEL SUERO DE BOVINO PARA EL MEDIO PBSGM

El suero se descongela y se pone en baño de agua a 56 grados centígrados durante 30 minutos para descomplementarlo. Ya descomplementado el suero se prepara una mezcla de antibióticos a base de penicilina G sal sódica (Laboratorio Lakeside) y Kanamicina (Bristol).

Penicilina G 1000 000 U en 2 ml de H₂O destilada
Kanamicina 1 gr en solución 3 ml
Volumen total 5 ml
Agregar 1.0 ml de la mezcla de antibióticos por cada 100 ml de suero descomplementado.
Para obtener una concentración final de 200 mcg de cada antibiótico en 3.0 ml de medio PBSGM.

APENDICE No. 4

ELABORACION DE MICROCULTIVOS

Para la elaboración de microcultivos se utilizan las cámaras de Pussard, las cuales se hacen sobre unos portaobjetos simulando pequeños ecosistemas cerrados constituidos por un sustrato de agar, una cierta concentración de amebas y grandes cantidades de bacterias vivas (*Enterobacter aerogenes*) como alimento (Pussard, 1973).

En estos sistemas, las amebas crecen del centro del sistema hacia los extremos creándose en ese mismo sentido diferentes situaciones de estrés. De esta manera en un pequeño sistema podemos tener diferentes etapas del desarrollo amebiano capaces de ser monitoreados para seguir todo el proceso de desarrollo incluyendo la observación de la división nuclear de uno o de un grupo de amebas seleccionado.

Descripción del proceso:

MATERIAL

- 50.0 ml de bactoagar al 1.5 % recién esterilizado
- Papel celofán cortado en cuadros de 5 mm cuadrados
- Suspensión concentrada de bacteria *Enterobacter aerogenes* viva, en agua destilada estéril
- Portaobjetos y cubreobjetos
- Pinzas
- Parafina para histología
- Cámara húmeda

PROCEDIMIENTO

Sobre una laminilla se deposita una capa delgada de bactoagar al 1.5 %

Se hace una excavación en el agar de aproximadamente 5 mm cuadrados

Se corta un fragmento de papel celofán y tomándolo con una pinza se pone en contacto con la superficie de amebas en buen crecimiento pasando varias veces el celofán para capturar la mayor cantidad posible de amebas.

El fragmento de celofán se coloca sobre el cuadro de agar excavado con la parte impregnada de amebas hacia arriba.

Con una pipeta pasteur se toma una suspensión bacteriana y se coloca una gota sobre el cubreobjetos y se voltea, de manera que la gota con bacteria quede suspendida por debajo del cubreobjetos, de este modo se coloca sobre el trozo de celofán con las amebas. Es importante hacer coincidir la gota con bacteria sobre la superficie de celofán con las amebas.

Se sella la preparación con parafina refinada para histología y se guarda en cámaras húmedas a una temperatura ambiente.

Las preparaciones se observan diariamente.

APENDICE No. 5

PRUEBAS BIOQUIMICAS

ISOELECTROENFOQUE

Buffers

BUFFER DE ACETATO 0.05 M pH 5.0

SOLUCION 1

CH₃COONa 1.64 gr
agua destilada 100 ml

SOLUCION 2

CH₃COOH 0.6 ml
agua destilada 100 ml

Combinar 176 ml de la solución 1 y 74 ml de la solución 2 con 250 ml de agua destilada.

BUFFER DE TRIS- MALEATÓ 0.2 M pH 6.0

SOLUCION 1

Tris 7.26 gr
Acido meléico 6.96 gr
Agua destilada 150 ml

SOLUCION 2

NaOH 1.6 gr
agua destilada 100 ml

Combinar 125 ml de la solución 1 y 65 ml de la solución 2 con 310 ml de agua destilada.

BUFFER DE FOSFATO 0.1 M pH 5.7

SOLUCION 1

NaH₂PO₄ 6.875 GR
agua destilada 250 ml

SOLUCION 2

Na₂HPO₄ 2.83 GR
agua destilada 100 ml

Combinar 230 ml de la solución 1 y 20 ml de la solución 2 con 250 ml de agua destilada.

BUFFER TRIS HCl 0.5 M pH 7.1

SOLUCION 1

Tris 18.15 gr
Agua destilada 150 ml

SOLUCION 2

HCl 2.1 ML
Agua destilada 250 ml

Combinar 125 ml de solución 1 y 250 ml de la solución 2 con 125 ml de agua destilada.

REVELADO DE ENZIMAS

Fosfatasa ácida (AP)

Na-B- naphthyl acid phosphate 100 mg
Black k salt 100 mg
Buffer de acetato 0.05 M pH 5.0 100 ml

Leucin aminopeptidasa (LAP)

B-leucin-b-naphthylamide 40 mg
Black K salt 50 mg
Buffer Tris-maleato 0.2 M pH 6.0 100 ml

Propionil esterasa (PE)

Fast blue RR salt 100 mg
Buffer de fosfato 0.1 M pH 5.7 100 ml
alfa-naphthylpropionate al 1 % (en acetona al 50 %) 2 ml

Malato deshidrogenasa (MDH)

Na-L-mmalato 1 M 10 ml
beta- NAD* 50 mg
Nitro blue tetrazolium (NBT) 30 mg
Phenazine methasuphate (PMS) 2 mg
NaCN 0.1 M 5 ml
Buffer tris-HCl 0.5 M pH 7.1 15 ml
H2O 70 ml

Alcohol deshidrogenasa (AlcDH)

Etanol (96 %) 3 ml
Beta NAD* 50 mg
NBT 30 mg
PMS 2 mg
NaCN 0.1 M 5 ml
Buffer tris-HCl 0.5 M pH 7.1 15 ml
H2O 77 ml

APENDICE No. 6

La incidencia de la Queratitis Amebiana y micótica se ha incrementado en los últimos años lo que ha llevado a la búsqueda de métodos de diagnóstico rápidos y eficientes para su detección con prontitud en beneficio de los pacientes al recibir un tratamiento oportuno.

La técnica se basa en la tinción de la pared de celulosa de los quistes de *Acanthamoeba* así como de las estructuras de los hongos, es una prueba de elección específica para estos organismos.

La técnica es sencilla y consiste en:

- Hacer una solución de Calcoflúor al 0.1 % con agua destilada.
- Preparar una solución de azul de Evans al 0.1 % en agua destilada
- Preparar una solución final de Calcoflúor y Azul de Evans 50 : 50
- Se ponen unas gotas de la solución de Calcoflúor sobre la muestra a observar durante un minuto
- Se elimina el exceso de solución
- Se coloca un cubreobjetos utilizando el mismo Calcoflúor como medio de montaje
- Se observa al microscopio de fluorescencia

Los quistes de *Acanthamoeba* se observan de un color amarillo verdoso y los trofozoitos de un color rojizo.

BIBLIOGRAFIA

Allen, S. D., Newsome, A. L., Powell, D. A. (1992). Isolation and characterization of free-living amoebae from sputum specimens. Vith International Conference on the Biology and Pathogenecity of free-living Amoebae. Virginia USA:

Auran, J. D., Starr, M. B., Jakobiec, F. A. (1978). Amoebic Keratitis: a review of the literature. *Cornea*. 6 : 2- 26.

Anzil, A. P., Rao, C., Wrzolek, M. A., Visvesvara, G. S., Sher, J. H. y Kozlowski, P. B. (1991) . Amebic mingoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognized opportunistic pathogen. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115 : 21-25.

Ayers, K. M., Billups, L. H. y Garner, F. M. (1972). Acanthamoebiasis in a dog. *Vet. Pathol.* 9 : 221-226.

Badenoch, P. R., Johnson, A. M., Christy, P. E. y Coster, D. J. (1990). Pathogenicity of Acanthamoeba and a Corynebacterium in the rat cornea. *Arch. Ophthalmol.* 108 : 107- 112.

Badenoch, P. R. (1991). The pathogenesis of Acanthamoeba Keratitis. *Australian and New Zeland J. Ophthalmol.* 19 : 9 - 20.

Balamuth, W. (1964). Nutritional studies on axenic cultures of Naegleria gruberi. *J. Protozool.* 11 (suppl.) : 19 - 20.

Bhaduri, C.R., Janitschke, K., y Masihi, K. N. (1987). Immunity to Acanthamoeba culbertsoni : Experimental studies with Acanthamoeba and control antigens preparation. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81 : 768 -770.

Beattie, A. M., Slompvic, A. R., Rootman, D. S., Hunter, W. S. (1990). Acanthamoeba Keratitis with two species of Acanthamoeba. *Canad. J. Ophthalmol.* 25: 260 - 262.

Biddick, C. J., Rogers, L. H. y Brown, T. J. (1984). Viability of pathogenic and non pathogenic free-living amoebae in long -term storage at a range of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 859 - 860.

Bier , J. W. y Sawyer , T. K. (1990). Amoebae isolated from laboratory eyewash stations. *Curr. Microbiol.* 20 : 349 - 350.

Bos, H. J., Volker-Dieben, H. J. M., y Kok-van Alphen, C. C. (1981). A case of Acanthamoeba Keratitis in the Netherlands. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75 : 86 - 91.

Bose, K., Ghosh, D. K., y Battacharaya, A. (1989). Membrane carbohydrate characterization of Acanthamoeba astronyxis, A. castellanii and Naegleris fowleri by

fluorescein-conjugated lectins. *Int. J. Parasitol.* 19 : 737-741.

Brandt, F. H., Ware, D. A. y visvesvara, G. S. (1989). Viability of *Acanthamoeba* cysts in ophthalmic solutions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 1144-1146.

Butt, C. (1966). Primary Amebic meningoencephalitis. *N. Engl. J. med.* 274 : 1473.

Byers, T. J. (1979). Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. *Int. Rev. Cytol.* 61: 283-338.

Chang, S. L. (1971). Small, free-living amoebas: Cultivation, quantitation, identification, clasification, pathogenesis, and resistance. *Curr. Trop. Comp. Pathobiol.* 1 : 201-254.

Chang, S. L. (1972). Pathogenic Free- Living amoeba and recreational Water. *Proxc. Water pollut Res. (Israel)*, 13 : 1-12.

Chang, S. L., Healy, G. R., McCabe, Shuaker B. y Schultz, M. G. (1975). A Strain of Pathogenic *Naegleria* isolated from Human Nasal Swab. *H. Lab. Sci.*, 12 : 1-7.

Cohen, E. J., Buchanan, H. W., Laughea, P.A., Adams, C. P., Galentine, P.G., Visvesvara, G. S., Folberg, R., Arentsen, J.J., y Liabson. P.R.. (1985). Diagnosis and mangement of *Acanthamoeba* Keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 100 : 389-395.

Cohen, E. J., Parlato, c. J., Arentsen, J.J., Genvert, G. I., Eagle, R. C., y Liabson, P. R. (1987). Medical and surgical treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 103 : 615-625.

Culbertson, C. G., Smith, J. y Minner, J. (1958). *Acanthamoeba* observations on Animal Pathogenicity. *Science.* 127 : 1506.

Curtis, F. T., Newsome, A., Culbertson, C., Stephen, D.A. (1992). Identification of *Acanthamoeba* in Broncoalveolar lavage specimens. Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of free- Living Amoebae. Virginia. USA.

De Jonckheere, J.F. (1987). Taxonomy, From amphizoic amoebae. *Human Pathology*. Ed. By Rondanelli, E. G. Chapter 2. Puccin. Nuova Libreria. Padova Italy. 25- 48.

De Jonckheere, J. F. (1983). Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *J. Protozool.* 30 : 701-706.

De Jonckheere, J. F. (1984). Postgraduate course on biochemical techniques for diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis. UNAM. México : 70 pp.

De Jonckheere., Seal, D., Wright, P. (1989). Biochemical identification of *Acanthamoeba* strains isolated from Keratitis cases in Europe. *Memorias del V International conference on Biology and pathogenicity of free-living amoebae.* Bélgica.

- Diaz, J., Ozuna, A., Rosales, M. J., Cifuentes, J., Mascaro, C. (1991). Sucker-Like structures in two stains of *Acanthamoeba* : scanning electron microscopy study. *Inst. J. Parasitol.* 21 : 365 -367.
- Donzin, P. B., Mondino, B. J., Wisman, B.A., Bruckner, D.a. (1989). Microbial analysis of contact lens care systems contaminated with *Acanthamoeba* . *Am. J. Ophthalmol.* 108 : 53 -56.
- Driebe, W. T., Stern, G. A., Epstein, R. J., Visvesvara, G.S., Adi, M., y Komadina, T. (1988). *Acanthamoeba* Keratitis. Potential role for tropical clotrimazole in combination therapy. *Arch. Ophthalmol.* 106 : 1196 - 1201.
- Epstein, R. J., Wilson, L.a., Visvesvara, G.S. y Plourde, E. G. (1986). Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis from corneal scraping using indirect fluorescent antibody staining . *Arch. Ophthalmol.* 104 : 1318 -1321.
- Ferrante, A., Kelly, R. B. y Thong , H. Y. (1984). In vitro sensitivity of virulent *Acanthamoeba culbertsoni* to a variety of drugs and antibiotics. *Int. J. for Parasitol.* 14 : 53 56.
- Ferrante, A. (1991). Free-living amoeba : Pathogenicity and immunity. *Parasite. Immunol.* 13 : 31 - 47 .
- Gunter, O. (1992). Free-living amoebae ahygienic problem for haemodialysis. VITH International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. Virginia. USA.
- Griffin, J. L. (1972) . Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free- living amoebas. *Science* 178 : 69.
- González, M. M., Gould, E., Dickinson, G., Martínez, A.J., Visvesvara, G., Cleary, T. J. y Hensley, G. T. (1986). Acquired immunodeficiency syndrome associated with *Acanthamoeba* infection and other opportunistic organisms. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110: 749 - 751.
- HanssensM., De Jonckheere, J.F., y Meunynck, Ch. (1985). *Acanthamoeba* Keratitis. A clinicopathological case report. *Int. Ophthalmol.* 7 : 203 - 213.
- Ishibashi, Y. Matsumoto, Y., Kabata, T., Watanabe , R. Hommura, S., Yasuraoka, K., e Ishii, K. (1990). Oral Itraconazole and topical miconazole with debridement for *Acanthamoeba* Keratitis. *Am. J. ophthalmol.* 109 : 121-126.
- Jantzin, H., Schulze, I. (1989). The cell cycle and the genome organization in *Acanthamoeba castellanii*. *Memorias del V International conference on Biology and*

pathogenicity of free-living amoebae. Belgica .

John, D. T., Mobley, N. C., Bartsch, K. E. (1983). Isolation of mpathogenic Naegleria and Acanthamoeba from an Oklahoma lake J. Protozool. 30 : 22A.

John, T., Desai, D., Sahm, D. (1989). Adherence of Acanthamoeba castellanii and Trophozoites to unworn soft contact lenses. Am. J. Ophthalmol. 108 : 658 - 664.

Johns, M. D., Head, S. (1989). Examination of Hydrophilic Contact lenses with light Microscopy to aid in the Diagnosis of Acanthamoeba Keratitis. Am. J. Ophthalmol. 108 : 329 - 331.

Johns, K. J., Parrish C. M., seal, M. R., Jerkins, G. W., Berrie, W. R. Litchford, D. W. (1989). Acanthamoeba Keratitis in Tennessee: a growing problem in patients wearing Contact lenses. J. Tennessee Med. Assc. 82 : 584 - 588.

Kadlec, V. (1987). The occurrence of amphizoic amoebae in domestic animal. J. Protozool. 25 : 235 - 237

Keleti, G., Sykora, J. L. (1992). The occurrence of free-living amoebae in indoor environment. VIth International Conference on the Biology and pathogenicity of free-living amoebae. Virginia USA.

Key, S. N., Gree, W. R., Willaert, E., Stevens, A. R., y Key, S. N. (1980). Keratitis due to Acanthamoeba castellanii. arch. Ophthalmol. 98: 475-479.

Kilvington, S., Larkin, D. F., White, D. C. Beeching J.R. (1990). Laboratory investigations of Acanthamoeba Keratitis. J. Clin. Microbiol. 28 : 2722 - 2725.

Larkin, D. F. (1990). Experimental Acanthamoeba Keratitis I. Preliminary findings. British. J. Ophthalmol. 74 : 551 - 555.

Larkin, D. F., Easty, D. F. (1991). Expeiremental Acanthamoeba Keratitis: II Immunohistochemical evaluation. J. J. Ophthalmol. 75 : 421 - 424.

Lemp, MA. (1990). Is the dry eye contact lens wearers at risk. Yes. Cornea. 9 : 48 - 50.

Linguist, T. D., Sher, N. A., y Dóughan D. J. (1988). Clinical signs nad medical therapy of early acanthamoeba Keratitis, Arch. Ophthalmol. 106 : 73 - 77.

Ludwig, I. H., Meisler, D. M. Rutherford, I., Bicom, F. E., Langston, R. H. S. y Visvesvara G. S. (1986). Susceptibility of Acanthamoeba to soft Contact lens disinfection systems. INvest. Ophthalmol. Visual. Sci 27 : 626 - 628.

Lund, O. E. Stefani, F.H. y Dechant, W. (1978). Amoebic Keratitis: A clinicopathological case report. *Brit. J. Ophthalmol.* 62 : 373 - 375.

Mannis, M. J. Tamaru, R., Roth, A. M., Burns, M., y Thirkill, C. (1986). Acanthamoeba esclerokeratitis. *Arch. Ophthalmol.* 104 : 1313 - 1317.

Martinez, A. J. (1980). Is Acanthamoeba encephalitis an opportunistic infection. *Neurology.* 30 : 567 - 574.

Martinez, A. J. (1985). Free- Living Amebic: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of disease. CRC. Press, Boca Raton, Florida.

Mathers, W., Stevens, G., Rodriguez, M., Chan, C. C., Gold, J., Visvesvara, G. S., Lemp, M. A., y Zimmerman, L. E. (1987). Immunopathology and electron microscopy of Acanthamoeba Keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 103 : 626 - 635.

Matyi, A. (1989). Acanthamoeba Keratitis in Hungary. *Memorias del V International conference on Biology and pathogenicity of free-living amoebae.* Bélgica.

Meisler, D. M., Rutherford, I. (1991). Acanthamoeba and disinfection of soft contact lenses. *Reviews of infectious Dis.* 13 : 410 - 412.

Morton, L. D., McLaughlin, G. L. Whiteley, H. E. (1991). Effects of temperature, amebic, and carbohydrates on Acanthamoeba adherense to corneal epithelium in vitro. *Infect. Immun.* 59 : 3819 - 3822.

Moore, M. B., y McCulley, J. P. (1989). Acanthamoeba Keratitis associated with contact lenses : Six consecutive cases of successful management. *Br. J. Ophthalmol.* 73 : 271 - 275.

Moore, M. B. (1989). Parasitic Infections. In *The Cornea.* Ed Kauffman, H. E., McDonald, M.B : SR. Wattman. Churchill, Livingstone. New York. 271 - 297.

Moore, M. B., McCulley, J. P. (1985). Acanthamoeba Keratitis associated with soft contact lenses . *Am. J. Ophthalmol.* 100 : 396 - 403.

Nagington, J. (1975). Isolation of amoebae from eye infections in England. *Trans. Ophthalmol. Soc. U. K.* 95 : 207 - 209.

Nagington, J., Watson, P. G., Playfair, T. J., McGill, J., Jones, B. R. y Steel, A. D. McG. (1974). Amoebic infection of the eye. *Lancet* ii : 1537 - 1540.

Niederckon, J. K., Ubelaker, J. E., McCulley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Mellon, J.A., Silvany, R. E., He, Y., Pidherney, M., Martin, J. H., y Alizadeh, H. (1992). Susceptibility of corneas from various animal species to in vitro binding and invasion by

Acanthamoeba castellanii. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 33 : 104 - 112.

Page, F. C., (1976). An Illustrated Key to freshwater and soil Amoebae with notes on cultivation and Ecology. Freshwater Biol. Assoc., Ambleside. Cumbria. England.

Page, C. F. (1988). A new Key to freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biol. Assoc., Sci. Publication. England.

Pussard, M. (1973). Modalités de la division nucléaire et taxonomie chez les amibés (Amoebae, Protozoa). Révision des notions de promitose, mesomitose et métamitose. Protistologica. 9 : 163 - 173.

Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, E. y Paz, M. E. (1979). A quantitative morphological and ecological study of protozoa polluting tap water in Mexico City. Trans. Amer. Micros. Soc. 98 : 465- 469.

Rivera, F., Galván, M., Robles, E., Leal, P., González, L. y Lacy, A. M. (1981). Bottled mineral waters polluted by protozoa in Mexico. J. Protozool. 28 : 54 - 56

Rivera, F., Ramírez, P., Vilaclara, G., Robles, E., y Medina, F. (1983). A survey of pathogenic and free - living amoebae inhabiting swimming pool water in Mexico City. Environ. Res. 32 : 205 - 211.

Rivera, F., Medina, F., Ramírez, P., Alcocer, J., Vilaclara, G., y Robles, E. (1983). Pathogenic and free-living protozoa cultured from the nasopharyngeal and oral regions of dental patients. Environ. Res. 33 : 428 - 440.

Rivera, F., Romero, R. y Medina, F. (1984). Meningoencephalitis amibiana primaria producida por *Naegleria fowleri*. Rev. Fac. de Medicina: México. 27 : 113 - 122.

Rivera, F., García, G., Lugo, A., Zierold, E., Islas, J., Ramírez, E., y Bonilla, P. (1986). Amoebae in a waste stabilization pond system in Mexico. Water Air and soil Pollut. 28 : 185 -198.

Rivera, F., Roy-Ocotla, G., Rosas, L., Ramírez, E., Bonilla, P., y Lares, F. (1987). Amoebae isolated from the atmosphere of Mexico City and environs. Environ. Res. 42 : 149 -154.

Rivera, F., Lares, F., Morayta, A., Bonilla, P., Ramírez, E., Xóchihua, L., y Calderón, A. (1989). Contaminación del líquido cefalorraquídeo de un infante con síndrome de Arnold-Chiari tipo II, Hidrocefalia y mielomeningocele, por *Naegleria lovaniensis*. Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría. 2 : 91 - 94.

Rondanelli, E. G. (1987). Infection diseases. J. Amphizoic amoebae human pathology. Ed. Piccin Nuova libreria. Padua Italy. 279 pp.

Schuster, F.L., Michel, J. (1989). Surface antigens of *Acanthamoeba* as defined by monoclonal antibodies. *Memorias del V International Conference on Biology and pathogenicity. Bélgica.*

Simitzis-Le., Flohuc AM., Hasle DP., Paniagua- Crespo E., Colin J., Lagoutte F., Danval A., Bellon C. (1989). *Acanthamoebica Keratitis. Epidemiologic and parasitologic study. J. Ophthalmol. 12 : 361 - 366.*

Singh, B. N. Y Hanumaiah, V. (1979). Studies on patogenic and non-patogenic amoebae and bearing of nuclear division and locomotive form and behavior on the classification of the order Amoebozoa. Monograph No. 1 Association of Microbiologist of India. IND. J. Microbiol. 80 pp.

Thong, Y. H. y ferrante, A. (1987). Experimental pharmacology. In Rondanelli. Infection diseases. 1 Amphizoic amoebae human pathology. Ed. Piccin Nuova Libreria. Padua Italy. 279 pp.

Silvany, R. E., Luckenbach, M. A., (1987). The rapid detection of *Acanthamoeba* in parafin-embedded sections of corneal tissue with Calcofluor White. *Arch. Ophthalmol. 105 : 1366 - 1367.*

Stehr - Green, J. K., Bailey, T. M., Brandt, F. H., Carr, J. H., Bond, W. W. y Visvesvara, G. S. (1987). *Acanthamoeba Keratitis in soft contact lens wearers. J. Am. Med. Assoc. 258 : 57 - 60.*

Stehr - Green, J. K., Bailey, T. M., y Visvesvara, G.S. (1989). The epidemiology of *Acanthamoeba Keratitis* in the United States. *Am. J. Ophthalmol. 107 : 331 - 336.*

Ubelaker, J. E., Moore, M. B. (1991). In vitro intercellular adherence of *Acanthamoeba castellanii*: a scanning and transmission electron microscopy study. *Cornea 10 : 299 - 304.*

Visvesvara, G. S., Mirra, S. S., Brandt, F. H., Moss, D. M., Mathews, H. M., y Martinez, A. J. (1983). Isolation of two strains of *Acanthamoeba castellanii* from human tissue and their pathogenicity and isoenzyme profiles. *J. Clin. Microbiol. 18 : 1405 - 1412.*

Visvesvara, G. S., (1991). Clasification of *Acanthamoeba*. *rev. Infect. Dis. 13 : 369 - 372.*

Wilhelmus, K. R. (1986). Rapid Diagnosis of *Acanthamoeba Keratitis* using Calcofluor White. *Arch. Ophthalmol. 104 1309 - 1311.*

Wright, P. (1989). *Acanthamoeba Keratitis. Memorias del V International Conference on Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. Bélgica.*

Yagita, K., Endo, T. (1990). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of Acanthamoeba strains in Japan. *J. P. Protozool.* 37 : 570 - 575.

Yagita, K., Endo, T. (1992). Molecular Epidemiology of Acanthamoeba strains from human eye infections. VIth International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. Virginia. USA.

Yu-Guang, H. J., Niederkorn, J. P., McCulley, Stewart, D. R., Silvano, R., Daugherty, J. (1990). In vivo and in vitro Collagenolytic activity of Acanthamoeba castellanii. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 31 2235 - 2240.