

1166129



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTUDIO COMPARATIVO DE TRES CEPAS DEL GÉNERO *Acanthamoeba* RESPONSABLES DE LOS PRIMEROS CASOS DETECTADOS DE QUERATITIS AMEBIANA EN MÉXICO.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Maestra en Ciencias en el área de Microbiología.

P R E S E N T A :

BIÓLOGA *Maritza* ^{Aureli^o} *Omaña Molina*

Directores de la Tesis:

Dr. FERMÍN RIVERA AGÜERO †
Dr. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN
Dr. JORGE TÓRTORA PÉREZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO

1997

TESIS CON FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

H. Jurado:

Dr. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN
Dr. VICTOR TSUTSUMI FUJIYOSHI
M. en C. MINEKO SHIBAYAMA SALAS
Dr. RAFAEL CAMPOS RODRÍGUEZ
M. en C. PATRICIA BONILLA LEMUS

La autora del presente trabajo fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología en el programa de Posgrado de la FESC por pertenecer a la Maestría en Ciencias (Microbiología) al padrón de Excelencia.

Número de registro ante CONACYT 85891.

LOS ESTUDIOS REALIZADOS EN EL PRESENTE TRABAJO EN SU MAYORÍA SE LLEVARON A CABO EN LAS INSTALACIONES DEL PROYECTO CyMA, EN EL LABORATORIO DE "MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL".

LOS ESTUDIOS DE MICROSCOPIA DE BARRIDO SE REALIZARON EN EL LABORATORIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN Y LA M.en C. SOFÍA GONZÁLEZ.

LOS ESTUDIOS DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN SE REALIZARON EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL DEL CINVESTAV. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. VÍCTOR TSUTSUMI Y EL M. EN C. SALVADOR HERNÁNDEZ MARTÍNEZ.

EL MODELO EXPERIMENTAL EN CONEJO CON LA INOCULACIÓN POR GOTEO SE REALIZÓ EN LAS INSTALACIONES DE LA ENP IZTACALA. BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. JORGE TÓRTORA PÉREZ.

EL MODELO EXPERIMENTAL EN CONEJO CON INOCULACIÓN INTRAESTROMAL SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL DEL HOSPITAL "ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO". BAJO LA DIRECCIÓN DE LA QBP VIRGINIA VANZZINI Y EL DR. JORGE TÓRTORA PÉREZ.

DEDICATORIA

IN MEMORIAM

CON AFECTO, RESPETO Y NOSTALGIA DEDICO MI TRABAJO DE TESIS DE MAESTRÍA AL Dr. FERMÍN RIVERA AGUERO.

SEA ESTE UN TRIBUTO AL ACADÉMICO ENTREGADO A SU CARRERA. MI ADMIRACIÓN AL HOMBRE CULTO, AGRADABLE Y DISPUESTO A ESTRECHAR SU MANO AMIGA EN MOMENTOS DIFÍCILES.

GRACIAS POR CREER EN MI Y PERMITIRME SER PARTE DE SU EQUIPO DE TRABAJO.

.....PORQUE DESPUÉS DE TODO SEGUIRÁ VIVO MIENTRAS CON MI TRABAJO Y DEDICACIÓN CONFIRME DÍA A DÍA QUE ESTA ENTREGA A LA CIENCIA ES UNA AVENTURA MARAVILLOSA Y PERMANEZCA EN MI RECUERDO CON CARÍÑO.

**CON ALEGRÍA, ENTUSIASMO Y AMOR DEDICO MI TRABAJO A
TODAS LAS PERSONAS QUE COHABITAN EN MI ESPACIO FÍSICO Y
EMOCIONAL PORQUE SIN ELLAS NO TENDRÍA SENTIDO MI
VIDA.**

A LA VIDA POR EL REENCUENTRO

AGRADECIMIENTOS

AGRADEZCO PROFUNDAMENTE A MIS COMPAÑEROS Y AMIGOS DEL PROYECTO CyMA POR PERMITIRME REALIZAR MI TRABAJO EN EL LABORATORIO DE "MICROBIOLOGÍA AMBIENTAL".

GRACIAS POR TRABAJAR EN UN AMBIENTE CORDIAL QUE REBASA LAS FRONTERAS ACADÉMICAS Y ESTRECHA LOS LAZOS DE LA AMISTAD.

A LOS MIEMBROS DEL POSGRADO DE LA FESC POR SU APOYO Y GUÍA, DE MANERA MUY ESPECIAL :

AL Dr. JORGE TÓRTORA PÉREZ Y AL Dr. ELISEO HERNÁNDEZ BAUMGARTEN POR SUS CONSEJOS Y ORIENTACIÓN EN LA ELABORACIÓN DE ESTE TRABAJO.

AL Dr. JORGE TÓRTORA PÉREZ Y AL Dr. JUAN ANTONIO MONTARÁZ CRESPO POR SU PARTICIPACIÓN ACTIVA COMO TUTORES DE MIS ESTUDIOS DE POSGRADO. GRACIAS POR SUS CONSEJOS Y SUS PUNTOS DE VISTA SOBRE MI PAPEL COMO FUTURO INVESTIGADOR, QUE ME PERMITIERON AMPLIAR MIS PERSPECTIVAS ACADÉMICAS.

AGRADEZCO DE MANERA MUY ESPECIAL EN ESTE ESPACIO ESCRITO AL FINAL CON TODA LA INTENCIÓN PARA DAR CABIDA EN POCAS PALABRAS LO QUE EN VARIOS AÑOS DE CONVIVENCIA Y ENSEÑANZA, LA Dra. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA ME HA BRINDADO. SEA ESTE UN RECONOCIMIENTO NO SOLAMENTE A UNA ACADÉMICA ENTREGADA EN CUERPO Y ALMA A SU TRABAJO, SINO TAMBIÉN AL SER HUMANO SIEMPRE DISPUESTO A DAR ALGO DE SÍ MISMO, QUE ME PERMITIÓ SENTIR SU APOYO INCONDICIONAL EN TODO MOMENTO PORQUE LA INVESTIGADORA ESTÁ FORJANDO SU CAMINO CON DEDICACIÓN Y TESÓN Y EL SER HUMANO COMIENZA A TRASCENDER CON UNA SONRISA Y UNA MANO AMIGA SIEMPRE DISPUESTA GRACIAS SUSY POR ÉSTA Y MUCHAS OTRAS RAZONES .. TE QUIERO.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Antecedentes	2
1.2. Importancia clínica de las amebas anfitoicas	4
1.2.1. Taxonomía del género <i>Acanthamoeba</i>	6
1.2.1.1. Grupo I	9
1.2.1.2. Grupo II	9
1.2.1.3. Grupo III	9
1.2.2. Morfología de <i>Acanthamoeba</i>	12
1.2.2.1. Trofozoito	12
1.2.2.2. Quiste	13
1.2.3. División celular de <i>Acanthamoeba</i>	14
1.2.4. Ciclo de vida de <i>Acanthamoeba</i>	14
1.2.5. Ecología de <i>Acanthamoeba</i>	16
1.3. Patogenia de <i>Acanthamoeba</i>	18
1.3.1. Virulencia de <i>Acanthamoeba</i>	21
1.3.1.1. Adherencia	21
1.3.1.2. Migración	21
1.3.1.3. Penetración en tejido	22
1.3.2. Queratitis Amebiana	22
1.3.3. Epidemiología de la Queratitis	23
1.3.4. Factores de riesgo de la Queratitis	24
1.3.5. Cuadro clínico	25
1.3.6. Diagnóstico clínico de la Queratitis Amebiana	25
1.3.7. Diagnóstico de laboratorio	26
1.3.8. Histopatología de la Queratitis Amebiana	27
1.4. Tratamiento	28
1.5. Prevención	31
1.6. Importancia del estudio	32
1.7. Objetivos	35
1.7.1. Objetivo general	35
1.7.2. Objetivos particulares	35
2. MATERIAL Y MÉTODOS	36
2.1. Origen de las cepas en estudio	36
2.1.1. Reporte de los casos clínicos positivos	36
2.1.1.1. Caso clínico no. 1	36
2.1.1.2. Caso clínico no. 2	38
2.1.1.3. Caso clínico no. 3	39
2.1.2. Descripción biológica de las cepas responsables de los casos de QA	41
2.1.2. Medios de cultivo	41
2.1.2.1. Cultivo en medios monoxénico (NNE)	41
2.1.3. Identificación de los organismos	42
2.1.3.1. Microscopia de luz	42

2.1.3.2. Morfometría	42
2.1.3.3. Locomoción	43
2.1.3.4. Quiste	43
2.1.3.4.1. Formación del prequiste	43
2.1.3.4.2. Formación del quiste	43
2.1.3.5. Pruebas de temperatura	44
2.1.3.6. Identificación bioquímica preliminar	45
2.1.3.7. Cultivo de las cepas	45
2.2. Animales de experimentación	46
2.2.1. Ratonés	46
2.2.2. Conejos	46
2.3. Procedimiento experimental	47
2.3.1. Microcultivos	47
2.3.1.1. Procedimiento	47
2.3.2. Prueba de sensibilidad a fármacos	48
2.3.2.1. Sensibilidad a fármacos <i>in vitro</i>	48
2.3.2.1.1. Concentración de las amebas	48
2.3.2.1.2. Conteo de amebas	48
2.3.2.1.3. Transferencia a placas de ELISA	49
2.3.2.1.4. Adición de los fármacos en diferentes concentraciones	49
2.3.3. Axenización	52
2.3.4. Microscopía electrónica de barrido	52
2.3.5. Microscopía electrónica de transmisión	53
2.3.5.1. Fijación de las muestras	53
2.3.5.2. Deshidratación de las muestras	53
2.3.5.3. Inclusión en EPON	53
2.3.5.4. Cortes ultrafinos	53
2.3.5.5. Tinción negativa	53
2.3.6. Pruebas de patogenicidad	54
2.3.6.1. Pruebas de patogenicidad en ratón	54
2.3.6.1.1. Inoculación intracerebral	54
2.3.6.1.2. Inoculación intranasal	54
2.3.6.2. Modelo experimental en conejo	55
2.3.6.2.1. Inoculación por goteo	55
2.3.6.2.2. Inoculación intraestromal	56
2.3.6.2.2.1. Evaluación clínica	59
2.3.7. Isoelectroenfoque	60
2.3.7.1. Preparación de los concentrados de amebas para IEF	60
2.3.7.2. Preparación y uso del gel de agarosa	61
2.3.7.3. Preparación del gel	61
2.3.7.4. Preparación del molde	62
2.3.7.5. Revelados de las enzimas	63
2.3.7.6. Revelado de las proteínas totales	63
2.3.8. Pruebas serológicas	63
2.3.8.1. Cuantificación de proteínas por el método de Coomassie	64

2.3.8.2. Inmunización de conejos	66
2.3.8.3. Titulación de sueros	66
2.3.8.4. Inmunodifusión simple radial	67
2.3.8.5. Western-blot	68
2.3.8.5.1. Electroforesis	68
2.3.8.5.2. Inmunotransferencia	68
2.3.8.5.3. Fijación y tinción	69
2.3.8.5.4. Inmunodetección	69
3. RESULTADOS	72
3.1. Microcultivos	72
3.2. Sensibilidad a fármacos <i>in vitro</i>	79
3.2.1. Itraconazol	80
3.2.2. Tobramicina	81
3.2.3. Neomicina	82
3.3. Axenización	83
3.4. Microscopía electrónica de barrido	84
3.5. Microscopía de transmisión	91
3.6. Pruebas de patogenicidad	96
3.6.1. Pruebas de patogenicidad en ratón	96
3.6.2. Modelo experimental en conejo	102
3.6.2.1. Inoculación por goteo	102
3.6.2.2. Inoculación intraestromal	103
3.7. Isoelectroenfoque	104
3.8. Pruebas serológicas	112
3.8.1. Titulación de los sueros	112
3.8.2. Inmunodifusión	112
3.8.3. Western-blot	113
4. DISCUSIÓN	115
4.1. Microcultivo	115
4.2. Evaluación de fármacos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	116
4.3. Axenización	119
4.4. Microscopía electrónica de barrido	120
4.5. Microscopía electrónica de transmisión	122
4.6. Pruebas de patogenicidad	123
4.6.1. Modelo experimental en ratón	123
4.6.2. Modelo experimental en conejo	125
4.7. Isoelectroenfoque	127
4.8. Serología	129
5. CONCLUSIÓN	131
ANEXOS	133
6. BIBLIOGRAFÍA	142

ÍNDICE DE FIGURAS

Cuadro no. 1 especies de <i>Acanthamoeba</i> asociadas a casos clínicos	5
Cuadro no. 2 Taxonomía de amebas de vida libre	8
Cuadro no. 3 Modificaciones en la organización taxonómica del género <i>Acanthamoeba</i>	10
Esquema no. 1 Ciclo de vida <i>Acanthamoeba</i> según John 1993	15
Esquema no. 2 Mecanismos de patogenicidad según John 1989	20
Cuadro no. 4 Morfometría de las cepas en estudio	43
Cuadro no. 5 Concentración de fármacos utilizados	49
Esquema no. 3 Metodología, Prueba de Sensibilidad a fármacos	51
Esquema no. 4 Metodología, modelo experimental en Conejo	58
Esquema no. 5 Metodología, Pruebas serológicas	65
Esquema no. 6 Técnica de Inmunoblots	70
Cuadro no. 6 Sensibilidad a fármacos <i>in vitro</i>	79
Cuadro no. 7 Evaluación de la patogenicidad de la cepa HCI-1 inmediatamente después de su aislamiento en el primer caso de QA en México	96
Cuadro no. 8 Evaluación de la patogenicidad de la cepa HCI-1, dos años después de su aislamiento en el primer caso de QA en México	97
Cuadro no. 9 Evaluación de la patogenicidad de la cepa HCI-2 posteriormente a su aislamiento del segundo caso de QA en México	98
Cuadro no. 10 Evaluación de la patogenicidad de la cepa HCI-3 posteriormente a su aislamiento del tercer caso de QA en México	99
Cuadro no. 11 Evaluación de la patogenicidad de la cepa P23	100
Cuadro no. 12 Evaluación de la patogenicidad de la cepa Ap	101

RESUMEN

Las amebas del género *Acanthamoeba* son un grupo de protozoos de importancia clínica por las patologías que causan. Son capaces de modificar su posición de organismos de vida libre y convertirse en patógenos capaces de invadir y causar daño en sitios como el Sistema Nervioso Central y producir una Encefalitis Amebiana Granulomatosa (EAG) con consecuencias fatales, o bien en la córnea donde producen una infección de curso crónico denominada Queratitis Amebiana (QA), la cual en la última década ha aumentado considerablemente su incidencia en usuarios de lentes de contacto, siendo la utilización de éstos un factor de riesgo para su adquisición. El diagnóstico y el tratamiento de la QA, así como la identificación de las amebas del género *Acanthamoeba* involucradas en la patología se dificulta entre otros factores porque: no es tomada en cuenta en los diagnósticos iniciales, no hay personal especializado capaz de identificarlas, la organización y ubicación taxonómica del género aún no está bien definida, lo que trae consecuencias graves para las personas que la padecen.

En México, la investigación de QA dio inicio con la identificación positiva de tres cepas aisladas de tres casos distintos. En base a sus características morfológicas se identificaron como *Acanthamoeba polyphaga*, al comparar estos resultados con pruebas isoenzimáticas preliminares para su identificación, se observaron diferencias. En base a ello se planteó la necesidad de llevar a cabo un estudio que permitiera demostrar las diferencias biológicas de estas cepas consideradas como de la misma especie (de crecimiento, morfológicas, serológicas, isoenzimáticas), así como el establecimiento de un modelo experimental de QA para determinar los mecanismos de patogenicidad de estas amebas en la córnea y la susceptibilidad a fármacos *in vivo* e *in vitro*.

Se probaron diferentes medios de cultivo axénicos, siendo el medio Chang el más adecuado para el desarrollo de las amebas probadas (se observaron diferencias en la axenización y en los tiempos de desarrollo óptimo), así como para estandarizar las condiciones de éstas en los estudios subsecuentes: Las comparaciones morfológicas se hicieron con microscopía de transmisión (sin mostrar diferencias entre las cepas) y microscopía de barrido (mostrando diferencias en el número, tamaño y disposición de los acantópodos). Los corrimientos isoenzimáticos mostraron semejanzas en la evaluación de proteínas totales y diferencias en otras enzimas evaluadas. Los sueros mostraron ser altamente antigénicos, con determinantes antigénicos que no se comparten entre sí. El modelo experimental en conejo no mostró un curso clínico semejante al del humano, es autolimitante y se resuelve en pocos días. El Itraconazol y Ketoconazol mostraron un efecto homogéneo en los estudios *in vivo* e *in vitro* por tanto se sugiere su evaluación como fármacos de elección.

El género *Acanthamoeba* en general y la especie *A. polyphaga* en particular es un grupo heterogéneo de protozoos con una organización taxonómica más compleja que la planteada en la actualidad. Se recomienda la utilización de técnicas más especializadas para la reorganización del género.

1. INTRODUCCIÓN

Las amebas de vida libre son un grupo de protozoos cuya importancia en los círculos médicos se ha incrementado considerablemente debido a las patologías que originan. La incidencia de las mismas registrada en las últimas décadas demuestra que aunque no constituyen un verdadero problema de salud pública si deben ser tomadas en cuenta, sobre todo en los casos donde llegan a presentarse como brotes epidémicos con consecuencias negativas para la comunidad que lo padece. En la mayoría de los casos no son consideradas en los diagnósticos diferenciales iniciales, además de que los tratamientos para erradicarlas no han resultado ser efectivos en un buen número de casos (Martínez, 1993).

1.1. ANTECEDENTES

El interés por el estudio de las amebas de vida libre hacia el inicio del presente siglo era muy limitado, y de no ser por las observaciones realizadas por curiosos protozoólogos hubieran pasado inadvertidas. No es sino hasta las observaciones efectuadas por Jahnke en 1957, como contaminantes de cultivos de tejido, que comienzan a ser tomadas en cuenta. Las investigaciones llevadas a cabo por Culbertson en 1958, fueron determinantes para que a este grupo de protozoarios se le tomase en cuenta, al realizar pruebas rutinarias de seguridad de la vacuna de la polio en cultivos celulares de riñón, se percató de que algunas placas presentaban un efecto citopático, y consideró que el virus era el responsable. Con el contenido de las placas inoculó a ratones y monos por vía intranasal e intracerebral, los cuales en pocos días murieron a consecuencia de meningoencefalitis. Los estudios histopatológicos de los órganos afectados y de las placas mismas revelaron la presencia de organismos ameboideos, que más adelante fueron identificados como *Acanthamoeba castellanii* una ameba de vida libre muy común en la naturaleza. Culbertson sugirió el potencial patógeno de estas amebas de vida libre. El hallazgo más significativo fue referido a la capacidad de éstos protozoarios de invadir la mucosa nasal de organismos sanos, de migrar hacia el

cerebro y producir una patología en el Sistema Nervioso Central con consecuencias fatales (Rondanelli, 1987).

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.

A pesar de que la MEAP es una enfermedad que se presenta con poca frecuencia, aproximadamente 150 casos desde su identificación a la fecha, ha sido reportada en casi todo el mundo. La mayoría de los reportes provienen de países desarrollados, probablemente porque se toma en cuenta en los diagnósticos presuntivos más que por alta incidencia en esos lugares (John, 1993).

En 1960 se asoció a *Acanthamoeba* con enfermedades del tracto respiratorio (Rondanelli, 1987).

El primer caso de acantamebiasis en cerebro claramente identificado fue reportado por Kenney *et al.*, en 1971. Se trató de un paciente cuyo suero tenía un título alto de anticuerpos contra *A. culbertsoni* y que al morir de una granulomatosis cerebral se observaron amebas semejantes a *Acanthamoeba* spp. en secciones de cerebro en el estudio *postmortem*. Posteriormente Jager y Stamm en 1972, reportaron un granuloma cerebral en un paciente con linfoma de Hodgkin y usando la prueba de inmunofluorescencia indirecta y suero Anti-*Acanthamoeba* demostraron la presencia del organismo en las secciones de cerebro. Robert y Borke en 1973 reportaron otros casos. Cabe mencionar que en ese momento se identificaron los aislamientos como pertenecientes al género *Hartmannella*, sin embargo ahora se sabe que en realidad se trataba de amebas del género *Acanthamoeba*.

En 1980 Martínez denominó como Encefalitis Amebiana Granulomatosa a la enfermedad provocada por amebas del género *Acanthamoeba* en el cerebro (EAG), para diferenciarla de la infección que provoca *Entamoeba histolytica* al migrar por vía hematógena hacia el SNC y producir una meningoencefalitis secundaria posterior a su invasión intestinal. Hasta la fecha se han reportado aproximadamente 50 casos de EAG en diferentes partes del mundo.

En 1973 se reportó en EUA el primer caso de Queratitis Amebiana (QA), que correspondió a un paciente masculino de 41 años de edad del sur de Texas, el cual presentó un traumatismo corneal y exposición de agua contaminada en su ojo.

Más adelante, en 1974 Nagington reportó dos casos en Gran Bretaña. La ameba produjo una ulceración crónica y progresiva en la córnea de uno de los pacientes afectados y fue necesario remover quirúrgicamente el ojo infectado del otro paciente. En ambos casos se aislaron e identificaron las amebas, en el primero de ellos se identificó *A. polyphaga* y *A. castellanii* en el segundo (Nagington, 1975). Desde ese momento a la fecha se han reportado alrededor de 400 casos. La mayoría de éstos se asociaron con un traumatismo corneal o bien a la exposición del ojo con agua contaminada, considerando a estos factores como predisponentes de infección por ameba. A partir de 1985 se presentó un aumento considerable en el número de pacientes afectados por ésta patología, relacionado en una alta proporción a usuarios de lentes de contacto y de manera especial a lentes de contacto blandos. (Stehr-Green, 1989).

Los factores que predisponen a los usuarios de lentes de contacto para contraer la infección son la utilización de soluciones salinas caseras, y el mal aseó de los mismos (Donzis *et al.*, 1989)

Las lentes de contacto comprometen la superficie corneal al disminuir los líquidos de ésta, reduciendo la acción de lisozima y beta lisina (Limp, 1990).

1.2. IMPORTANCIA CLÍNICA DE LAS AMEBAS ANFIZOICAS

A estos protozoos se les ha designado de diversas formas, originalmente se les llamó amebas "limax" por su apariencia de "babosas", más tarde se les designó como amebas del suelo, y después amebas de vida libre. En la actualidad se utiliza el término "amebas anfizoicas" (organismos de ambos lados, parásitos y de vida libre) término introducido por Page en 1976, la mayoría de los autores consideran más adecuado ese término que designa a aquellas especies patógenas para el hombre y animales, dado que presentan características biológicas duales y las define de un modo más preciso. Así se diferencia la fase exozoica como el periodo del ciclo de las amebas correspondiente a la vida libre, de la fase endozoica o

parasítica cuando llegan a invadir el tejido corneal, tejido prostático, vaginal o el sistema nervioso central, entre otros (Martínez, 1993).

Los géneros de amebas anfitriónicas más representativos e importantes en la clínica son:

El género *Naegleria* responsable de la MEAP.

El género *Acanthamoeba* responsable de la EAG y la QA.

Existen diferencias significativas que permiten reconocer las patologías y los agentes etiológicos mencionados con anterioridad. Mientras que amebas del género *Naegleria* y en particular *N. fowleri* la única especie que ha sido aislada de casos en seres humanos invade y le causa daño a personas sanas, jóvenes, inmunocompetentes, con historia previa de natación, el género *Acanthamoeba* lo hace en personas inmunocomprometidas incluyendo a pacientes con inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (González *et al.*, 1986; Hunt *et al.*, 1995), con padecimientos crónicos sin historia previa de natación, o bien a personas sanas en su mayoría usuarios de lentes de contacto con una higiene deficiente, cuando la invasión se presenta en el tejido corneal (Gray *et al.*, 1994).

Son varias las especies del género *Acanthamoeba* que se han aislado de diferentes casos clínicos (John, 1993) (Cuadro No. 1). *A. polyphaga* y *A. castellanii* son las especies que con mayor frecuencia se han aislado de casos de QA.

CUADRO No 1 ESPECIES DE *Acanthamoeba* ASOCIADAS A CASOS CLÍNICOS

Las especies asociadas a casos clínicos son: *Acanthamoeba astronyxis*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. polyphaga*, *A. palestinensis*, *A. hatchetti*.

Infecciones que provocan	Amebiana	Propiedades virulentas
⇒ Encefalitis		⇒ Se adhieren a superficies de mucosa.
Granulomatosa		⇒ Migra a través de tejidos a una temperatura de 28°-37°.
⇒ Queratitis		⇒ Enzimas citopáticas como:
⇒ Pneumonitis		⇒ elastasas
⇒ Dermatitis Granulomatosa		⇒ proteasas
⇒ Otitis		⇒ colagenasas
⇒ Faringitis		
⇒ Sinusitis		

Ledee *et al.* (1996) aislaron una cepa de *A. griffini* como un nuevo patógeno en la córnea, en el que se comprobó que la fuente de contaminación fue el agua que un usuario de lentes de contacto utilizaba para el aseo de éstos.

Recientemente ha despertado gran interés un grupo de amebas pertenecientes a la familia Leptomixidae causantes de infecciones del sistema nervioso central, con una mayor incidencia en niños. Lo que llama la atención de manera particular, es el hecho de que algunos de los pacientes son individuos aparentemente sanos que desarrollan una oclusión cerebroespinal progresiva. El curso de esta infección al parecer presenta una mayor cronicidad que los padecimientos ocasionados por *Acanthamoeba*. A estas amebas se les consideraba inocuas, y solo se mencionaba que formaban parte de los ecosistemas terrestres y acuáticos, sin embargo son ya más de 40 los casos reportados asociados a esta etiología. De tal manera que ahora incluso se ha descrito un género para designar a este grupo de organismos. *Balamuthia mandrillaris* es la especie representante de estas amebas incapaces de crecer en los medios comúnmente utilizados para los géneros antes descritos, así, encontramos que solamente pueden estudiarse en el laboratorio utilizando cultivos de tejido para su desarrollo (Visvesvara y Shuster, 1993 ; Griesemer *et al.*, 1994). El grupo de amebas anfitoicas que nos interesa en el presente trabajo pertenecen al género *Acanthamoeba*, causantes de la EAG y en particular las responsables de los primeros casos de QA en México.

1.2.1. TAXONOMÍA DEL GÉNERO *Acanthamoeba*

La identificación de los protozoos que integran al género *Acanthamoeba* se ha llevado a cabo a través de diferentes formas, aunque hasta el momento la taxonomía de las amebas anfitoicas no ha sido bien establecida. El género *Acanthamoeba* está ubicado dentro de la Familia *Acanthamoebidae*, tomando en cuenta su división celular de tipo metamitótica. En lo que se refiere a la diferenciación de las especies se consideran en gran medida los aspectos morfológicos (John , 1993).

En un inicio se consideraban términos sinónimos *Hartmannella*, *Acanthamoeba* y *Mayorella*. Page en 1967 redefinió al género *Acanthamoeba* con cuatro especies, mientras que Sawyer y Griffin (1975) propusieron a la familia

Acanthamoebidae, la cual comprendió tres géneros: *Acanthamoeba*, *Protacanthamoeba* y *Comandonia*. Actualmente está formado sólo por los dos primeros géneros, ya que el género *Comandonia* está considerado dentro de la familia *Echinamoebidae*.

En 1976, Page propuso 7 especies integrantes del género. Pussard y Pons en 1977 propusieron una nueva organización del género basada en la morfología quística, la cual consta de 18 especies ubicadas en tres grupos.

Posteriormente con el empleo de técnicas bioquímicas principalmente con el análisis enzimático, se ha tratado de corregir la ubicación taxonómica de estas amebas cuya base fundamental era la morfológica (John, 1993).

Como resultado de tomar en cuenta las características morfológicas, temperatura de crecimiento y el análisis enzimático, Page (1976) y Pussard y Pons (1977), incorporaron nuevas especies descritas unos cuantos años atrás, además de sinonimias sugeridas en trabajos recientes, reconociéndose finalmente 17 especies para el género *Acanthamoeba* (ver cuadro No. 2 y 3).

Cuadro 2

Taxonomía de amebas de vida libre

Nivel: Clasificación (características morfológicas).		
Reino:	Protista.	
Subreino:	Protozoa.	
Phylum:	Sarcomastigophora.	
Subphylum:	Sarcodina.	
clase:	Lobosea	
Superclase:	Rizopoda (locomoción por lobópodos, filópodos, reticulopodos, o fluido protoplásmico sin producción de pseudópodos eruptivos).	
Orden	Schizopirenída (cuerpo con monópodos cilíndricos, mas o menos eruptivos, protuberancias hemisféricas hialinas; uninucleadas típicas; división nuclear promitótica; estado flagelar temporal en algunas especies.	Amoebida uninucleadas típicas; presentan mitocondrias; no presentan estado flagelar.
Suborden:		Acanthopodina (mas o menos bien tipificadas, algunas veces filiformes, Pseudópodos hialinos furcados son producidos a partir de un lóbulo amplio hialino no discoidal; forman quiste regularmente; división nuclear mesomitótica o metemitótica
Familia:	Vahlkampfiidae	Acanthamoebidae
Genero:	<i>Naegleria</i>	<i>Acanthamoeba</i>
Especies	Aisladas de infecciones humanas (se indica sitio (s)).	
	<i>N. fowleri</i>	<i>A. astronyxis</i> (SNC). <i>A. castellanii</i> (SNC, ojo) <i>A. culbertsoni</i> (SNC, ojo) <i>A. hatchetti</i> (ojo) <i>A. palestinensis</i> (SNC) <i>A. polyphaga</i> (SNC, ojo) <i>A. rhyodes</i> (SNC, ojo)
	No aisladas de infecciones humanas.	
	<i>N. gruberi</i> <i>N. jadonii</i> <i>N. lovaniensis</i> <i>N. australiensis</i>	<i>A. comandoni</i> <i>A. griffini</i> <i>A. lenticulata.</i> <i>A. royreba</i> <i>A. tubiashi.</i> <i>A. echinulata</i> <i>A. mauritanensis</i> <i>A. lugdunensis</i> <i>A. quina</i> <i>A. divionensis</i>

Las características generales de los tres grupos que conforman el género según Pussard y Pons (1977) son:

1.2.1.1. GRUPO I

Comprende cepas de *Acanthamoeba* con un quiste cuyo diámetro debe ser mayor de 18 micras, y se distingue porque presenta un endoquiste con brazos que dan una apariencia estrellada rodeado por un exoquiste más o menos redondeado. Las paredes externa e interna del quiste están separadas entre sí y solamente se juntan por una extensión a través de los brazos o rayos que presenta. El número de poros y de rayos es el mismo.

Las cepas por lo general no crecen a 37 grados centígrados y es difícil hacerlas crecer en medios axénicos.

Se considera que este grupo no es tan relevante ya que carece de representantes patógenos.

1.2.1.2. GRUPO II

El endoquiste de los organismos pertenecientes a este grupo tiene una forma estrellada o bien poligonal, de manera que las dos capas se juntan en las esquinas más que en los brazos del endoquiste, el exoquiste presenta una forma más o menos redondeada.

A este grupo pertenecen las formas de mayor importancia médica.

1.2.1.3. GRUPO III

En este grupo el exoquiste es muy delgado y a veces se dificulta su observación mientras que el endoquiste es más o menos redondeado y no presenta brazos, puesto que las paredes están muy juntas entre sí.

En el Cuadro No. 3 se presentan los cambios que ha sufrido la taxonomía del género desde 1967 hasta 1988.

CUADRO No 3
MODIFICACIONES EN LA ORGANIZACIÓN TAXONÓMICA DEL GÉNERO
Acanthamoeba

Page (1967)	Page (1976)	Pussard y Pons (1977)	De Jonckheere (1988)	Page (1988)
		Grupo I	Grupo I	Grupo I
<i>A. castellanii</i>	<i>A. castellanii</i>	<i>A. astronyxis</i>	<i>A. astronyxis</i>	<i>A. astronyxis</i>
<i>A. astronyxis</i>	<i>A. astronyxis</i>	<i>A. comandoni</i>	<i>A. comandoni</i>	<i>A. comandoni</i> (<i>A. echinulata</i>)
<i>A. polyphaga</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. echinulata</i>	<i>A. echinulata</i>	<i>A. echinulata</i>
<i>A. palestinensis</i>	<i>A. palestinensis</i>			
	<i>A. culbertsoni</i>	Grupo II	Grupo II	Grupo II
	<i>A. griffini</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. polyphaga</i>	<i>A. polyphaga</i>
	<i>A. comandoni</i>	<i>A. castellanii</i> (<i>A. terricola</i>)	<i>A. castellanii</i> (<i>A. gigantea</i>)	<i>A. castellanii</i>
		<i>A. rhyodes</i>	<i>A. rhyodes</i>	<i>A. rhyodes</i>
		<i>A. griffini</i>	<i>A. griffini</i>	<i>A. griffini</i>
		<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. mauritaniensis</i>	<i>A. mauritaniensis</i>
		<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. lugdunensis</i>	<i>A. lugdunensis</i>
		<i>A. quina</i>	<i>A. quina</i>	<i>A. quina</i>
		<i>A. divionensis</i>	<i>A. divionensis</i> (<i>A. paradivionensis</i>)	<i>A. divionensis</i>
		<i>A. paradivionensis</i>		
		<i>A. triangularis</i>	<i>A. triangularis</i>	
			<i>A. tubiashi</i>	
			<i>A. hatchetti</i>	<i>A. hatchetti</i>
		Grupo III	Grupo III	Grupo III
		<i>A. palestinensis</i>	<i>A. palestinensis</i>	<i>A. palestinensis</i>
		<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. culbertsoni</i>	<i>A. culbertsoni</i>
		<i>A. lenticulata</i>	<i>A. lenticulata</i>	<i>A. lenticulata</i>
		<i>A. royreba</i>	<i>A. royreba</i> (<i>A. postulosa</i>)	<i>A. royreba</i>
		<i>A. postulosa</i>		<i>A. postulosa</i>

() = sinónimos según estudios bioquímicos.

Es importante mencionar que, al hacer corrimientos isoenzimáticos de algunas cepas, no existe una correlación entre los patrones establecidos para las

isoenzimas y la identificación basada en las características morfológicas (John, 1993).

De Jonckheere (1991) basado en la comparación de isoenzimas de cepas de *Acanthamoeba* aisladas de pacientes con Queratitis en Europa, concluyó que los aislamientos corneales son diferentes con respecto a los descritos en la clasificación taxonómica actual. Por otra parte, a pesar de que se observan diferencias en algunas enzimas, se mantiene una concordancia con respecto a los corrimientos de enzimas totales.

Penin *et al.* (1991) aislaron una cepa procedente de un caso de QA, que al ser analizada morfológicamente y de un modo más específico el quiste, se observó la presencia de un endoquiste con 6 brazos rodeados de un exoquiste no reticular, por lo que fue ubicada dentro del grupo II, sin embargo el análisis isoenzimático no permitió identificar a la cepa en cuestión, el corrimiento no coincidió con ningún patrón previamente identificado, por lo que el autor afirma que con ello queda demostrada la heterogeneidad de las cepas que integran el género y de modo particular las especies *A. polyphaga* y *A. castellanii*.

Se ha visto que cepas aisladas de casos de QA no siguen entre otras cosas: el mismo patrón de crecimiento óptimo a mayor temperatura como lo hacen las cepas responsables de EAG. Las cepas procedentes de casos de QA crecen mejor a 37° C, mientras que las aisladas de cavidades nasales lo hacen a 40° C, lo que impide correlacionar la patogenicidad en ambos tipos de aislamientos. Por otra parte, paralelo a los aislamientos en cuestión se comenzó a observar una dificultad para ubicar taxonómicamente a través de corrimientos isoenzimáticos a 31 cepas patógenas aisladas de piscinas. Se piensa que un número limitado de especies es el que está involucrado directamente con los casos de QA, los cuales presentan una heterogeneidad genética, lo que explica las diferencias de los zimogramas entre cepas de referencia y cepas problema con respecto a los patrones de corrimiento isoenzimático (De Jonckheere, 1991).

En la actualidad siguen los desacuerdos sobre la taxonomía, sistemática y orígenes de las amebas basada en la tradicional evaluación de los aspectos morfológicos. Los progresos al respecto son lentos, la utilización de una metodología moderna se ha iniciado solamente con el establecimiento de relaciones serológicas entre las especies, a pesar de ello se han comenzado a

implementar técnicas de biología molecular como la PCR y el análisis de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (Weekers *et al.*, 1993).

Se ha propuesto que una clasificación más completa y adecuada es aquella que toma en cuenta aspectos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de las cepas en estudio (John, 1993).

1.2.2. MORFOLOGÍA DE *Acanthamoeba*

Las amebas del género *Acanthamoeba* presentan dos estados de viabilidad biológica; un estado vegetativo y otro quístico.

El estado vegetativo o trófico representa a la fase reproductiva que morfológicamente es fácilmente distinguible, puesto que presenta una forma amebiana clásica con sus lobópodos característicos.

El estado quístico se presenta cuando las condiciones no son las apropiadas para el desarrollo amebiano, de modo que representa una forma de resistencia y protección a situaciones adversas, aún por períodos muy prolongados. Mazur y Hadas (1994) demostraron que quistes de *Acanthamoeba* conservados a 4° C, continúan siendo viables por más de 24 años, sin perder su capacidad invasiva.

1.2.2.1. TROFOZOÍTO

En estado trófico el género se distingue por presentar finas proyecciones a lo largo de todo el cuerpo ameboideo llamadas acantópodos (*Acantios* = espinas), que le dan el nombre al género, además de presentar lobópodos hialinos y de gran tamaño con movimientos unidireccionales. Estos movimientos son lentos con respecto a otros grupos.

El trofozoito tiene una longitud promedio que va de 13 a 24 micras (Lewis y Sawyer, 1979). La descripción del estado trófico se ha llevado a cabo con la ayuda del microscopio de contraste de fases, en particular se han realizado estudios con *A. astronyxis* por ser la especie de mayor tamaño con respecto a las especies de importancia clínica como *A. culbertsoni*, *A. rhyssodes*, *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, por otra parte son muy pocos los trabajos donde se muestran los aspectos ultraestructurales del género. Sin embargo, se menciona que

los organelos celulares son los mismos que se presentan en las células de Eucariotes en general.

Es distintiva la presencia de vacuolas contráctiles que son el resultado de la asociación de vesículas periféricas. De igual modo se observa una vacuola digestiva de mayor tamaño que las contráctiles, fácilmente observable bajo el microscopio de luz.

El núcleo es de forma circular con un diámetro de 7 a 10 micras con un nucleolo localizado en posición central.

1.2.2.2. QUISTE

El estado quístico del género *Acanthamoeba* es característico, y de la observación de éste se diferencian y ubican a las especies que lo conforman.

El tamaño del quiste varía entre las especies que conforman el género, los más pequeños miden 13.0 a 13.1 μ ; corresponden a las especies *A. polyphaga* y *A. hatchetti*, los de mediano tamaño *A. castellanii*, *A. rhyodes*, *A. culbertsoni*, *A. astronyxis* y *A. griffini* miden de 16.7 a 19.8 μ y los de mayor tamaño *A. tubiashi* y *A. comandoni* llegan a medir hasta 19.2 μ .

La formación del quiste está precedida de cambios morfológicos y funcionales de los organelos citoplásmicos del trofozoito (Page, 1988).

Estudios realizados con microscopía electrónica revelaron que al presentarse condiciones adversas para el trofozoito (cambios de temperatura, escasez de nutrientes y disminución en la concentración de iones) éste comienza a redondearse, el retículo endoplásmico rugoso se alarga y sus membranas tienden a envolver a las mitocondrias y al núcleo. Las mitocondrias por su parte también se alargan y se hacen más angostas, e incrementan las gotas de lípidos, poco a poco se redondea más el contorno y se forma la pared del quiste (Lasman *et al.*, 1982).

El tamaño promedio del quiste es de 15 a 28 micras. Este se conforma de una doble pared; la externa o exoquiste es moderadamente redondeada mientras que el endoquiste o pared interna muestra un arreglo poligonal. Es precisamente este arreglo morfológico lo que distingue al género *Acanthamoeba* con respecto al resto de las amebas de vida libre (Martínez, 1980).

Las características del ecto y endoquiste determinan también la variedad de especies del género.

Las dos paredes quísticas parecen estar separadas entre sí a lo largo del perímetro celular y se unen solamente en algunos puntos que corresponden a las zonas angulares del endoquiste. En estas zonas de contacto se forman poros denominados opérculos con bordes circulares, esta área se considera que presenta un baja resistencia, no obstante los quistes son capaces de resistir condiciones adversas del medio, tales como: bajas temperaturas, desecación, cloración del agua, e incluso resisten a una amplia variedad de agentes antimicrobianos. (Rondanelli, 1987).

Cuando las condiciones del entorno del quiste son favorables, el trofozoito emerge a través de los opérculos, quedando vacíos.

1.2.3. DIVISIÓN CELULAR DE *Acanthamoeba*

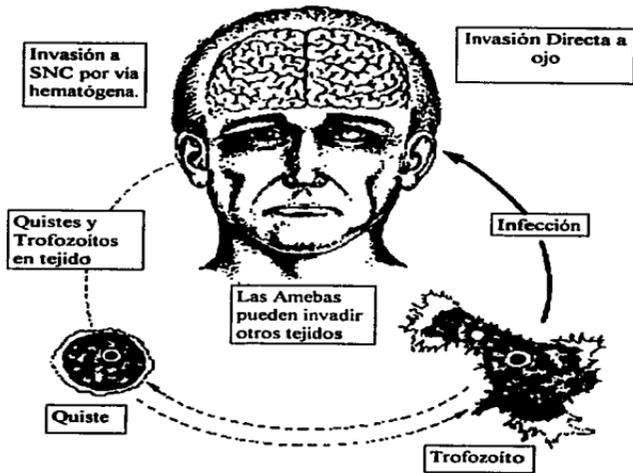
La división celular en *Acanthamoeba* tiene lugar de acuerdo al patrón que se lleva a cabo en los metazoarios en general y se le denomina Metamitosis.

1.2.4. CICLO DE VIDA DE *Acanthamoeba*

Durante la fase trófica o vegetativa se llevan a cabo los procesos metabólicos básicos y esenciales que permiten la alimentación a través de fagocitosis y pinocitosis, además de la síntesis y transformación de estos materiales.

Como ya se ha mencionado, cuando las condiciones del medio ambiente son menos favorables, los trofozoitos comienzan a sintetizar la pared de los quistes que le permiten reducir notablemente su metabolismo. De tal manera que los quistes conforman un estado de resistencia de la especie para su posterior esquistamiento cuando las condiciones así lo permitan (esquema No. 1).

Esquema No. 1



Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. según Jonh (1993).

Hasta el momento se desconocen los pasos que se llevan a cabo en el proceso de enquistamiento y esquistamiento. Se sabe con certeza que factores del medio ambiente como el pH, la temperatura, la falta de nutrientes, la desecación del medio pueden iniciar el enquistamiento. Recientemente se ha podido demostrar la presencia de proteínas transmembranales (péptidos de un peso aproximado de 40 kd) presentes en la superficie de las amebas, capaces de controlar la diferenciación celular de *Acanthamoeba* en ambos sentidos (Villemez *et al.*, 1992).

1.2.5. ECOLOGÍA DE *Acanthamoeba*.

Acanthamoeba es un género ampliamente distribuido en la biosfera, siendo las amebas de vida libre aisladas con mayor frecuencia. Algunos autores las consideran el protozoo de vida libre más común en la naturaleza.

Son amebas que muestran una distribución cosmopolita en medios acuáticos y terrestres e incluso pueden presentarse como simbioses. Su distribución geográfica depende en gran medida de las condiciones físicas y biológicas del medio que les rodea (Rondanelli, 1987).

Como ya se ha hecho referencia, se les encuentra como organismos de vida libre en diversos tipos de medios, y bajo determinadas circunstancias como pueden ser: la inmunosupresión (Murakawa *et al.*, 1995; Hunt *et al.*, 1995), abrasión corneal, padecimientos de curso crónico, condiciones higiénicas deficientes en usuarios de lentes de contacto (Gray *et al.*, 1995; Illingworth *et al.*, 1995), modifican su posición como organismos de vida libre y de este modo pueden convertirse en parásitos altamente virulentos responsables de patologías como la Encefalitis Amebiana Granulomatosa, o la Queratitis Amebiana donde estas amebas participan como agentes etiológicos con consecuencias que llegan a ser fatales (John, 1993).

Como organismos de vida libre se alimentan principalmente de bacterias, de manera que representan un eslabón importante en el control de las poblaciones bacterianas. Constituyen el 50 al 90% de los protozoos heterótrofos en suelos y se consideran los más importantes depredadores de bacterias en la biosfera (Weekers *et al.*, 1993). Cabe hacer mención que existe predilección en cuanto a los géneros de bacterias que son consumidas en mayor proporción, por ejemplo los géneros

Enterobacter y *Escherichia* son utilizados ampliamente en el laboratorio como alimento para las amebas por su preferencia por estas bacterias, de igual modo existen géneros bacterianos que por el contrario, inhiben el crecimiento de las amebas, tal es el caso de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Staphylococcus* que impiden la adherencia de las amebas en las superficies donde se encuentra lo que representa un problema para las amebas al momento de iniciar la invasión cuando parasitan o bien, cuando se establecen en cualquier medio en la naturaleza (Pérez *et al.*, 1983). Por otra parte, cepas del género *Bacillus* liberan sustancias que resultan ser tóxicas para las amebas. En otros casos, bacterias pigmentadas como las del género *Serratia* no son utilizadas por las amebas como alimento (Cordovilla *et al.*, 1993).

Estos protozoos tienen una amplia distribución en diversos medios. Se les puede encontrar en cualquier tipo de agua: salada, dulce, de cloaca, en aguas de tuberías domiciliarias (Keleti y Sykora., 1992), potable, (Rivera *et al.*, 1979), de piscinas (Kadlek *et al.*, 1978) También están presentes en lagos y en aguas termales (Moore, 1989), en aguas embotelladas, en sistemas de aire acondicionado, en cualquier tipo de suelo y a diferentes profundidades del mismo, se han aislado de sedimentos marinos. Se han reportado trabajos que han monitoreado la atmósfera de la ciudad de México encontrándose en mayor cantidad en aquellas zonas donde la contaminación por partículas es mayor Rivera *et al.*, (1987, 1991 y 1994) consideran probable que el principal vehículo de transmisión de *Acanthamoeba* es el aire, provocando la dispersión e invasión de amebas patógenas en los diferentes medios (agua, alimentos o personas saludables). Lo anterior se apoya en aislamientos de muestras de la región nasofaríngea de personas sanas (Abraham y Lawande, 1982), así como de la mucosa nasal de personas aparentemente sanas (Cerva *et al.*, 1973).

Las amebas anfizoicas son capaces de resistir amplios rangos de temperatura que van de 0 a 45° C. Han sido aisladas de diferentes zonas de la región antártica (Rondanelli, 1987).

Es importante mencionar que se les ha encontrado también en tinas de hidromasaje, en unidades de diálisis (Gunter., 1992) y dentales, lavados broncoalveolares y muestras de esputo (Allen *et al.*, 1992), lo cual tiene mayor importancia si se toma en cuenta que algunos pacientes en rehabilitación cursan con distintas formas de inmunosupresión (Curtis *et al.*, 1992 ; Rivera *et al.*, 1993).

En animales se les ha encontrado con cierta facilidad. Se han aislado del intestino de patos salvajes, de gaviotas, de ratas, de peces, de reptiles y de anfibios, (Rondanelli, 1987). Hasta el momento se piensa que el hecho de estar presentes en los animales no se considera que sea una condición de las patologías que causan (Allen *et al.*, 1992).

1.3. PATOGENIA DE *Acanthamoeba*

Las patologías ocasionadas por representantes del género *Acanthamoeba* en su fase parasitaria se denominan Acanthamebiasis.

Los padecimientos provocados por amebas del género *Acanthamoeba* si bien no pueden considerarse como problemas de salud pública, si son de importancia clínica por las consecuencias que pueden acarrear, las cuales pueden ser fatales como en el caso de la Encefalitis Amebiana Granulomatosa, en la que se produce una encefalitis Granulomatosa subaguda o crónica, difusa, necrotizante, generalmente asociada a pacientes que presentan algún tipo de inmunosupresión. Es una infección oportunista que se presenta en individuos debilitados, diabéticos, alcohólicos (Martínez, 1980 ; Hunt *et al.*, 1995).

Se piensa que el protozoario se disemina por vía hematogena desde una fuente cutánea o pulmonar (Gullet *et al.*, 1979). No menos importante es la Queratitis Amebiana, la cual aunque no llega a ser fatal, si tiene gran importancia por el número de casos que se han presentado en todo el mundo y por los daños que causa a la visión de las personas afectadas.

De manera general los padecimientos menos agresivos consisten en una gastroenteritis, neumonitis, otitis, vaginitis, prostatitis, o una simple diarrea (Martínez, 1985). Se han reportado también infecciones en la piel de fácil resolución (Gullett *et al.*, 1979), en realidad, la infección cutánea representa la puerta de entrada del protozoario hacia el organismo, y a través de la sangre puede llegar hasta el Sistema Nervioso Central. Se ha observado que algunos pacientes con EAG desarrollan nódulos en piel días previos a la aparición de los signos y síntomas neurológicos (Rondanelli, 1987 ; Ockert, 1993).

Las infecciones oculares que no involucran a la córnea son extremadamente raras, se ha reportado un solo caso de Uveitis relacionado con una meningitis como infección secundaria. (Visvesvara *et al.*, 1990).

A la Queratitis Amebiana se le ha dado mayor interés en su estudio y por ello se han planteado diversos esquemas para explicar la vía de entrada y diseminación de la infección. Garner (1993) en el análisis de 30 casos de Q.A., considera que los pasos que lleva a cabo el protozoo en su invasión son los siguientes:

1) Infección inicial que involucra el rompimiento de la superficie del epitelio corneal.

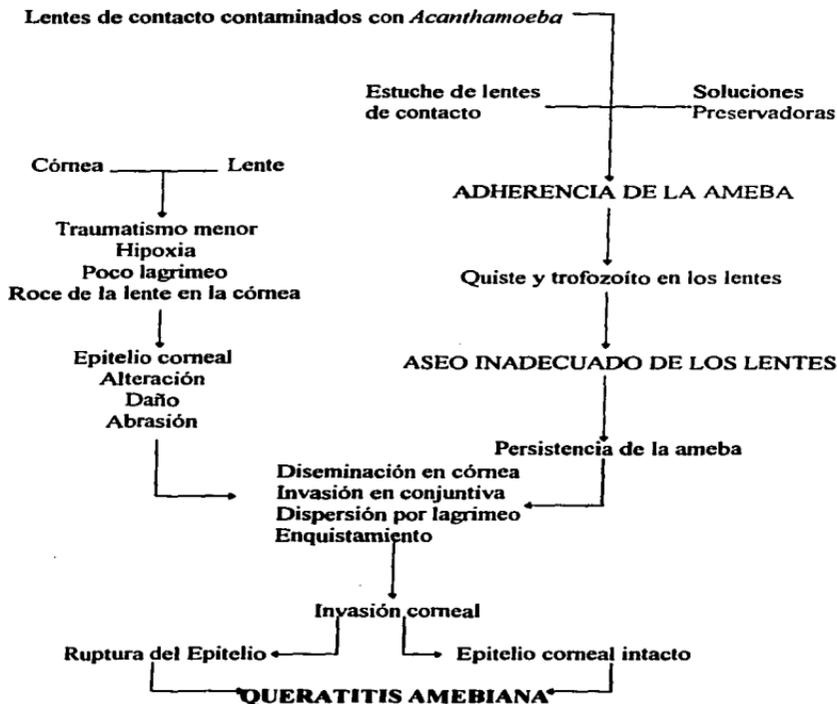
2) Disgregación de los queratocitos por la invasión de los trofozoitos.

3) Respuesta inflamatoria mediada por neutrófilos.

4) Necrosis estromal atribuida a la actividad leucocitaria.

John en 1989 describió los posibles eventos más importantes en la invasión de estos organismos a la córnea en usuarios de lentes de contacto, dado el mayor número de casos reportados en ese grupo (Esquema No. 2).

ESQUEMA N° 2
MECANISMOS DE PATOGENICIDAD SEGÚN JOHN, 1989.



1.3.1. VIRULENCIA DE *Acanthamoeba*

Se considera que la virulencia de las amebas está determinada por los siguientes factores:

1.3.1.1. ADHERENCIA

La adherencia juega un papel importante para que la infección se inicie. Se han llevado a cabo estudios donde se demuestra la capacidad de estas amebas para adherirse a diversos medios; como las superficies inanimadas de los lentes de contacto o el epitelio corneal. La adherencia se ve favorecida por la temperatura y el tiempo de permanencia en dichas superficies (Moore y Culley, 1989). Por otra parte existen trabajos que mencionan que hay variaciones en la capacidad de adhesión entre las diferentes especies que conforman el género, lo que puede explicar la mayor incidencia de *A. castellanii* y *A. polyphaga* en los casos reportados de Q.A. (Morton *et al.*, 1991 ; Sharma *et al.*, 1995). Se ha encontrado también que los quistes son capaces de adherirse de manera pasiva a diferentes superficies (Kelly y L. Xu, 1995).

Existen también diferencias en la adherencia dependiendo del tipo de tejido corneal que se estudie, el tejido corneal del cerdo y del ser humano, evaluado *in vitro*, resultó ser invadido más eficientemente que el tejido corneal de ratón, rata y conejo (Phidherney *et al.*, 1993).

Bacterias del género *Pseudomonas* y *Staphylococcus* impiden que las amebas se adhieran en superficies como los lentes de contacto blandos, lo cual puede tener un implicación en la invasión de estos organismos en la córnea (Gorlín *et al.*, 1996).

1.3.1.2. MIGRACIÓN

La migración en los tejidos está determinada por el tipo de movimiento del protozoo, el cual es lento en cepas de este género, además de que la temperatura juega un papel importante, ya que a 28 grados centígrados migran mejor que en relación a altas temperaturas, es por ello que las infecciones que provocan presentan un curso subagudo o crónico. Además explica la mayor cantidad de

casos de invasión corneal, con respecto a infecciones del sistema nervioso central (Morton *et al.*, 1991 ; Badenoch *et al.*., 1995).

1.3.1.3. PENETRACIÓN EN TEJIDO

La penetración de las mucosas es posterior a la adherencia y la colonización. Es un paso importante en el proceso invasivo de estas amebas.

Se ha demostrado que producen enzimas citopáticas: fosfolipasas, esfingomielinasas, proteasas y elastasas capaces de degradar proteínas del tejido conectivo, como la colágena y la fibrina organizada en un proceso inflamatorio. Se ha demostrado en particular en *Acanthamoeba castellanii* la producción de enzimas colagenolíticas que se piensa contribuyen a la degradación del tejido corneal (Mitra *et al.*, 1995).

1.3.2. QUERATITIS AMEBIANA

En este trabajo se hace énfasis en el análisis de la Queratitis Amebiana (Q.A.) dado que las cepas en estudio provienen de los primeros casos de Q.A. en México, además por la importancia clínica que esta patología ha adquirido en las últimas décadas.

Se define a la Queratitis Amebiana como una infección corneal de curso crónico. Poco a poco ha ido aumentando su diagnóstico a medida que este se incluye en los diagnósticos diferenciales y las técnicas para su detección se han ido perfeccionando, es una patología con consecuencias devastadoras a la que por desgracia no se le ha encontrado un tratamiento adecuado para erradicarla. En muchos de los casos los pacientes llegan a perder el ojo afectado por diversas circunstancias; ya sea porque el diagnóstico no fue oportuno, el esquema terapéutico empleado no fue el correcto, o incluso el trasplante de córnea - cuando es necesario realizarlo - no se llevó a cabo bajo las condiciones adecuadas (Moore, 1989). El estado quístico juega un papel muy importante en esta infección, ya que es altamente resistente a la mayoría de los agentes antimicrobianos a las concentraciones que se alcanzan en la córnea y que se pueden tolerar en la superficie ocular, por lo que el tratamiento es extremadamente difícil (Kilvington *et al.*, 1990).

Se desconoce hasta el momento, si es el quiste o el trofozoito el agente infectante y la densidad del inóculo que conduce a la infección (Bottone *et al.*, 1992).

Aitken *et al.* (1996) reportaron amebas del género *Vahlkampfia* y *Hartmannella* en estuches de lentes de contacto de un paciente con Queratitis con etiología Amebiana, aunque no fue posible identificar el aislamiento con certeza en los raspados corneales.

1.3.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LA QUERATITIS

El primer caso de Q.A. como ya se mencionó en los antecedentes, se reportó en 1973 en EUA. De 1973 a 1981 solamente se reportaron 5 casos. Este número se incrementó con unos cuantos casos de 1981 a 1984 y la cifra ha aumentado considerablemente de 1985 a la fecha.

Hasta julio de 1989 se habían reportado al Centro de Control de Enfermedades de EUA 250 casos de Q.A., por lo que se le dio valor epidemiológico. Se estima que hasta el momento son más de 400 los casos reportados de Q.A. en todo el mundo (Visvesvara, 1991).

Bottone *et al.* (1992) encontraron que existe relación entre climas templados y la mayor incidencia de la infección.

Hasta el momento no se cuenta en nuestro país con datos confiables que nos muestren el panorama de la Queratitis Amebiana. Su estudio se encuentra en una etapa temprana de investigación y sólo se cuenta con la información de unos cuantos Hospitales con interés en su estudio; Hospital Asociación para evitar la ceguera en México, El Hospital de la Luz y el Hospital Conde de la Valenciana.

En un estudio realizado en la ENEP Iztacala con la colaboración del Hospital Asociación para evitar la ceguera en México se llevó a cabo la búsqueda de casos de Q.A., en donde se detectaron los primeros tres casos de esa patología en nuestro país y son los que se describen en este trabajo. No obstante lo anterior es necesario llevar a cabo estudios retrospectivos y prospectivos que permitan tener una idea clara de la situación real que impera en México.

1.3.4. FACTORES DE RIESGO DE LA QUERATITIS

De los casos reportados de Q.A. se considera que el 85 % de las infecciones está relacionada con usuarios de lentes de contacto (Kilvington *et al.*, 1990), un 30% de los casos corresponde a pacientes con algún traumatismo corneal con introducción de un cuerpo extraño y en el 2% no hay razón aparente de su presencia (Visvesvara, 1991).

La Q.A. se asocia con un daño o traumatismo corneal en una tercera parte de la población afectada y poco más de las dos terceras partes restantes corresponden a usuarios de lentes de contacto, lentes de tipo blando en su mayoría. En éste grupo las soluciones utilizadas para su preservación, el lavado inadecuado de los estuches de lentes de contacto y la contaminación de las botellas de esterilizadores químicos juegan un papel importante para la adquisición de la patología y constituyen un factor de riesgo, es frecuente que se utilicen pastillas de sal disueltas en agua destilada, o bien bajas temperaturas como sistemas de desinfección, de manera que no siempre las condiciones en las que ésta se realiza son las adecuadas (Illinworth *et al.*, 1995).

Es relativamente fácil aislar amebas del género *Acanthamoeba* en soluciones preservadoras de lentes de contacto, de personas tanto asintomáticas como sintomáticas de Queratitis Amebiana (Larkin, 1990).

Los lentes de contacto blandos son más susceptibles a ser contaminados por las amebas, el material del cual se elaboran juegan un papel importante y se ha probado que los trofozoitos se adhieren con facilidad a éstos (Thomas *et al.*, 1991).

Además deben tomarse en cuenta los cambios corneales inducidos por la utilización de los lentes de contacto:

- ⇒ Hipoxia y alteraciones metabólicas.
 - ⇒ Efectos mecánicos sobre la superficie corneal.
 - ⇒ Cambio de la flora normal de la superficie corneal.
 - ⇒ Toxicidad y alergia a los materiales del lente y de las soluciones empleadas.
- Bottone *et al.* (1992) resaltan la importancia que puede tener el hecho de encontrar bacterias asociadas a los lentes de contacto de usuarios con la infección,

mencionan que esta relación puede ser sinérgica y sea un paso inicial en la invasión de las amebas en la córnea.

1.3.5. CUADRO CLÍNICO

Los hallazgos clínicos que sugieren la presencia de *Acanthamoeba* son :

- ⇒ Individuos sanos e inmunocompetentes.
- ⇒ Historia de contacto directo en córnea con :
Fluidos contaminados (agua destilada, de la llave, agua de tuberías, sol. salina).
- ⇒ Lentes de contacto en general y lentes de tipo blando en particular.
- ⇒ Cuerpos extraños que produzcan un trauma menor.
- ⇒ Severo dolor ocular.
- ⇒ Reacción en cámara anterior .
- ⇒ Usualmente es una infección unilateral.
- ⇒ Erosiones recurrentes del epitelio en estadios avanzados de la patología.
- ⇒ Presencia de hipopión.
- ⇒ Curso crónico y progresivo resistente al tratamiento.
- ⇒ Cultivos repetitivos negativos a Bacterias
- ⇒ Infiltrado anular y lesiones satélites (Moore, 1985).

No es posible hasta el momento hacer una descripción certera de los eventos que se dan en los pacientes que padecen esta infección, solo se cuenta con las evidencias que muestran los pacientes en casos aislados detectados en diferentes estadios y curso clínico, y no es posible hacer generalizaciones (John, 1993).

1.3.6. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA QUERATITIS AMEBIANA.

A la Queratitis Amebiana difícilmente se le toma en cuenta en los diagnósticos diferenciales iniciales. De manera cotidiana se considera a los virus, específicamente a los Herpes virus en el diagnóstico, posiblemente por la

apariencia no supurativa de los infiltrados estromales, acompañado del epitelio corneal casi intacto y la formación de pseudodendritas. Posteriormente se considera a las Bacterias como los agentes etiológicos del daño, más que nada por la abundancia de patologías originadas por estos organismos, lo cual retarda el diagnóstico y por lo mismo permite que las amebas anfitoicas se multipliquen en el tejido corneal y lo destruyan (Beattie *et al.*, 1990).

Al fracasar en el intento por erradicar la infección se piensa que pueda tratarse de una Queratitis micótica, pero por desgracia no es sino después de semanas o incluso meses de haberse establecido la enfermedad que se considera como posible agente etiológico a *Acanthamoeba* y desafortunadamente para ese momento la evolución del daño es grave y casi irreversible (Cohen *et al.* 1985).

Cabe mencionar que, no obstante se considere a *Acanthamoeba* como el agente etiológico de la patología, éste puede ser difícil de confirmar si las muestras se toman de manera superficial, debido a que el epitelio corneal casi siempre está intacto en la fase inicial de la misma. Es por ello que se recomienda hacer biopsias corneales para asegurar el hallazgo de la ameba. Estas biopsias de preferencia deben ser tomadas en quirófano y por personal calificado, que solamente toque la zona afectada, de lo contrario el daño que se provocaría sería mayor que antes de dicha toma.

En México esta patología es desconocida por gran parte de la población médica. Como ya se mencionó son pocos los Hospitales especializados que la estudian, por lo que es más difícil que aparezcan en los diagnósticos diferenciales iniciales.

1.3.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El diagnóstico de la Queratitis Amebiana puede ser confirmado haciendo un raspado vigoroso de la córnea con un hisopo o espátula. El material obtenido se tiñe con la técnica de Giemsa, Gram o PAS, se recomienda de manera especial el uso del Calcofluor blanco, y se observa bajo el microscopio de luz o de fluorescencia, sin embargo en ocasiones no es posible observarlos cuando el epitelio corneal está intacto, especialmente si el infiltrado está localizado en el estroma y cubierto por el epitelio corneal. Es por ello que cuando la infección es

recurrente o difícil de erradicar se recomienda hacer una biopsia corneal (Wilhelmus, 1986).

Los raspados corneales se siembran en placas de agar no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* inactivado por calor (medio NNE) para el aislamiento de *Acanthamoeba*.

Si el paciente es usuario de lentes de contacto; tanto los lentes, como las soluciones preservadoras son también sembradas en el medio para su búsqueda (Lindquist *et al.*, 1988 ; Mathers, 1987).

Si la infección está en un período crónico, al paciente se le practica una queratoplastia, de modo que una porción de la córnea se debe colocar en un medio de transporte estéril o bien ser depositada directamente en los medios ya mencionados y de esta manera, si las amebas están presentes en el tejido, migran hacia el agar y en un período de 24 a 48 horas se pueden observar bajo el microscopio. Otra porción se fija para realizar cortes histológicos, y técnicas inmunológicas (inmunofluorescencia indirecta) o a través de tinciones específicas.

En México no se cuenta con sueros policlonales y mucho menos con sueros monoclonales para la identificación de estos organismos, lo que complica la identificación, además que son pocas las personas capaces de identificar positivamente a estos organismos a través de la observación de las muestra en cualquier tipo de microscopía.

Se han comenzado a utilizar técnicas de Biología molecular como el PCR para la detección de estos organismos, aunque solo se han estandarizado las técnicas, su uso no se ha implementado en un diagnóstico oportuno en laboratorios de diagnóstico clínico por su costo y poca accesibilidad.

En la medida en que se realicen diagnósticos tempranos de ésta patología, la posibilidad de un tratamiento exitoso aumentará, puesto que se pueden probar diferentes esquemas terapéuticos antes de que daño llegue a ser irreversible (Cohen *et al.*, 1985).

1.3.8. HISTOPATOLOGÍA DE LA QUERATITIS AMEBIANA.

La Queratitis Amebiana se caracteriza por presentar edema, inflamación por infiltración de células linfocitarias con una respuesta fibroblástica variable y

necrosis aguda o subaguda. La conjuntiva puede presentar una congestión intensa e inflamación aguda o subaguda (Moore y Mc Culley, 1985).

Los trofozoítos y los quistes están generalmente localizados en el estroma corneal y por delante de la membrana de Descemet o más profundos en el cuerpo ciliar y el tejido uveal. La iritis y uveítis pueden ser el resultado de una diseminación hematogéna más que de una invasión directa.

La ruptura del tejido corneal, el edema y la infiltración de neutrófilos es consecuencia de la acción colagenolítica de las amebas, de la cual ya se ha hecho referencia (Yu Guang *et al*, 1990)

1.4. TRATAMIENTO

Hasta el momento el tratamiento no ha sido del todo satisfactorio, en parte puede atribuirse a algunos o varios de los siguientes puntos:

- ⇒ **Baja incidencia de la infección.**
- ⇒ **Curso indefinido de la infección.**
- ⇒ **Diagnóstico tardío del padecimiento.**
- ⇒ **Virulencia variable de las cepas.**
- ⇒ **Duración variable de la infección.**
- ⇒ **Resistencia de las amebas a los fármacos antibacterianos, antifúngicos, y antivirales comúnmente empleados.**

Armstrong (1994) enfatiza la importancia del diagnóstico oportuno en base a la observación de las amebas. Debido a que no ha sido posible establecer diferencias clínicas que permitan distinguir el agente etiológico de la patología. Sin embargo no es fácil identificar a estos organismos si no se cuenta con cierta experiencia en su identificación, para ello se han propuesto diversas estrategias para su aislamiento e identificación, las cuales no siempre resultan exitosas, lo que trae como consecuencia que la identificación de estos protozoos sea solamente a nivel genérico en el mejor de los casos.

Se han realizado numerosas investigaciones orientadas a probar esquemas terapéuticos que ayuden a limitar el daño que provocan estos protozoos anfizoicos. Los fármacos que han sido utilizados con cierto éxito son: Itraconazol,

Ketoconazol, Miconazol, Isotianato de Propamidina y Tobramicina (Cohen *et al.*, 1987).

Osato y Robinson (1991) realizaron estudios para evaluar compuestos antimicrobianos con actividad antiquistica: Paromomicina, Neomicina, Ketoconazol y Natamicina, en donde los resultados no fueron uniformes con las diferentes cepas de *Acanthamoeba* empleadas, algunos como la Paromomicina y Neomicina presentaron un efecto aditivo, y sin embargo no fue posible establecer un esquema terapéutico, que se pudiera sugerir como de elección. La mayor dificultad a la que se enfrentó el investigador fue la de no encontrar una correlación del efecto de los antimicrobianos *in vivo* e *in vitro*.

Otros autores han reportado estudios del efecto de diversos fármacos, como la Propamidina, Hexamidina y Octamidina (derivados de diamidinas) sobre cepas del género *Acanthamoeba* con resultados contradictorios (Elder *et al.*, 1994), una limitante que debemos considerar es que, desafortunadamente solo se cuenta con información de reportes de casos clínicos aislados, lo que complica la implementación de un esquema terapéutico específico y de uso generalizado, o simplemente reconocer la eficacia de éste, dado a que clínicamente los casos son detectados en diferentes estadios y no se establecen controles para el manejo de la patología o se emplean terapias combinadas con antibacterianos. La cronicidad de la infección también influye ya que la infección se controla con relativa facilidad solo en los primeros estadios, así que, entre más tiempo transcurre más daño se presenta en la córnea y se dificulta aún más su eliminación.

Algunos reportes son contradictorios, mientras que algunos autores apoyan la idea de utilizar la Propamidina como fármaco de elección, otros como Perrine *et al.*, (1992) consideran que su aplicación no es adecuada porque la diamidina no es efectiva para eliminar quistes de *Acanthamoeba*, lo que explica en parte las fallas reportadas en el tratamiento de la Q.A.. D'Aversa *et al.*, (1995) plantean la posibilidad de utilizar el Isotianato de Propamidina, Neomicina y Clotrimazol como los fármacos antiamebicos ideales.

Ishibasi *et al.* (1990) fueron los primeros en reportar la eficacia del Itraconazol en pacientes con Q.A., aunque su utilización no ha sido tomada en cuenta de manera generalizada, algunos autores lo consideran adecuado.

Junes *et al.* (1994) evaluaron el efecto del Itraconazol y Ketoconazol, mencionan son diazoles eficaces en el tratamiento contra agentes amebianos y

fúngicos, son bien tolerados y pueden emplearse en aquellas infecciones diagnosticadas como no virales y no bacterianas. La acción del Itraconazol y Ketoconazol a nivel molecular no ha sido estudiada en amebas, sólo se cuenta con la información de su efecto en hongos donde comenzó a ser utilizado, se sabe que afecta la permeabilidad de las membranas y da como resultado una alteración en el equilibrio hídrico.

A pesar de lo expuesto con anterioridad no hay un esquema específico que se considere como de elección. En parte esa contradicción se debe a que se han evaluado los fármacos con diferentes técnicas.

Kilvington *et al.*, (1991) indican que existen diferencias inherentes a las cepas lo que les permite ser resistentes a determinados fármacos y a otros no, también afirma que se presenta una resistencia adquirida lo que puede complicar el tratamiento. Lo anterior lo sustenta con el hallazgo de una cepa de *Acanthamoeba* de un paciente con Q.A., la cual fue aislada en tres ocasiones en un periodo de 7 meses, observó que el primer aislamiento era susceptible al Isotianato de Promamidina y en los dos muestreos siguientes resultó ser resistente. Se corroboró con la técnica de la huella digital del ADN que se trataba de la misma cepa, lo que indicó que la cepa original adquirió resistencia a lo largo del tratamiento.

Como ya se mencionó se han probado diversos fármacos en estudios *in vitro*, sin embargo existen grandes discrepancias sobre los resultados obtenidos entre una especie y otra, aunado al hecho de que éstos sólo se han evaluado en unas cuantas especies. Por otra parte al probar dichos fármacos *in vivo* los resultados varían en gran medida. Es importante mencionar que, los daños en la córnea pueden ser permanentes aún cuando los fármacos utilizados sean efectivos, como consecuencia de las complicaciones inmunes que puedan seguir a la lesión del órgano.

Cuando se dificulta el tratamiento y la patología evoluciona puede ser necesaria la queratoplastia. En este caso es muy importante delimitar la zona que se debe eliminar, cuidando de no dejar zonas contaminadas con amebas, de este modo se evita una infección recurrente (D'Aversa *et al.*, 1995).

No se recomienda el uso de esteroides ya que, la inmunosupresión puede facilitar la invasión de las amebas, aunque por otro lado ayudan a contrarrestar la inflamación y la participación de mecanismos inmunes en la córnea, lo que ha ocasionado contraindicaciones en los tratamientos. En muchos casos se ha

requerido de una intervención quirúrgica, sin que por ello se obtengan resultados positivos, pues para ese momento el daño que las amebas han causado es de gravedad y a veces se necesita una segunda intervención e incluso los pacientes pueden perder el ojo afectado (Zanetti *et al.*, 1995).

1.5. PREVENCIÓN

En una evaluación más profunda, referida al papel que juegan los lentes de contacto como un factor de riesgo en la adquisición de la patología, Aitken *et al.*, (1996) mencionan que deben extremarse los cuidados en la desinfección y el mantenimiento de éstos, y de manera muy especial en aquéllos de uso prolongado. No obstante aunque se tome en cuenta lo anterior, el riesgo no se elimina del todo (Gray *et al.*, 1994). Como ya se ha mencionado las amebas anfizoicas 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 éstos, el primero no es posible evitarlo, no así los dos siguientes los cuales dependen de un aseó 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 en piscinas y la practica de algún deporte acuático con ellos, así como 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 anfizoicos (Moore, 1989).

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

Kilvington ha demostrado que la desinfección por calor es la más efectiva para poder eliminar a quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba* en lentes de contacto.

La mayoría de las casas comerciales sacan al mercado sus productos de sol. conservadoras de lentes sin tomar las precauciones debidas para evitar la permanencia y proliferación de las amebas.

1.6. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

En México el estudio de la Queratitis Amebiana se encuentra en una etapa temprana de investigación, la cual dio inicio con el hallazgo de los tres primeros casos reportados de esta patología en 1993.

Con éstos tres primeros casos se comprobó el papel que juegan las amebas anfizoicas del género *Acanthamoeba* como agentes etiológicos de esta patología. Esto no es más que el comienzo de una primera etapa en la que es importante la difusión de información dirigida hacia los círculos médicos especializados para ser tomada en cuenta en los diagnósticos diferenciales iniciales y posteriormente evaluar fármacos que aseguren un tratamiento óptimo de la patología.

La ubicación taxonómica de las amebas encontradas se llevó a cabo con la ayuda de las claves de identificación de Page (1988). En primera instancia se

utilizó el criterio morfológico para la diferenciación de las amebas -tamaño del trofozoito y quiste, además de la organización del endo y exoquiste-. Si se toman en cuenta las características morfológicas observadas a través del microscopio óptico únicamente, entonces los tres aislamientos se ubican dentro de la especie *Acanthamoeba polyphaga*, sin embargo por medio de corrimientos isoenzimáticos se encontró que de las tres cepas aisladas, dos de ellas corresponden a la especie *A. polyphaga* y la restante no parece corresponder a ninguna de las especies hasta el momento descritas (cepas del ATCC ubicadas taxonómicamente como *Acanthamoeba polyphaga* por sus características de morfológicas e isoenzimáticas). Esta cepa que corresponde al primer hallazgo de Q.A. no coincidió con ningún patrón de corrimiento con respecto a las cepas consideradas como de referencia. Por tal motivo se realizaron otras pruebas como la determinación de la huella digital de ADN, llevada cabo por el Dr. Kilvington en Inglaterra, además de la repetición de la prueba isoenzimática en el laboratorio del Dr. Visvesvara en Atlanta EUA, y en todas ellas se llegó a la conclusión de que se trataba de una especie hasta el momento no descrita.

John (1993) considera que es necesario establecer criterios que permitan una mejor organización y ubicación de las amebas anfitriónicas.

De tal manera que resulta importante el llevar a cabo un estudio que permita establecer algunas diferencias biológicas entre las tres cepas consideradas en un inicio como de la misma especie, además de definir las características biológicas más relevantes de la cepa considerada como nueva especie: como conocer su comportamiento antigénico, su ultraestructura a través de la observación al microscopio electrónico y comparar éstos resultados con respecto a las cepas ya definidas.

En base a lo anterior se pretende sustentar una propuesta referente a la utilización de otros criterios para la identificación Amebiana.

Por otra parte, de los casos positivos de Queratitis Amebiana reportados en la literatura internacional, la mayoría emite sus juicios de identificación en base a criterios únicamente morfológicos llegando en algunos casos a la identificación a nivel genérico solamente, lo que trae como consecuencia confusión en el diagnóstico y por ende en el tratamiento, con el consiguiente aumento de los casos sin resolver además de un mal pronóstico.

Es importante mencionar que hasta el momento no ha sido exitoso un esquema terapéutico específico en contra de las amebas. Algunos autores proponen la utilización de un número limitado de fármacos, sin embargo en nuestro país no se cuenta con ellos y por otra parte la misma literatura llega a ser contradictoria en cuanto al éxito o fracaso de su utilización.

Se cuenta con la experiencia de haber utilizado con éxito al Itraconazol como tratamiento en los tres primeros casos de Q.A., de manera que, es importante evaluar el efecto *in vivo* e *in vitro* de éste y otros fármacos para poder hablar de ellos como esquemas de elección terapéutica que ayuden a minimizar los efectos de las amebas en el ojo de los pacientes afectados.

Hasta el momento se ha tratado sin mucho éxito el montaje de un modelo experimental de Queratitis Amebiana que permita dilucidar sus mecanismos de patogenicidad en la córnea. Existen trabajos en que se ha intentado ensayar un modelo en ratón y rata, sin mucho éxito. Por otra parte se han reportado algunos trabajos en conejo, pero los resultados son contradictorios. De manera que se considera importante establecer un modelo experimental que permita conocer los mecanismos de patogenicidad de las amebas y evaluar fármacos *in vivo*.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1. OBJETIVO GENERAL

ESTABLECER POSIBLES DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS, DE DESARROLLO, SEROLÓGICAS, PATOGENICIDAD *IN VIVO* Y TRATAMIENTO ENTRE TRES CEPAS RESPONSABLES DE LOS PRIMEROS CASOS DE QUERATITIS AMEBIANA EN MÉXICO.

1.7.2. OBJETIVOS PARTICULARES

AXENIZACIÓN DE LAS CEPAS AISLADAS QUE PERMITA LLEVAR A CABO LOS ESTUDIOS SEROLÓGICOS, ISOENZIMÁTICOS Y DE PATOGENICIDAD.

EVALUAR EL EFECTO DE DIFERENTES FÁRMACOS SOBRE LAS AMEBAS AISLADAS EN MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO*.

DETECTAR POSIBLES DIFERENCIAS ENTRE LAS CEPAS ENCONTRADAS POR MEDIO DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO Y TRANSMISIÓN.

ESTUDIAR Y COMPARAR LA ULTRAESTRUCTURA DE CEPAS CONOCIDAS CON RESPECTO A LOS TRES NUEVOS AISLAMIENTOS.

MONTAR UN MODELO EXPERIMENTAL QUE PERMITA MOSTRAR POSIBLES DIFERENCIAS ENTRE LOS MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE LAS CEPAS ENCONTRADAS.

ENCONTRAR POSIBLES DIFERENCIAS SEROLÓGICAS ENTRE LAS TRES CEPAS, PARA SER UTILIZADAS EN SU DIAGNÓSTICO.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. ORIGEN DE LAS CEPAS EN ESTUDIO

Las cepas utilizadas en el presente estudio se aislaron de los tres primeros casos de Q.A. en México:

2.1.1. REPORTE DE LOS CASOS CLÍNICOS POSITIVOS

2.1.1.1. CASO CLÍNICO 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 2 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 trofozoítos amebianos.

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 trofozoítos 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 mg una vez al día, de manera tópica se administró Tobramicina en gotas (10.6 mg/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 trofozoítos 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 2 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.

2.1.1.2. CASO CLÍNICO 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 en su ojo derecho, así como 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 cooperó 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 de sus lentes de contacto.

Se tomó un frotis de la córnea del ojo afectado 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, Itraconazol oral 300 mg 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 mostró reducida en extensión, casi sin fijación de tintura de fluoresceína. La lesión estromal no pareció 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.

Desafortunadamente el paciente comenzó a ser irregular en sus visitas, continuó su tratamiento con Itraconazol con una dosis de 150 mg.

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 le 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 mg V.O. de Itraconazol

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

2.1.1.3. CASO CLÍNICO 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 previos a la fecha del padecimiento, 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 frotis y cultivo, dadas las características de excesivo dolor en una lesión pequeña, se sembró la muestra en medio NNE enriquecido con *E. aerogenes*.

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

Dos días después se confirmó la presencia de quistes amebianos en el medio de cultivo con *E. aerogenes*.

72 horas después de iniciado el tratamiento: el paciente refiere menor dolor ocular, persistiendo la fotofobia y la úlcera de 2 mm 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 esta lesión, la visión fue de 20/60 lo cual es muy satisfactorio.

2.1.2. DESCRIPCIÓN BIOLÓGICA 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, utilizando las iniciales del Hospital de la ceguera (HC) uniéndolas con la inicial de Iztacala (I) respectivamente, según el orden en el que se aislaron.

A continuación se describen los estudios que se llevaron a cabo con las cepas en estudio, antes de realizar el procedimiento experimental de este trabajo:

2.1.2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1.2.1. Cultivo en medio monoxénico (NNE) .- Las tres cepas se desarrollaron y crecieron bien en el medio no nutritivo enriquecido con *E. aerogenes* (De Jonckheere, 1977).

Se hizo un seguimiento del modo en que estas cepas se desarrollaron en las cajas de Petri por un período de 7 días.

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 proliferación 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.

2.1.3. IDENTIFICACIÓN DE LOS ORGANISMOS

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

2.1.3.1. MICROSCOPIA DE LUZ

Se observaron las formas tróficas y quísticas a través un microscopio de contraste de fases a 10, 40 y 100 X (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*.

2.1.3.2. MORFOMETRÍA

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 cuadro:

CUADRO N° 4.
Morfometría de las amebas aisladas de los primeros casos de Q.A. en México.

CEPA	TROFOZOITO			QUISTE	
	Largo	Ancho	Diámetro del Núcleo	Diámetro	Número de brazos del quiste maduro
HCI - 1	18 micras	15 micras	2 micras	15 micras	5 -6 brazos
HCI - 2	17 micras	15 micras	2 micras	15 micras	4 - 5 brazos
HCI - 3	17 micras	14.5 micras	2 micras	14 micras	5 - 6 brazos

2.1.3.3. LOCOMOCIÓN

Con un microscopio de contraste de fases, se observó el movimiento de cada una de las especies aisladas así como los lobópodos característicos de la clase a la que pertenecen las amebas encontradas, así como 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.

2.1.3.4. QUISTES

2.1.3.4.1. Formación de prequistes.- Se comenzaron a observar prequistes entre el cuarto y quinto día de haber montado los microcultivos. Los prequistes son trofozoítos 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.

2.1.3.4.2. 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 las especies aisladas.

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).

2.1.3.5. 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: temperatura ambiente, 30°C, 37°C, 40°C y 42°C.

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.

HCI - 2

La forma en la que se comportó esta 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 período de tiempo muy corto (tres días).

HCI - 3

Al igual que las cepas anteriores ésta se desarrolló de manera óptima a temperatura ambiente (aprox 20 °C). 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 se desprende 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 período no mayor de tres días independientemente de la

temperatura a la que se esté incubando. La cepa HCl-3 tolera también rangos amplios de temperatura.

2.1.3.6. IDENTIFICACIÓN BIOQUÍMICA PRELIMINAR

A través de las pruebas bioquímicas se ubicaron taxonómicamente a las amebas encontradas, las cuales de acuerdo a los corrimientos y las cepas de referencia utilizadas se pudo decir que las cepas HCl-1 y HCl-2 correspondían a la especie *Acanthamoeba polyphaga*.

La cepa HCl-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 HCl-1 al laboratorio del Dr. Govinda Visvesvara para su análisis, los resultados que obtuvo coinciden con los nuestros, por lo que el Dr. sugirió que se trata de una especie diferente a las que hasta el momento se han descrito en las claves de identificación.

Los estudios realizados en este trabajo se llevaron cabo con las tres cepas descritas anteriormente y se compararon con las cepas P23, Ap y PQ, las cuales son cepas de referencia del ATCC ubicadas taxonómicamente como *A. polyphaga* y fueron utilizadas como patrones de comparación representantes de la especie *A. polyphaga*. Es importante mencionar que la cepa P23 fue utilizada por Pussard y Pons para describir a la especie.

La Ap es una *A. polyphaga* tipo, proporcionada por el Dr. Simon Kilvington del laboratorio del Hospital de Salud Pública de Bath Inglaterra.

La PQ (*polyphaga* Queratitis) es una *Acanthamoeba polyphaga* que proviene de un caso de Queratitis de Inglaterra proporcionada también por el Dr. Simon Kilvington, la cual solamente se utilizó en las pruebas serológicas.

2.1.3.7. CULTIVO DE LAS CEPAS

Todas las cepas de *Acanthamoeba*: PQ, Ap, HCl-1, HCl-2, y HCl-3, se hicieron crecer en cajas Petri con medio de cultivo NNE, con bacteria

Enterobacter aerogenes inactivada por temperatura a 65°C durante 30 minutos (Anexo No. 1).

Para la axenización de las cepas, se utilizaron los medios de cultivo Chang, Bactocasitona, y medio Casoy (Anexo No. 1).

Se tomó un cuadrado de medio NNE de aproximadamente 1 cm², escogiendo la zona en la cual se encontrara la mayor cantidad de trofozoítos. Se colocó el cuadrado en tubos con 2.7 ml de medio de cultivo líquido más 3 % de suero fetal de bovino.

2.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

2.2.1. Ratones.- Se usaron ratones (*Mus musculus*) de la cepa CD-1, de 4 a 6 semanas de edad, machos, los cuales se mantuvieron en el bioterio en condiciones normales, sin tratamiento previo.

2.2.2. Conejos.- Se utilizaron conejos albinos (*Oryctolagus cuniculus*) de la raza Nueva Zelanda de 2.5 - 3 kg. de peso, a la mayoría de ellos se les mantuvo bajo condiciones normales, sin ningún tipo de tratamiento previo. A otro grupo de conejos se les administró un tratamiento inmunosupresor con hidrocortisona (0.5 mg/ml DEXVETS. B. Parfam. S.A.) días previos a la infección experimental de la Q.A.

2.3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

2.3.1. MICROCULTIVOS

Con el propósito de evaluar más objetivamente algunos aspectos de la biología de los organismos en estudio, así como la acción de los fármacos, se elaboraron los microcultivos según la técnica de Pussard.

Se utilizaron cámaras de Pussard, las cuales se preparan sobre un portaobjetos simulando pequeños ecosistemas cerrados constituidos por un sustrato de agar, una cierta cantidad de amebas y gran cantidad de Bacterias vivas; *Enterobacter aerogenes* como alimento (Pussard, 1973).

En este tipo de sistemas las amebas crecen del centro hacia los extremos creándose en esa pequeña superficie diferentes regiones de estrés. Lo que permite que en este sistema cerrado se puedan monitorear a los organismos en las distintas fases de su ciclo celular.

2.3.1.1. Procedimiento.- Sobre una laminilla de vidrio se depositó una capa delgada de bactoagar al 1.5 %.

Se hizo una excavación en el agar de aproximadamente 5 mm².

Se cortó un fragmento de papel celofán, el cual, con ayuda de una pinza se puso en contacto con la superficie de medio NNE con amebas en crecimiento, pasando varias veces el celofán para capturar la mayor cantidad de amebas.

El fragmento de celofán se colocó sobre el espacio libre de agar, con la parte impregnada de amebas hacia arriba.

Con una pipeta Pasteur se tomó una suspensión bacteriana y se colocó una gota sobre el cubreobjetos y se volteó de manera que la gota con bacteria quedara suspendida por debajo del cubreobjetos. De este modo se colocó sobre el trozo de celofán con las amebas.

Fue importante hacer coincidir la gota con Bacterias con la superficie de celofán con las amebas.

Se selló la preparación con parafina refinada y se guardó en cámaras húmedas a temperatura ambiente.

Se observó cada microcultivo al microscopio (Invertoscopio NIKON FX - 35 DX) diariamente por un período de siete días para observar los distintos estadios del ciclo de vida de las amebas y llevar un registro de los cambios.

2.3.2. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS

Se llevó a cabo la evaluación de la sensibilidad de las amebas en estudio a diferentes fármacos utilizados en los primeros casos de Queratitis Amebiana. Se siguieron dos esquemas de evaluación: Sensibilidad a fármacos *in vitro* y sensibilidad a fármacos *in vivo* en el modelo experimental en conejo.

2.3.2.1. Sensibilidad a fármacos *in vitro*

Se realizó la prueba de acuerdo a la técnica de sensibilidad a fármacos (prueba cualitativa) propuesta por Kilvington (1991), a la cual se le hicieron modificaciones para considerarla como semicuantitativa.

Las cepas en estudio se hicieron crecer masivamente en cajas de Petri conteniendo medio no nutritivo (NNE) enriquecido con Bacterias inactivadas por calor, empleando una cepa de *Enterobacter aerogenes*.

Se dejaron incubando a temperatura ambiente por un período de tres a cinco días dependiendo del crecimiento de las cepas.

Se observaron diariamente bajo el Invertoscopio (Zeiss 476005-9901) hasta encontrar que las amebas se habían desarrollado en el 90 % de la caja y la población de trofozoítos era de aproximadamente el 80% con relación a la población quística del 20 %.

2.3.2.1.1. Concentración de las amebas.- Una vez crecidas se concentraron las amebas en un tubo de ensaye, haciendo un barrido de las mismas con una varilla de vidrio y 0.5-1 ml de agua destilada estéril o sol salina por cada caja de Petri, hasta alcanzar un volumen final de 4-5 ml necesarios para realizar las pruebas de sensibilidad.

2.3.2.1.2. Cuento de las amebas .-(la técnica original no contempla un conteo de los organismos) Una vez concentradas las amebas, estas se contaron con la ayuda de un hemocitómetro para asegurar una población promedio de 29 000 a 30 000 células/ml.

2.3.2.1.3. Transferencia a placas de ELISA.- Esta se llevó a cabo con micropipetas de 100-1000 µl, para depositar en los pozos previamente etiquetados un volumen final de 300 µl conteniendo una cantidad aproximada de 9000 protozoos en estado trófico y quístico (80 % - 20 %) (Se hizo esta modificación a la técnica original , para considerarla semicuantitativa).

Se dejaron las placas a temperatura ambiente por un período de una hora para permitir que los trofozoitos y quistes se adhiriesen al fondo de éstas. Al final de este tiempo se decantó el líquido excedente.

Se contaron los trofozoitos que se adhirieron al fondo de los pozos.

2.3.2.1.4. Adición de los fármacos en diferentes concentraciones.- Se probó la acción de la Tobramicina, Itraconazol, y Neomicina. Se utilizaron las dosis mínimas de contacto con la córnea semejando las dosis terapéuticas prescritas por los oftalmólogos del Hospital "Asociación para evitar la ceguera en México".

CUADRO 5. Concentraciones de fármacos utilizados en mg/ml

TOBRAMICINA		
2,72 mg	1,36 mg	0,68 mg
ITRACONAZOL		
2,0 mg	1.0 mg	0.50 mg
NEOMICINA		
0.70 mg	0.35 mg	0.175 mg

Se incubaron las placas durante 24 horas a 30° C en un ambiente húmedo.

Se decantaron las soluciones y se lavaron con agua destilada para eliminar restos de los fármacos. Los lavados se llevaron a cabo tres veces.

Se observaron a través del Invertoscopio para hacer un registro de las condiciones de los organismos.

Se hizo un conteo de los organismos con alteraciones morfológicas y en su caso se consideraron las zonas de destrucción celular.

Se reinstalaron las condiciones ideales de desarrollo amebiano agregando a los pozos agua destilada estéril y *E. aerogenes*. Se incubaron por 24 horas.

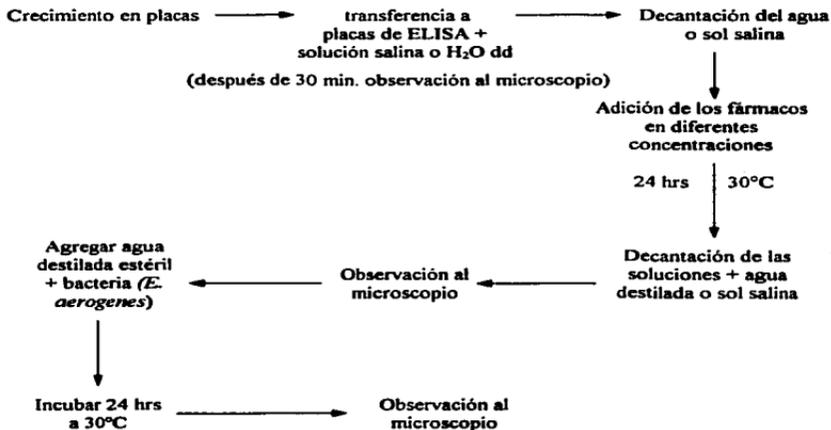
Nuevamente se observaron las placas en el Invertoscopio para determinar el porcentaje de población viva y las condiciones en las que se encontraban (Ver diagrama de flujo).

Las pruebas se realizaron por triplicado.

Se tomaron secuencias fotográficas de los cultivos normales y tratados.

Esquema No. 3

PRUEBAS DE SENSIBILIDAD A FÁRMACOS



El proceso se hace por triplicado con quistes y trofozoitos

2.3.3. AXENIZACIÓN

La axenización fue un proceso indispensable para cubrir los siguientes objetivos, ya que era necesario contar con cultivos masivos libres de Bacterias para llevar a cabo los estudios biológicos pertinentes.

Con ese propósito se probaron tres medios de cultivo diferentes (medio Casoy, Bactocasitona y Medio Chang), y con el objeto también de dar oportunidad a las cepas de crecer en los medios idóneos, pues no siempre lo hacen bajo las mismas condiciones, no obstante se pretendió en todo momento que los cultivos se mantuvieran bajo las mismas condiciones de crecimiento para evitar la presencia de variables extrañas. El medio Chang es el más ampliamente utilizado y del cual se hace referencia en trabajos reportados a nivel internacional, de modo que se probó con los cultivos masivos. Por otra parte tenemos referencia que cuando se hacen corrimientos isoenzimáticos de *Entamoeba histolytica* procedentes de diferentes medios de cultivo, se obtienen patrones de corrimiento distintos, lo cual reforzó el criterio de mantener las cepas en un mismo medio de cultivo (Anexo No. 1).

2.3.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA BARRIDO

Las cepas se hicieron crecer masivamente en medio PBSGM (Chang) enriquecido con suero fetal de bovino.

El contenido de una pipeta Pasteur con trofozoítos se depositó sobre cristales de 1 cm² previamente lavados y desengrasados con el objeto de permitir la formación de una monocapa (se añade medio líquido Chang sobre éstas).

Se fijaron las muestras en glutaraldehído al 2 % durante 2 horas.

Se lavaron las muestras con solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 tres veces por 10 min. cada uno y se deshidrataron con diferentes alcoholes, desde alcohol al 40 % hasta alcohol al 100 %.

Posteriormente se secaron a punto crítico (CO₂).

Se cubrió con una capa de oro de 150 Å de espesor en cobertor iónico, para después observarlas al microscopio de Barrido (JEOL. JSM 25S).

2.3.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

Se inició el estudio con cepas axénicas en medio Chang.

Las cepas en estudio se hicieron crecer masivamente en botellas de cultivo de tejidos de 15 ml de capacidad hasta formar una monocapa.

2.3.5.1. Fijación de las muestras.- Se prefijaron las muestras en glutaraldehído al 1.5 % durante 2 horas.

Se lavaron tres veces las muestras con buffer de cacodilatos 0.1M 10 min cada vez., posteriormente se centrifugaron a 1500 r.p.m. durante 3 minutos.

La pastilla se resuspendió en tetróxido de osmio (1:1 en cacodilato de sodio 0.2 M de tal modo que el tetróxido preparado al 2% quede al 1% y el cacodilato quede a 0.1M).

Se lavaron las muestras con cacodilato al 0.1M, por tres veces.

2.3.5.2. Deshidratación de las muestras.- Se deshidrataron con alcohol etílico a diferentes concentraciones (40% hasta 60 %), 15 min cada vez.

Se continuó la deshidratación con alcohol al 70% hasta llegar a alcohol etílico del 100 % por 10 min en cada paso.

2.3.5.3. Inclusión en EPON

Mezcla A		Mezcla B	
Plástica	Epon 812.....62 ml	Dureza	Epon 812.....100ml
	D. D. S. A.....100ml (anhidro de cenilsuccinico)		NMA.....89 ml
Agitar 30 min		Agitar 30 min	

En un vaso de precipitado se colocó la mezcla B y se agregó la A, se agitó con mosca por 5 minutos. Se agregó gota a gota el DMP-30 (polimerizado) y se guardó en el congelador.

2.3.5.4. Cortes ultrafinos.- Se realizaron con una cuchilla de diamante.

2.3.5.5. Tinción negativa .- Se utilizó acetato de uranio al 5% y citrato de Pb Reynolds.

Se observación con un microscopio de transmisión y se tomaron fotografías.

2.3.6. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

Se llevó a cabo el establecimiento del modelo experimental de EAG en ratón con el objeto de comparar el comportamiento en la fase endozoica de las amebas en estudio. Este se dividió en diferentes fases a saber:

2.3.6.1. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD EN RATÓN

Esta prueba se utiliza después de que se aíslan las amebas de diversos medios, con el objeto de evaluar la capacidad amebiana de provocar infección en el sistema nervioso central del ratón, y así determinar en forma indirecta la posible patogenicidad hacia los humanos. Esta prueba fue introducida por Culbertson (1959) quien encontró que el ratón es un buen modelo para evaluar la EAG y la MEAP.

La prueba se realizó en 2 fases; por inoculación intracerebral e intranasal.

2.3.6.1.1. Inoculación Intracerebral.- Se concentraron las amebas en cultivos axénicos en fase log. por centrifugación a 2500 r.p.m. durante 10 min

Las amebas se contaron con un hemocitómetro y en promedio se utilizaron los cultivos con una concentración no menor de 1×10^7 amebas/ml.

Con una jeringa de insulina se inoculó un lote de cinco ratones de 2 a 6 semanas de edad por cada cepa en estudio.

A cada ratón se le inoculó un vol. de 0.02 ml del concentrado de amebas asegurándose de introducir no menos de 1×10^4 organismos. La inoculación se hizo a través de los huesos parietales, hacia la línea media del cráneo o a la altura de las orejas.

2.3.6.1.2. Inoculación Intranasal.- Se siguieron los tres primeros pasos expuestos con anterioridad. Con una jeringa de 1 ml se pusieron (0.02 ml) de la suspensión Amebiana en los orificios nasales de un lote de cinco ratones.

Los ratones inoculados de las dos maneras se vigilaron diariamente por un período de 21 días durante el cual se llevó un registro de los cambios en el comportamiento de los ratones, se registraron las manifestaciones clínicas de la patología cuando ésta se presentó. Se llevó un registro de la ingesta de agua, de los movimientos, respiración, sudoración, reflejos y fecha de fallecimiento en caso de que la cepa fuera patógena.

A los ratones que murieron antes de los 21 días se les realizó la necropsia extrayendo el cerebro cuando la inoculación fue intracerebral. Se extrajeron los siguientes órganos: cerebro, hígado, pulmón y riñón, cuando la inoculación se realizó de manera intranasal, los cuales se sembraron en cajas de Petri con medio NNE y *E. aerogenes*. Se incubaron a 30° C para recuperar las amebas y demostrar de esta manera, que fueron las responsables del daño. Cuando los ratones no murieron antes de los 21 días, se sacrificaron y se les extrajeron los órganos para sembrarlos del mismo modo que los anteriores, para saber si las amebas sobrevivieron en los ratones e invadieron los órganos aunque no hubieran causado su muerte.

2.3.6.2. MODELO EXPERIMENTAL EN CONEJO

Se siguieron dos esquemas para el establecimiento del modelo experimental: Uno de ellos se llevó a cabo en las instalaciones de la ENEP Iztacala, donde la inoculación se realizó a través de goteo previa irritación superficial de la córnea.

El segundo esquema se hizo en el Hospital "Asociación para evitar la Ceguera en México" en el laboratorio de Microbiología y Patología experimental, con una inoculación intraestromal, así como la evaluación de fármacos *in vivo* (ver esquema metodológico).

2.3.6.2.1. INOCULACIÓN POR GOTEO

Se inició el establecimiento del modelo experimental con la inoculación de la cepa HCI - 3. Se eligió por su rápido crecimiento en fase log y por la virulencia que mostró en la prueba inicial de patogenicidad en ratón. -La cepa HCI-1 fue más virulenta, sin embargo en ese momento no fue posible utilizarla por la contaminación bacteriana que impedía su desarrollo-.

La cepa axénica se hizo crecer masivamente en botellas de cultivo de tejido de 15 ml de capacidad hasta formar una monocapa.

Se centrifugó el contenido de las botellas a 2500 r.p.m. por 10 min.

La pastilla Amebiana se resuspendió en 2 ml de solución Ringer estéril.

Se contaron los trofozoítos con un hemocitómetro, con el objeto de asegurar un promedio de 1.6×10^7 trofozoítos/ml.

Se tomaron muestras para evaluar la flora bacteriana y asegurar que no hubiese amebas antes de la inoculación.

Se utilizó talco estéril para provocar una abrasión corneal ligera previa a la inoculación de la suspensión Amebiana.

Se utilizó hipoclorito de sodio a una concentración de 2.25% y se aplicó una gota momentos antes de la inoculación, con el propósito de provocar un cuadro de irritación corneal.

La inoculación se llevó a cabo con micropipetas de 100 µl, dejando caer las amebas en solución sobre el ojo derecho de cada conejo.

Se realizó una evaluación clínica diariamente para observar y registrar los cambios en la córnea de los animales.

Esquema de Inoculación: Se trabajó con un lote de 20 conejos, el cual se dividió en dos grupos de 10 conejos cada uno, según el esquema No 4.

La inmunosupresión se llevó a cabo inyectando diariamente 60 mg de hidrocortisona (DEXVET S. B. lab. PARFARM) por vía intramuscular, 5 días previos a la inoculación y 10 días posteriores a ésta.

Se utilizó talco estéril para provocar abrasión corneal ligera semejante a la que se produce con el polvo del ambiente, momentos previos a la inoculación de la suspensión Amebiana.

Se utilizó hipoclorito de Sodio en una concentración de 2.25 % y se aplicó una gota momentos antes de la inoculación, a efectos de inducir un cuadro de queratoconjuntivitis e irritación química del epitelio corneal.

2.3.6.2.2. INOCULACIÓN INTRAESTROMAL

La inoculación intraestromal se llevó a cabo en el laboratorio de microbiología del Hospital "Asociación para evitar la ceguera en México". Se utilizaron 34 conejos albinos (Nueva Zelanda), con un peso aproximado de 2.5 a 3.0 kg. Se utilizaron 10 conejos para el modelo de Queratitis, 12 conejos para la evaluación del Ketoconazol y 12 conejos para evaluar la acción del Itraconazol (oral y tópico en cada caso).

Se examinaron las córneas de todos los conejos momentos previos a la inoculación, para confirmar su buen estado, además se tomaron muestras de la

flora corneal para asegurar que no hubiese contaminantes que pudieran interferir con los resultados.

La inoculación se llevó a cabo con una suspensión de *A. polyphaga* (HCl-3) con 1×10^7 trofozoitos/ml crecida del mismo modo que la inoculación por goteo. La población amebiana estaba constituida por trofozoitos (95%) y quistes (5%) diluidos en una solución de fosfato sódico de dexametasona a una concentración de 4 mg/ml.

Se anestesiaron los conejos con ketamina a dosis de 20 - 25 mg/kg.

Se depositó el inoculo amebiano con una jeringa de insulina y aguja del No. 22 en el estroma corneal.

Se inocularon tres puntos equidistantes del ojo derecho con 0.03 ml cada uno, usando como referencia la zona superior para el primer punto y en la zona inferonasal interna e inferonasal externa bajo microscopio de microcirugía, el total del inoculo fue de 0.1 ml.

A el ojo izquierdo de cada conejo no se le aplicó nada para usarse como testigo.

Esquema No. 4

Crecimiento masivo de la cepa axénica de un caso de Q.A.

Concentración por centrifugación

Población amebiana con 95% de trofozoitos, 5% de quistes ($1.6 \times 10^7/ml$)

54 conejos

20 conejos

Inoculación intraestromal 34

**Inmunosupresión
10 conejos**

**Sin inmunosupresión
10 conejos**

**Inoculación de 24
conejos**

**10 conejos para
seguimiento
de la Q.A.**

**Hipoclorito
de sodio
5 conejos**

**Talco
estéril
5 conejos**

**Hipoclorito
de sodio
5 conejos**

**Talco
estéril
5 conejos**

8 días posteriores

**Itraconazol
12 conejos**

**Ketoconazol
12 conejos**

Inoculación por goteo

**Via oral
3 mg/kg.
cada 24 hrs.
6 conejos**

**Vía tópica
al 2%
cada 4 hrs.
6 conejos**

**Via oral
1.5 ml/kg.
en sol. 0.82%
cada 24 hrs. 6
conejos**

**Vía tópica
en susp. al
1% cada
4 hrs.
6 conejos**

2.3.6.2.1. EVALUACIÓN CLÍNICA

Bajo anestesia general los conejos fueron examinados con una lámpara de hendidura los días 3, 7, 10 posteriores a la inoculación y semanalmente hasta 38 días después de la inoculación.

La evaluación clínica se llevó a cabo considerando la opacidad corneal en grados como sigue:

GRADO	CARACTERÍSTICAS
0	Sin opacidad corneal (normal).
1	Opacidad visible solamente con luz.
2	Opacidad visible por retroiluminación que permite observar los vasos del iris.
3	Opacidad visible a la retroiluminación que no permite observar con detalle los vasos del iris.

Se llevó una bitácora en la que se anotó la evolución de cada uno de los conejos.

Lote No 1

Evaluación clínica de la Q.A.

Se enuclearon los dos primeros conejos al 3° día posterior a su inoculación: dos conejos al 7° día; dos conejos al 10° día de la inoculación, otros dos se enuclearon el día 30 y 2 el día 38.

Posterior a la enucleación del ojo, la córnea fue separada del globo ocular, seccionada en forma aséptica y sembrada en medio NNE con *E. aerogenes* para poder recuperar en forma viable a las amebas. Se consideró pertinente utilizar una prueba específica y precisa para determinar la presencia de los organismos o sus restos en la córnea de los conejos, por lo que se utilizó la técnica de PCR, la cual se realizó en el Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez, en el laboratorio de parasitología, bajo la dirección de la Dra. Enedina Jiménez Cardoso.

Lote No. 2

Sensibilidad a fármacos *in vivo*

Este lote de 24 conejos se dividió en 4 grupos y se inició el tratamiento 8 días después de haber sido montado el modelo.

Lote 2 a .- Este lote se trató con Itraconazol oral en dosis de 3.0 mg/kg. suspendido en sol. salina al 0.85% cada 24 horas. Administrado diariamente por un periodo de 38 días, Observando la evolución de la Queratitis. Al término de 38 días se practicó la enucleación, y se aplicaron las técnicas ya mencionadas para la identificación de las amebas.

Lote 2 b .- Este lote fue tratado con Itraconazol por goteo (vía tópica) en suspensión al 2 % en hidroximetilcelulosa cada 4 horas en un periodo de 38 días, después de los cuales se enuclearon los ojos aplicando las técnicas antes mencionadas para la búsqueda de trofozoitos y quistes.

Lote 2 c.- Este lote fue tratado con Ketoconazol oral en dosis de 1.5 mg por kg. de peso, el tratamiento también se aplicó por 38 días, durante los cuales se observó la evolución de la Q.A.. Después del tiempo propuesto se enuclearon los ojos y se separó la córnea para detección de quistes y trofozoitos de la cepa en estudio.

Lote 2 d .- Con este lote se probó el tratamiento por vía tópica con una suspensión del Ketoconazol en solución de hidroximetilcelulosa al 1% a pH 7 cada 4 horas en 38 días.

Se realizó una exploración oftálmica de los conejos con una lámpara de hendidura a los 3, 8, 15, 22, 29 y 38 días.

2.3.7. ISOELECTROENFOQUE

2.3.7.1. PREPARACIÓN DE LOS CONCENTRADOS DE AMEBAS PARA IEF

Se cultivaron las amebas en botellas para cultivo de tejidos de 25 c^{m3} con 10-15 ml de medio Chang por tres días a 30 °C o hasta observar una monocapa de trofozoitos, lo cual debe de representar alrededor de 10⁶ células por ml.

Se cosecharon las amebas poniendo las botellas durante 3 min. a una temperatura de -20°C teniendo cuidado que el medio no se congelara. Se agitaron vigorosamente las botellas y el medio se vació en tubos de centrifuga de polipropileno de 15 ml Las células amebianas se concentraron por centrifugación a 2500 g durante 10 minutos y se desechó cuidadosamente el sobrenadante.

La pastilla de células se resuspendió en agua destilada y se transfirió a tubos de microcentrifuga de 2.0 ml y se concentró nuevamente a 3500 g por 10 minutos. Se tiró con cuidado el sobrenadante, cuidando que la pastilla quedara intacta.

Se agregaron 10 ml de tritón X-100 y la muestra se congeló y descongeló 2 veces a -20°C para lisar las células y liberar su contenido. Cuando este concentrado no se utilizó inmediatamente se guardó hasta 1 mes a -75°C o en nitrógeno líquido.

Para utilizar los concentrados en isoelectroenfoque, se descongelaron las muestras a 37°C (De Jonckheere, 1983).

2.3.7.2. PREPARACIÓN Y USO DEL GEL DE AGAROSA

El isoelectroenfoque con geles de agarosa IEF se llevó a cabo vaciando la agarosa IEF (Farmacia LKB) sobre hojas hidrofílicas de poliéster (gel bond) se obtienen muchos beneficios utilizando los geles de ese modo: Son fáciles de manejar y no flotan durante el proceso de fijación y tinción, son ópticamente claros para ser observado bajo luz visible, y los resultados pueden ser convenientemente almacenados.

2.3.7.3. PREPARACIÓN DEL GEL

Para formar un gel de 11 x 225 mm en un matraz Erlenmeyer de 50 ml de capacidad se disolvió en baño de agua hirviente 30 ml de solución de agarosa que contenía 0.3 gr. de agarosa IEF, 3.6 gr. de sorbitol, 27 ml de agua destilada, mientras se disolvía la agarosa se preparó el molde.

2.3.7.4. PREPARACIÓN DEL MOLDE

- ⇒ **Se utilizó una tabla de nivelación perfectamente horizontal.**
- ⇒ **Se vaciaron 2 ml de agua destilada en la mitad de la placa de nivelación.**
- ⇒ **Se colocó una hoja de película gel bond sobre la placa de nivelación con la superficie hidrofílica hacia arriba.**
- ⇒ **Con ayuda de un rodillo se hizo presión sobre la película y contra la placa de nivelación para quitar el exceso de humedad y las burbujas que se pudieran haber formado bajo el gel. Se secó la película y sus orillas con papel absorbente suave.**
- ⇒ **Se colocó el marco de acrílico sobre la película y se sujetó con grapas para formar el molde.**

Cuando la agarosa se disolvió completamente, se dejó enfriar hasta 75 ° C. Se agregó el anfolito (1.9 ml), se mezcló suavemente evitando formar burbujas y se vació rápida y de manera uniforme dentro del molde, dejando gelificar la solución por 10-15 minutos.

Se retiró el marco acrílico de la tabla niveladora cuidando de no dañar el gel y se dejó que la agarosa gelificara completamente 1 h a 4 ° C.

Se agregaron 2 ml de agua destilada sobre la placa de enfriamiento de la unidad de electroforesis y se colocó encima la película con el gel asegurándose de que el agua se extendiera en una delgada película sin burbujas bajo el gel. Se quitó el exceso de agua con toallas de papel absorbente.

Se sumergieron los electrodos en las soluciones del ánodo y del cátodo respectivamente. Se secaron los electrodos colocándolos sobre papel filtro por 1 minuto para quitar el exceso de líquido (los electrodos no deben gotear) y luego se colocaron sobre el gel aproximadamente a 1 mm de los extremos.

Se aplicaron las muestras utilizando los papeles aplicadores de muestra (25 μ l).

Se colocó la tapa del equipo de electroforesis y se revisó que hubiera buen contacto entre los electrodos de la tapa y los electrodos colocados sobre el gel.

Se ajustó la fuente de poder a 15W, 1500 V y corriente ilimitada.

Se quitaron los aplicadores de muestra después de 45 minutos.

Se dejaron pasar 45 minutos más, se apagó el equipo, se levantó la tapa y se quitaron los electrodos del gel.

Se revelaron los gels en las soluciones correspondientes (Anexo 2).

2.3.7.5. REVELADO DE LAS ENZIMAS

Se colocó el gel en los revelados de enzimas fosfatasa-ácida (FA), leucinaminopeptidasa (LAP), propionilesterasa (PE), fosfoglucomutasa (FGM) y glucosafosfatodeshidrogenasa (GFI) por un período de 30 a 60 minutos, de acuerdo De Jonckheere (1984).

Una vez que se completó el tiempo, el gel se secó de la siguiente forma: se colocaron toallas de papel sobre el gel, enseguida una placa de vidrio y encima un peso de 1 kg. Después de 15 minutos, el gel se secó con una secadora manual.

2.3.7.6. REVELADO DE LAS PROTEÍNAS TOTALES

Se fijó el gel en una solución fijadora (ácido sulfosalicílico 5% y ácido tricloracético 10%) por 30 minutos.

Se lavó el gel dos veces (25 minutos cada vez) en la solución (metanol: ácido acético: agua destilada 3:1:6).

El gel se secó colocando tres capas de papel filtro sobre su superficie segundas de una placa de cristal y un peso de alrededor de 1 kg. Después de 15 minutos se removió todo y el gel se secó con una secadora de pelo.

El gel ya seco se colocó en una solución teñidora de azul de Coomassie al 0.2% por 15 minutos.

Se destiñó con sol. destiñidora hasta que el fondo del gel estuviese claro.

Y finalmente se seco la película con una secadora de pelo.

2.3.8. PRUEBAS SEROLÓGICAS

Se cultivaron las cepas amebianas en medio axénico Chang con suero en botellas de cultivo a temperatura ambiente hasta alcanzar la fase log.

Se utilizó la cepa PQ (polyphaga Queratitis) procedente de un caso de Queratitis Amebiana en Londres Inglaterra, además de las cepas ya mencionadas con anterioridad.

Se centrifugaron en tubos estériles a 2500 r.p.m. durante 10 min., se eliminó el sobrenadante para obtener una pastilla, la cual fue sometida a ciclos de congelación y descongelación para lisar las células.

Además de las cepas en estudio se compararon los siguientes organismos a través de la técnica de Western-blot:

- ⇒ *Escherichia coli*
- ⇒ *Salmonella sp.* y
- ⇒ *Shigella sp.*

2.3.8.1. Cuantificación de proteínas por el método de Coomassie.

Se cuantificó la concentración de proteínas de las cepas en estudio de acuerdo al método de Coomassie.

Se realizó una curva patrón de glucosa con las siguientes concentraciones: 10, 20, 50 y 100 µg.

Las muestras se llevaron a un volumen de 50 µl con sol. salina más 5 ml de reactivo de azul de Coomassie.

Se realizaron mediciones a 595 nm.

La metodología se muestra en el siguiente esquema:

Esquema No. 5

OBTENCIÓN DE LAS CEPAS

HCI-1, HCI-2 Y HCI-3, CEPAS DE LAS 3 PRIMEROS CASOS DE Q.A. EN MÉXICO

AP, PQ Y P23 CEPAS DE REFERENCIA

Escherichia coli, *Salmonella* y *Shigella* CEPAS CONTROL

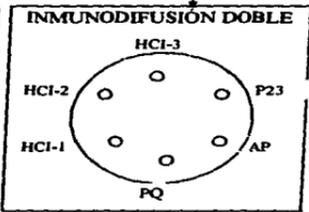
CULTIVOS MASIVOS EN MEDIO AXÉNICO CON SUERO FETAL DE BOVINO

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CENTRIFUGADO A 2500 R.P.M., LISADOS Y CON INHIBIDOR

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CENTRIFUGADOS A 2500 R.P.M. SIN INHIBIDOR

WESTERN BLOTS

CARRIL	1	2	3	4	5	6	7	8
MUESTRA								



1. MARCADOR DE PM
2. *E. coli*
3. *Salmonella*
4. *Shigella*
5. HCI-1
6. HCI-2
7. HCI-3
8. P23

INMUNIZACIÓN DE CONEJOS UTILIZANDO EL ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN PARA ANTÍGENOS SOLUBLES CON ADYUVANTE DE FREUD COMPLETO E INCOMPLETO

SANGRADO 39 DÍAS DESPUÉS, ALMACENAMIENTO DE SUERO A -20° C

TITULACIÓN DE SUEROS

2.3.8.2. INMUNIZACIÓN DE CONEJOS

Con una jeringa de 5 ml se tomó 1 ml de adyuvante completo e incompleto de Freund y 1 ml del extracto de amebas. Se mezclaron hasta obtener una emulsión.

Con esa mezcla emulsificada se aplicaron las inmunizaciones por vía subcutánea a los conejos previamente etiquetados de acuerdo al protocolo de inmunización para antígenos solubles:

INYECCIÓN	DÍA	DOSES
1	0	500 µl del antígeno disuelto en 2 ml de solución salina emulsificado con 2 ml de adyuvante completo de Freund, vía subcutánea.
2	15	500 µl de antígeno disuelto en 2 ml de solución salina emulsificado con 2 ml de adyuvante incompleto de Freund, vía subcutánea.
3	30	50 µl del antígeno en solución salina, vía intramuscular.
4	34	100 µl del antígeno en solución salina, vía intramuscular.
5	35	200 µl del antígeno en solución salina, vía intramuscular.
Sangrado	39	Sangrado de animales por punción cardíaca.

Para la obtención de sueros se colocó la sangre de los conejos en tubos de centrifuga, se removió el coágulo, y se centrifugó a 2000 r.p.m. por 10 min. El suero se separó en alícuotas de 100 µl y se mantuvieron a 4 °C hasta su utilización.

2.3.8.3. TITULACIÓN DE LOS SUEROS

La titulación de los sueros se llevó a cabo con la técnica de precipitación en medio líquido en tubos capilares.

Se dividieron los tubos capilares en tres partes iguales con la ayuda de un marcador.

Se hicieron diluciones seriadas al doble de la solución original del antígeno, se colocaron 0.5 ml de solución salina isotónica en tubos de ensaye.

En el tubo No. 1 se colocaron 0.5 ml de la solución de antígeno y se mezcló muy bien con ayuda de una pipeta (dilución 1 : 2), con una pipeta diferente se tomaron 0.5 ml del tubo No. 1 y se pasaron al tubo No. 2 y se mezcló bien con la misma pipeta (dilución 1 : 4). Se repitió el procedimiento con los tubos siguientes hasta que se alcanzó la dilución 1 : 16 284.

Se absorbió con un tubo capilar la solución de antígeno correspondiente hasta la primera marca del tubo cuidando de dejar libre de antígeno la superficie externa del tubo.

El tubo capilar se giró 180° y se hizo descender el líquido hasta el otro extremo.

De manera similar se hizo descender el antisuero a probar hasta llegar a la segunda marca; de igual manera que en los casos anteriores se limpió el borde del tubo capilar con un papel absorbente.

Se mezcló en contenido de los capilares por medio de inversión repetida, teniendo cuidado de no derramar el contenido del tubo, y se colocó en una gradilla de plastilina.

Se llenó un capilar con antígeno sin diluir y uno más con el antisuero a titular empleando hasta la segunda marca de los tubos. Estos tubos se utilizaron como testigos del antígeno y antisuero.

Los tubos se dejaron de 10 a 15 min. a temperatura ambiente y posteriormente se incubaron a 4 °C en un período de 24 a 48 horas.

Transcurrido ese tiempo se determinó la cantidad de precipitado en mm de altura en el tubo.

2.3.8.4. IMUNODIFUSIÓN SIMPLE RADIAL

Los sueros obtenidos se evaluaron por medio de esta técnica con el objeto de averiguar posibles similitudes o diferencias entre ellos.

Se prepararon 30 ml de suspensión de agarosa al 1.2 % en solución salina isotónica.

Se calentó la suspensión hasta disolver completamente la agarosa.

Se dejó enfriar el agar hasta 55 - 50 °C manteniéndolo en baño María y se añadió entre 1 - 5 % (v-v) del antisuero mezclándolo perfectamente y se vació en

una placa de cámara de electroforesis Hyland. La cual se había colocado sobre una mesa perfectamente plana y horizontal, se dejó gelificar a temperatura ambiente.

Con la ayuda de un molde adecuado se hicieron 7 perforaciones .

En cinco pozos se colocó un volumen conocido de la solución de antígeno en diferentes concentraciones.

Se incubaron las placas en una cámara húmeda a 37 ° C por 24 - 48 horas.

2.3.8.5. WESTERN-BLOT

2.3.8.5.1. ELECTROFORESIS

Se mezclaron 7 µl del buffer de muestra y 3 µl de marcador de peso molecular (200-40 kilodaltones), 10 µl de buffer de muestra y 10 µl de la muestra problema (*Escherichia coli*, *Salmonella thiphymurium*, *Shigella boydi*, HCl-2 HCl-3 y P23 respectivamente) y se colocaron en un baño de agua hirviendo durante tres minutos para separar las proteínas.

Se llenó la cámara para la electroforesis con solución reguladora de corrimiento, eliminando cualquier burbuja que se formara entre ésta y el borde del gel, con esta misma solución se enjuagaron los pozos en los que se colocaron las muestras.

Se conectaron los electrodos a la fuente de poder a una corriente de 20 mA para 100 Volts.

2.3.8.5.2. INMUNOTRANSFERENCIA

Se cortó un pedazo de papel de nitrocelulosa de 0.45 µm de poro de 10 x 10 cm y se colocó en 200 ml de regulador de transferencia.

En un cassette de la cámara de electroforesis se colocó la esponja "Scotch Brite" humedecida en regulador de transferencia. Sobre la esponja se colocaron 3 rectángulos de papel filtro también humedecidos con buffer de transferencia y sobre ellos se colocó el papel de nitrocelulosa procurando no formar burbujas.

Se colocó el gel sobre el papel de nitrocelulosa.

Se pusieron otros tres rectángulos de papel filtro y finalmente otra esponja.

Se cerró el cassette y se colocó en una cámara de inmunotransferencia. La cámara se colocó a la fuente de poder a 0.2 mA y 15 Volts.

2.3.8.5.3. FIJACIÓN Y TINCIÓN

Al sacar el gel de la cámara de Inmunotransferencia, se puso en una solución fijadora durante 10 min. en agitación constante.

Se colocó el gel en una solución fijadora y posteriormente en una sol. desteñidora (con butanol al 10%) en agitación constante.

Se lavó el gel con agua destilada y se guardó en un plástico a 4 °C.

2.3.8.5.4. INMUNODETECCIÓN

El papel de nitrocelulosa se bloquea con una solución de leche descremada al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente, en agitación constante.

Se hizo una solución de anticuerpo anti HCl-2 en dilución 1:500 (5µl en 2.5 ml).

Se colocó la placa de nitrocelulosa en una bolsa de plástico transparente junto con el anticuerpo. Se selló e incubó en refrigeración a 4° C una noche.

Se lavó tres veces la placa con PBS-T en agitación constante .

Se agregó 2 ml de conjugado de peroxidasa IgG de cabra antiinmunoglobulina de conejo, diluido 1:1000 en regulador de bloqueo y se incubó una hora a 37°C.

Se hicieron tres lavados (10 min. cada uno) en agitación constante con PBS-T y se agregaron 2 ml de sustrato de peroxidasa. Se incubaron 10 min. hasta la aparición de las bandas (ver diagrama metodológico).

ESQUEMA No. 6
TÉCNICA DE INMUNOBLOTS

**Primera fase: electroforesis en geles de poliacrilamida
Y electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa.**

Preparar geles de acrilamida

Gel separador Gel concentrador
(10% T, 2.7% C) ↓ (4% T, 2.7% C)

**Preparar la muestra amebiana en
Amortiguador de tratamiento**

Desnaturalizar la muestra adicionándola
En un volumen igual de amortiguador de tratamiento 2x

Calentar la muestra en ↓ agua hirviendo 90 seg.

Corrimiento electroforético

(15 ug de proteína/ carril. Utilizar amortiguador de electroforesis)
Adicionar en un carril marcador de peso molecular

Durante 1 hr. a 20 MA ↓ corriente constante

**Desmontar el gel y equilibrar
En amortiguador de transferencia.**

Agitar ↓ durante 20 min.

**Transferencia de las proteínas amebianas
A una membrana de nitrocelulosa**
Utilizar amortiguador de transferencia

Durante 90 min. A 400 ma ↓ corriente etc. y agitación

**Desmontar la membrana y verificar la transferencia
De las proteínas amebianas.**

Tinción con rojo de ↓ lavar por 5 min
Ponceau por 5 min. Con PBS (1%)*

Segunda fase: inmunodetección de las proteínas amebianas

Cortar en tiras la membrana de nitrocelulosa y bloquear con leche descremada al 5 % en PBS.

Incubar 1 hr. a t.a. ↓ lavar 5 min. Con pbs-t*
Adicionar la muestra de suero

Incubar 2 hrs. a t.a. ↓ lavar 3 veces 10 min. Con pbs-t*
**Adicionar el conjugado de cabra anti-conejo
Marcado con peroxidasa; diluido 1: 1,000 en PBS**

Incubar 1 hr. a t.a. ↓ lavar 3 veces 10 min. Con PBS-T*

Revelar las proteínas reconocidas por los anticuerpos específicos adicionando el sustrato y el cromogeno correspondientes.

Incubar hasta que aparezcan las bandas ↓ lavar 2 veces 3 min. Con PBS
Calcular el peso molecular de las bandas.

* Todo el proceso se mantiene en agitación constante

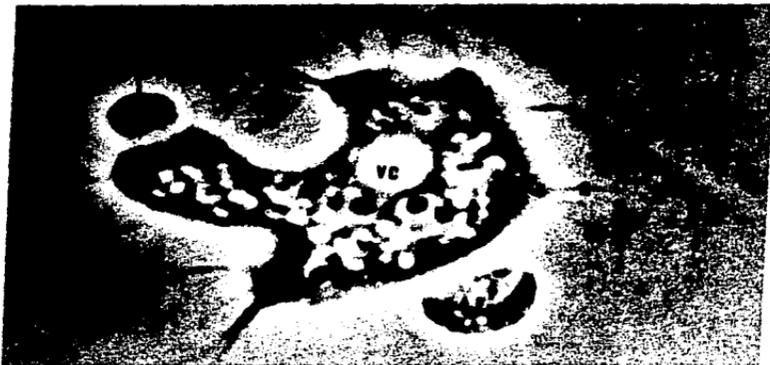
3. RESULTADOS

3.1. MICROCULTIVOS

Se hicieron los microcultivos de acuerdo a la técnica de Pussard (1973) con cada una de las cinco cepas en estudio.

Fue posible hacer observaciones en las diferentes fases del ciclo de vida de estos protozoos sin la presencia de los fármacos. En las fotografías No. 1 y No. 2 se muestran las características morfológicas distintivas del género.

Registro fotográfico:



Fotografía No. 1
Trofozoito de *Acanthamoeba*. Cepa HCI- 3
Cultivo axénico de siete días de crecimiento. 40X.

l = lobopodo
vc = vacuola contráctil.
a = acantópodo.
n = núcleo.



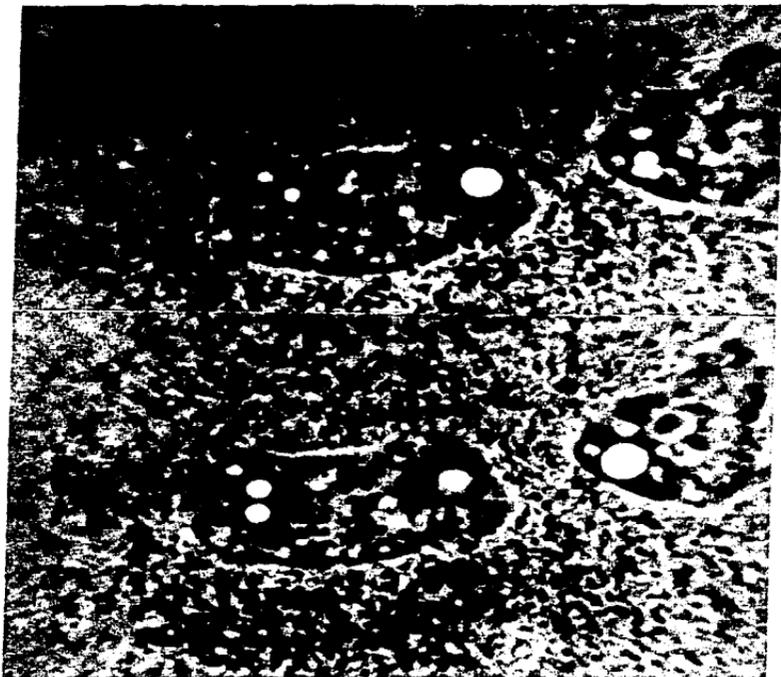
Fotografía No. 2
Quiste de *Acanthamoeba*. Cepa HCI-1
Cultivo monoxénico de 28 días de crecimiento. 40 X

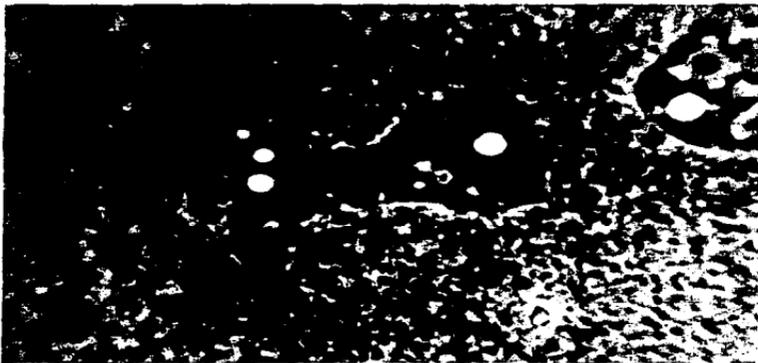
ex = exoquiste
en = Endoquiste
o = opérculo

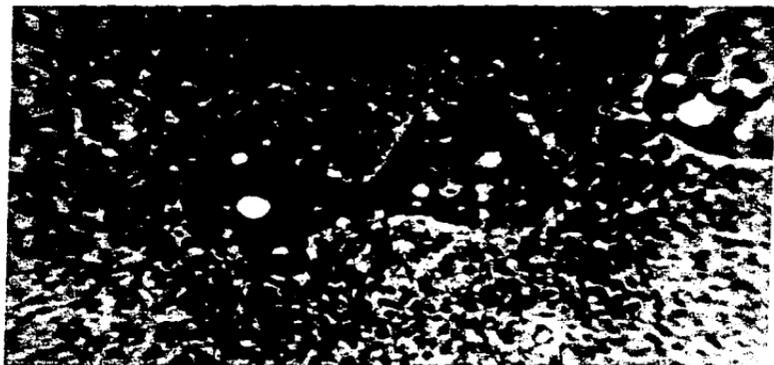
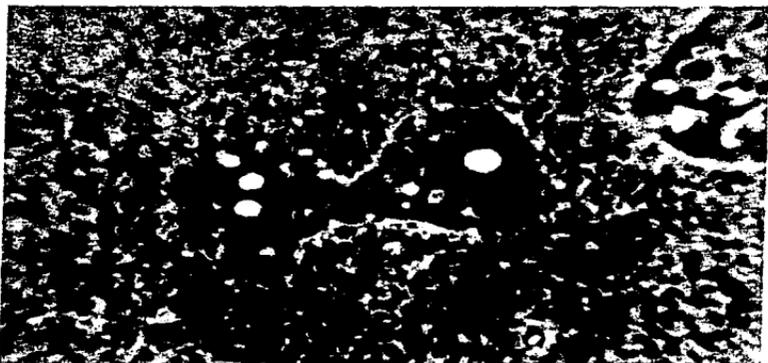
Se tomó una secuencia fotográfica de la cepa HCI-1, en la que se observa el proceso de división celular. La cepa presentó un desarrollo sincrónico en el pequeño ecosistema creado artificialmente.

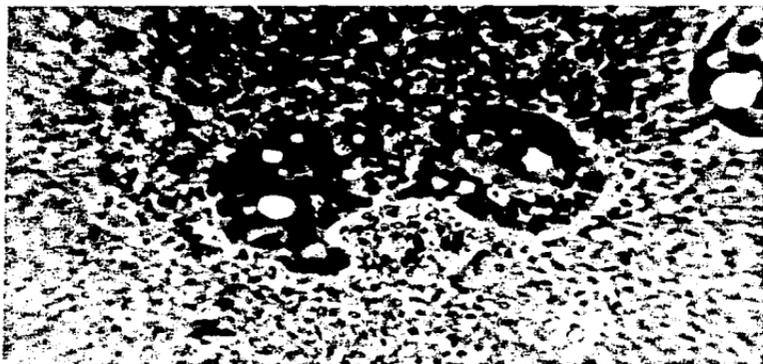
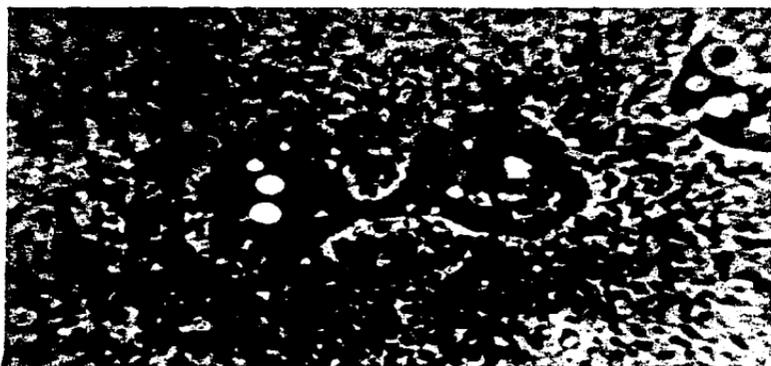
Fotografía No. 3 a la No. 12

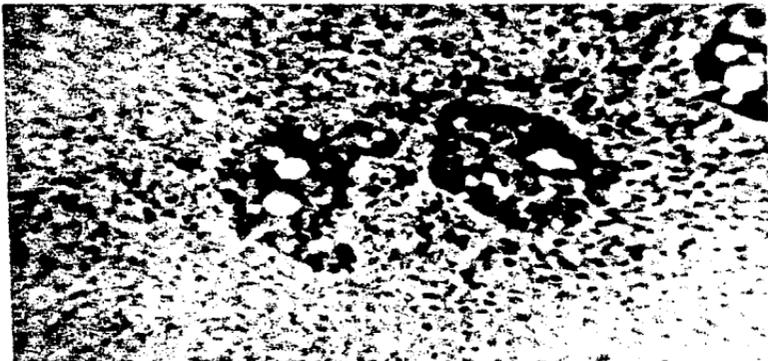
Secuencia de eventos de la división celular de la cepa HCI-1, microcultivo de 7 días de crecimiento vista en el microscopio de contraste de fases.











3.2. SENSIBILIDAD A FÁRMACOS *IN VITRO*

Los acción de los fármacos fue evaluada después de 24 horas de incubación con las amebas.

Se consideró la máxima inhibición Amebiana (MAX) a la concentración del fármaco capaz de inhibir el crecimiento y la división celular de los protozoarios o bien provocar la destrucción del organismo en un 90% de la población en estudio.

Se consideró que había una mínima inhibición Amebiana (min.) cuando la concentración del fármaco era capaz de inhibir el crecimiento y la división celular de los protozoarios o bien provocar la destrucción del organismo en un 25% o menos de la población en estudio.

Los resultados se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 6.
SENSIBILIDAD FÁRMACOS *IN VITRO*

Efecto de los fármacos en cepas de *Acanthamoeba*

Cepa	Itraconazol		Tobramicina		Neomicina	
	D. min. inh.	D. MAX. inh.	D. min. inh.	D. MAX. inh.	D. min. inh.	D. MAX. inh.
HCl-1	0.5 mg	1.0 mg	0.68 mg	1.36 mg	-	-
HCl-2	0.5 mg	1.0 mg	0.68 mg	1.36 mg	0.70 mg	-
HCl-3	1.0 mg	2.0 mg	0.68 mg	1.36 mg	-	-
P ₂₃	-	0.5 mg	0.68 mg	1.36 mg	0.70 mg	-
Ap	-	0.5 mg	-	1.36 mg	-	-

- No se observaron alteraciones en el desarrollo y crecimiento de trofozoitos y quistes.

Se hicieron observaciones de los microcultivos expuestos a los distintos fármacos y se realizó un registro fotográfico de las cepas en estudio.

Los cambios morfológicos observados para las pruebas de sensibilidad a fármacos *in vitro* fueron homogéneos para las cinco cepas en estudio.

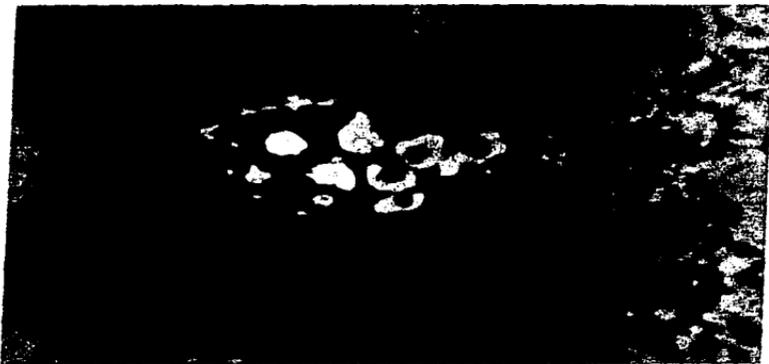
En las observaciones al microscopio de contraste de fases se encontraron las siguientes alteraciones morfológicas:

3.2.1. Itraconazol

Los trofozoítos presentaron alteraciones morfológicas importantes en el 95% de la población: aumento de tamaño, disminución de los acantópodos en número y tamaño, así como también aumento en el tamaño y número de las vacuolas, en algunos trofozoítos se observó un lobópodo más amplio de lo normal, sin guardar proporción con el resto de la ameba.

En los quistes ya maduros se observaron diferentes efectos; la mayoría de los quistes estaban vacíos (70 %), o sea que solamente se encontraban restos de exoquistes, en algunos se observó una alteración de la morfología del endoquiste en donde se perdió la estructura y organización característica (20 %), en otros sin embargo no se observaron alteraciones morfológicas importantes (10 %).

Se observó también la presencia de prequistes sin una organización celular característica (fotografía No. 13)



Fotografía No. 13

Trofozoito de la cepa P23. El trofozoito muestra un aumento en el número de vacuolas y disminución en el número y tamaño de los acantópodos 40X.

3.2.2. Tobramicina

Los trofozoítos también presentaron alteraciones morfológicas en el 90 % de la población; disminución de los acantópodos en número y tamaño, se observó un disminución en el volumen total de las amebas, así como un aumento del tamaño de las vacuolas.

Las formas quísticas se afectaron en una proporción del 60 % y el 40 % restante no presentó alteraciones significativas (fotografía No. 14).



Fotografía No. 14.

Trofozoito de la cepa AP se observa la alteración de la morfología normal de la ameba. Hay un lobópodo amplio, no se observan acantópodos y la vacuola contráctil es de mayor tamaño que lo normal.

3.2.3. Neomicina

No se observaron cambios significativos del efecto de este fármaco en ninguna de las cepas. En la cepa HCl-3 fue posible observar una secuencia de un organismo en división celular (fotografía No. 15).



Fotografía No. 15

Cepa HCl-3 40X

Trofozoito con morfología normal en presencia de Neomicina, que no impidió la división celular del organismo.

3.3. AXENIZACIÓN

Se evaluó el crecimiento amebiano en los medios ya descritos. Las cinco cepas se axenizaron. Los tiempos de axenización y el crecimiento en fase log. se alcanzaron en distintos tiempos:

Se dificultó la axenización de la cepa HCl-1, debido a que se contaminó con una bacteria Gram negativa misma que impidió la adherencia de la ameba en los tubos y botellas utilizadas para la axenización. Fue necesario utilizar una mezcla de kanamicina y penicilina para eliminarla.

El medio en el que obtuvo mejor crecimiento amebiano fue el medio Chang.

AXENIZACIÓN medios de cultivo evaluados.

Cepas en estudio	Casoy	Bactocasitona	Chang
HCl-1	+	+	+
HCl-2	++	++	++
HCl-3	+++	+++	++++
P23	++	+++	++++
Ap	++	+++	++++

- + crecimiento lento y escaso 5% de adherencia en las botellas de cultivos
- ++ crecimiento con el 20% de adherencia en las botellas de cultivo
- +++ crecimiento con el 50% de adherencia en las botellas de cultivo
- ++++ crecimiento con el 75% de adherencia en las botellas de cultivo
- +++++ formación de una monocapa en las botellas de cultivo

Tiempos de axenización de las cepas en estudio reportado en semanas.

Semana	1	2	3	4	5	6	7	8
P23	X							
Ap	X							
PO	X							
HCl-1	X	X	X	X	X	X	X	X
HCl-2	X	X	X	X				
HCl-3	X	X						

Los estudios biológicos posteriores a la axenización se llevaron a cabo con amebas crecidas en el medio Chang por las razones expuestas en la metodología.

Se logró llegar a la fase logarítmica de crecimiento en diferentes tiempos. La cepa P23 lo hizo en 24 horas, la Ap y PQ en 36 horas. La HCI-3 en 48 horas, la HCI-2 en 7 días y la HCI-1 en periodos más prolongados (10 ó más días).

3.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se siguió la técnica ya descrita. Se tomaron fotografías de las cepas en estudio. En ellas se muestran los acantópodos de distintos tamaños, grosor y cantidad.

Se encontraron diferencias importantes en los tamaños promedio de cada cepa, en algunos casos el aumento necesario para ser observados con detalle varió de 2500 a 10,000 x.

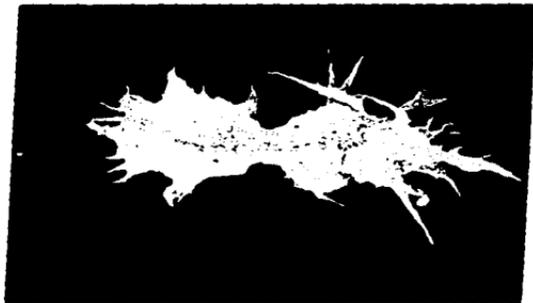
Al hacer las preparaciones de las muestras se observó que las cepas en estudio se adhieren de manera diferente al vidrio.

Se determinó que la cepa P23 se adhiere mejor a las superficies de vidrio de los medios de cultivo mejor que las demás amebas en estudio. Le sigue la cepa Ap, HCI-3, HCI-2 y HCI-1. La cepa P23 forma una monocapa en las botellas de cultivo de tejido en las 24 horas posteriores a su siembra.

La cepa HCI-1 no llegó a formar una monocapa aún 10 días posteriores a su siembra.

El resto de protozoos en estudio se desarrolló en periodos comprendidos entre 24 horas y 5 días.

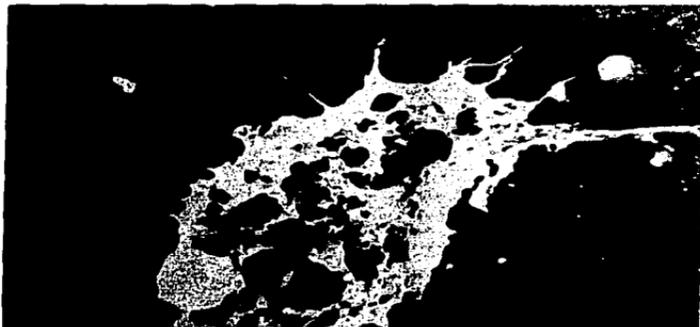
Fue posible observar a la cepa Ap en división celular (fotografía No. 16).



Fotografía No. 16
***Acanthamoeba polyphaga cepa Ap* en división celular a 3000 x**
microscopía electrónica de barrido.

Barra = 10 micras

Se tomaron fotografías de la cepa HCI-1 en cultivo monoxénico con la bacteria contaminante. Se observó que la superficie amebiana tenía perforaciones y daño celular evidente, posiblemente causado por la bacteria contaminante (fotografía No. 17).



Fotografía No. 17

Trofozoito de *Acanthamoeba* spp.

Cepa HCI-1 2000 x con perforaciones en el cuerpo ameboideo provocadas posiblemente por la bacteria contaminante, se observa una disminución del número y tamaño de los acantópodos.

Barra = 10 micras

Se tomaron fotografía de las cepas en diferentes momentos de su ciclo de vida (fotografía No. 18 y 19)



Fotografía No. 18
Trofozoito de *A. polyphaga* de la cepa HCl-2 a 7000 x.
Se observan acantópodos grandes y amplios en la superficie amebiana.
Barra = 10 micras



Fotografía No. 19
Prequiste de *A. polyphaga* de la cepa HCl-3 a 4500 x
Barra = 10 micras

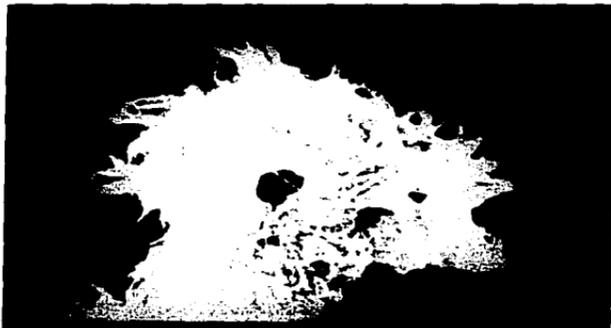
Es importante mencionar que en todas las cepas se observaron cavidades semejando canales bien definidos de aproximadamente media micra, parecidos a los amebostomas presentes en *Naegleria* (fotografías No. 20 y 21).



Fotografía No. 20

Cepa HCl-1 mostrando una cavidad de aproximadamente media micra que al parecer atraviesan el cuerpo amebiano, comparables a los amebostomas presentes en el género *Naegleria*. 3000 x.

Barra = 10 micras



Fotografía No. 21

Cepa Ap. se observa una cavidad que posiblemente atraviesa el cuerpo amebiano. 3000 x.

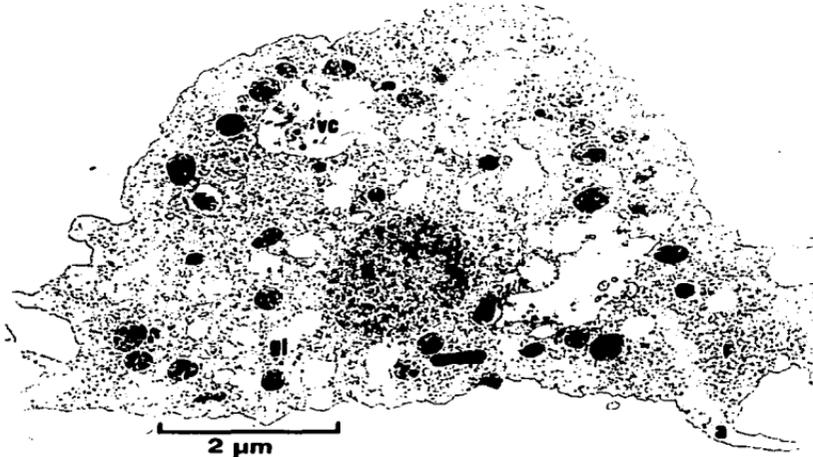
Barra = 10 micras

3.5. MISCROSCOPIA DE TRANSMISIÓN

Las cepas en estudio se fotografiaron en el microscopio de transmisión (Zeiss EM 10). Se compararon entre ellas y entre cepas de referencia descritas con anterioridad.

Fue posible observarlas en distintos momentos de su desarrollo desde el estado trófico hasta el quístico.

No se observaron diferencias significativas entre ellas que permitieran hacer una distinción clara entre las cepas (fotografías No. 22 y 23).

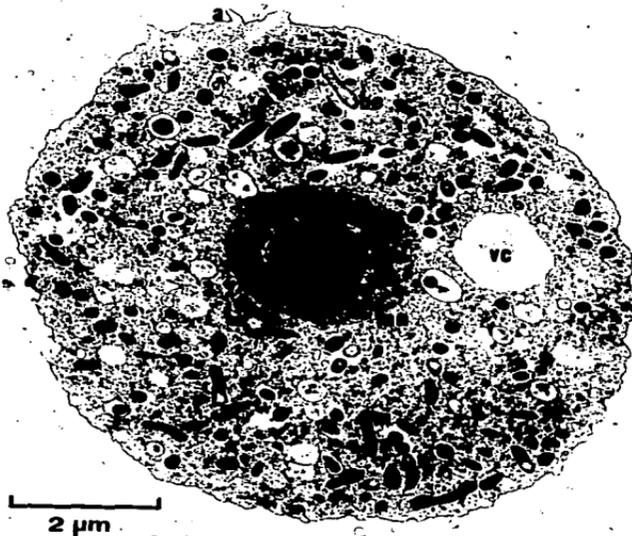


Fotografía No. 22
trofozoito de la cepa HCl-2

n núcleo
m mitocondrias
gl gránulos de lípidos

vc vacuola contráctil
r ribosomas
a acantópodo

En la observación al microscopio de transmisión de la cepa HCl-3 se encontró la presencia de bacterias endosimbiontes en trofozoitos y quistes, las cuales se encontraron en el citoplasma e incluso una de ellas en proceso de división celular (fotografía No. 23 y 24)

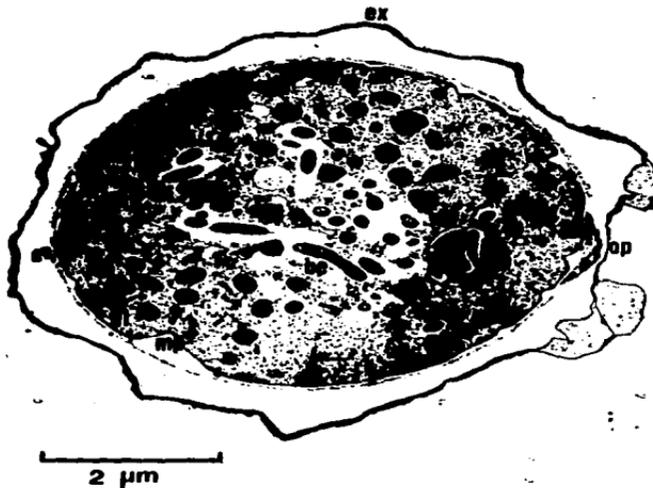


Fotografía No. 23
Trofozoito de la cepa HCl-3

Se muestra el hallazgo de bacterias endosimbiontes en el citoplasma del trofozoito

N núcleo
n nucleolo
mn membrana nuclear
m mitocondrias

vc vacuola contráctil
a acantópodos
be bacteria endosimbionte



Fotografía No. 24

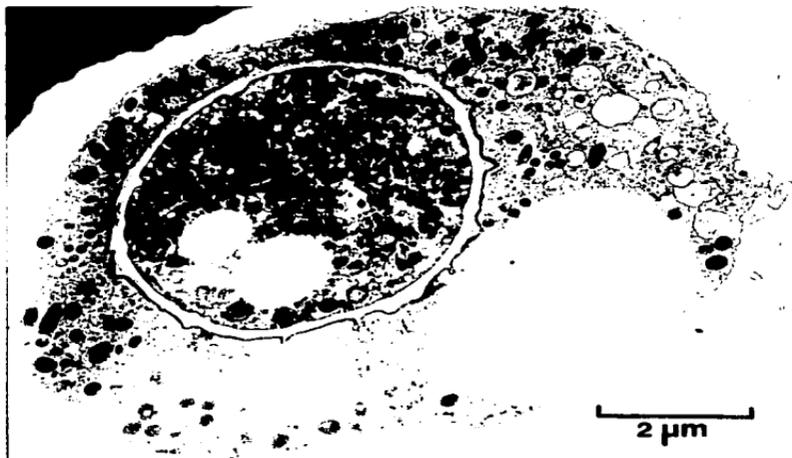
Quiste maduro de la cepa HCl-3

Se muestra el hallazgo de bacterias endosimbiontes en división dentro del quiste.

ex exoquist
en endoquist
mp membrana plasmática
op opérculo

n núcleo
m mitocondria
gl gránulos de lípidos
be bacteria endosimbionte

Se observó en una secuencia fotográfica un fenómeno no descrito con anterioridad en donde un quiste amebiano al parecer ya maduro (se observa el endo y exoquiste bien formados) está dentro de un trofozoito, lo que hace pensar en la existencia de un fenómeno de canibalismo o troglitosis (fotografía No. 25).



fotografía No. 25

Se muestra el hallazgo de un quiste de la cepa HCI-3 dentro de un trofozoito de la misma especie.

Este fenómeno no ha sido descrito, es probable que se trate de troglitosis o canibalismo. O bien que el quiste se haya formado en una zona del trofozoito.

3.5.1. Ultraestructura de otras cepas

Los estudios de microscopía electrónica de transmisión reportados en la literatura donde se muestran las características generales del género *Acanthamoeba*, se realizaron con las especies *A. castellanii* (Bowers y Kan 1968) y *A. astronyxis* (Lasman, 1982). En ellos se describieron los diferentes componentes celulares

Son amebas desnudas, por lo que no se observa material fuera de la membrana plasmática. Esta muestra una estructura trilaminar, la cual parece ser asimétrica ya que la lámina exterior se observa más densa que la interior.

Los acantópodos están compuestos de citoplasma hialino sin vacuolas ni organelos.

Se observa un ectoplasma hialino en el que tampoco hay organelos, sólo se observan gránulos de glucógeno, ribosomas libres y túbulos.

El aparato de Golgi comprende sistemas separadas entre sí por un espacio aproximado de 200 °A, las vesículas tienen un diámetro aproximado de 300 °A.

El retículo endoplásmico rugoso está dispuesto en secciones semicirculares y longitudinales cortas.

Las vacuolas son elementos conspicuos del citoplasma, comprenden al menos dos sistemas separados: las vacuolas pulsátiles y las vacuolas digestivas.

Los trofozoitos presentan gotas de lípidos como reserva, son esféricas con un diámetro promedio de 0.5 micras, no están rodeadas por una membrana trilaminar.

Se observan también reservas de polisacáridos en forma de glucógeno.

Las mitocondrias pueden observarse en dos formas: Elongadas en forma de pequeñas pesas o esféricas, las crestas se forman por anastomosis de extensiones tubulares de la membrana mitocondrial.

Los microtúbulos están presentes en todo el citoplasma, tienen un diámetro aproximado de 250 °A.

Los trofozoitos de *Acanthamoeba* son típicamente mononucleados, aunque en cultivos de agitación pueden presentarse organismos multinucleados.

La observación de las cepas en estudio y en particular de la cepa HCI-1, con respecto a las cepas descritas con anterioridad, permite afirmar que no hay diferencias significativas entre ellas.

3.6. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

3.6.1. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD EN RATÓN

Las pruebas de patogenicidad de las cepas en estudio muestran diferencias importantes entre ellas en lo que a la virulencia se refiere.

Cepa HCI-1.- La evaluación inicial de la virulencia de la cepa HCI-1 como se muestra en el siguiente cuadro, provocó una EAG en todos los ratones y el realislamiento fue positivo en todos los casos, por lo que se le consideró altamente virulenta (Cuadro No. 7). Sin embargo se repitieron las inoculaciones intranasales e intracerebrales 2 años después de la primera y se encontraron diferencias significativas. La ameba fue incapaz de matar al lote de ratones y solo conservó su capacidad invasiva (Cuadro No. 8).

Cuadro No. 7

Evaluación de la patogenicidad de la cepa HCI-1 inmediatamente después de su aislamiento en el primer caso de QA en México

No. de ratón	Inoculación	No de días de fallecimiento	Recuperación de Amebas en:			
			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	+			

+ recuperación positiva de la cepa en medio de cultivo NNE.

Cuadro No. 8

Evaluación de la patogenicidad de la cepa HCI-1, dos años después de su aislamiento del primer caso de QA en México.

No. de ratón	Inoculación	No de días de fallecimiento	Recuperación de Amebas en:			
			Cerebro	Pulmón	Higado	Riñón
1	Intranasal	21*	+	+	+	+
2	Intranasal	21*	+	+	+	+
3	Intranasal	21*	+	+	+	+
4	Intranasal	21*	+	+	+	+
5	Intranasal	21*	+	+	+	+
1	Intracerebral	21*	+			
2	Intracerebral	21*	+			
3	Intracerebral	21*	+			
4	Intracerebral	21*	+			
5	Intracerebral	21*	+			

* sacrificio de los ratones a los 21 días posteriores a la inoculación

Cepa HCI-2.- En la prueba intracerebral los ratones murieron en un tiempo muy corto (3 días), sin recuperar a la ameba del cerebro. En la prueba intranasal no fue capaz de provocar daño en tres de los cinco ratones, los dos restantes murieron a los 7 y 11 días posteriores a la inoculación, sin recuperar la cepa de los órganos en ningún ratón. (Cuadro No. 9)

Cuadro No. 9
Evaluación de la patogenicidad de la cepa HCI-2 posterior a su aislamiento del segundo caso de QA en México.

No. de ratón	Inoculación	Días de fallecimiento	Recuperación de Amebas en:			
			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	-	-	-	-

- recuperación negativa de la cepa en medio de cultivo NNE

Cepa HCI-3.- Esta cepa en ambos tipos de inoculación no causó la enfermedad, aún inoculándola inmediatamente después de haber sido aislada del paciente del tercer caso de Q.A. Fue necesario sacrificar a los ratones para recuperar la cepa, la cual se aisló del cerebro de los ratones inoculados intracerebralmente en todo el lote. De la prueba intranasal se aisló de pulmón y cerebro en algunos ratones solamente. (Cuadro No. 10)

Cuadro No. 10

Evaluación de la patogenicidad de la cepa HCI-3, posterior a su aislamiento del tercer caso de QA en México.

Cepa HCI-3

No. de ratón	Inoculación	No de días de fallecimiento	Recuperación de Amebas en:			
			Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	Intranasal	21*	+	+	-	-
2	Intranasal	21*	+	+	-	-
3	Intranasal	21*	-	+	-	-
4	Intranasal	21*	-	+	-	-
5	Intranasal	21*	-	-	-	-
1	Intracerebral	21*	+			
2	Intracerebral	21*	+			
3	Intracerebral	21*	+			
4	Intracerebral	21*	+			
5	Intracerebral	21*	+			

+ recuperación positiva de la cepa en medio de cultivo NNE

- recuperación negativa de la cepa en medio de cultivo NNE

* Sacrificio de los ratones 21 días posteriores a su inoculación

Cepa P23.- La cepa P23 a pesar de ser considerada como altamente virulenta al momento de adquirirla del catálogo de referencia de la ATCC, no mostró el mismo comportamiento en el laboratorio, cabe mencionar que transcurrió un período de 2 años desde su compra hasta el momento de realizar esta prueba (cuadro No. 11)

Cuadro No. 11
Evaluación de la patogenicidad de la cepa P23

No. de ratón	Inoculación	No de días de fallecimiento	Recuperación de Amebas en:			
			Cerebro	Pulmón	Higado	Riñón
1	Intranasal	21*	-	-	-	-
2	Intranasal	21*	-	-	-	-
3	Intranasal	21*	-	-	-	-
4	Intranasal	21*	-	-	-	-
5	Intranasal	21*	-	-	-	-
1	Intracerebral	21*	-	-	-	-
2	Intracerebral	21*	-	-	-	-
3	Intracerebral	21*	-	-	-	-
4	Intracerebral	21*	-	-	-	-
5	Intracerebral	21*	-	-	-	-

- recuperación negativa de la cepa en medio de cultivo NNE
- Sacrificio de los ratones 21 días posteriores a su inoculación

Cepa Ap.- Esta cepa también corresponde a una ameba adquirida de la ATCC dos años anteriores a su utilización en este trabajo, la cual no produjo la infección cuando se inoculó intranasalmente, aunque invadió pulmón cuando se analizaron los órganos obtenidos por sacrificio de los ratones. En la prueba intracerebral solamente causó la infección en tres de los cinco ratones con recuperación positiva en cerebro (Cuadro No. 12).

Cuadro No. 12
Evaluación de la patogenicidad de la cepa Ap.

No. de ratón	Inoculación	No de días de fallecimiento	Recuperación de Amebas en:			
			Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	Intranasal	21*	-	+	-	-
2	Intranasal	21*	-	+	-	-
3	Intranasal	21*	-	+	-	-
4	Intranasal	21*	-	+	-	-
5	Intranasal	21*	-	-	-	-
1	Intracerebral	6	+			
2	Intracerebral	6	+			
3	Intracerebral	7	+			
4	Intracerebral	21*	-			
5	Intracerebral	21*	-			

- + recuperación positiva de la cepa en medio de cultivo NNE
- recuperación negativa de la cepa en medio de cultivo NNE
- * sacrificio de los animales 21 días posteriores

Se observó que después de hacer resiembras consecutivas por períodos prolongados de las cepas axénicas, éstas perdieron su virulencia.

Resulta importante mencionar que al hacer estudios colaterales de patogenicidad en ratón, y evaluar cortes histopatológicos de diferentes órganos, no se encontraron lesiones, ni evidencias de inflamación o daño sugestivo que indicara la presencia de las amebas, sin embargo se observó poliploidía y megalocitosis en hígado característico del daño que provoca la ingestión de aflatoxinas. Se analizó el alimento utilizado para los ratones y se encontró una concentración aproximada 2 a 3 microgramos por gramo de alimento. Evaluado por la QFB Carolina Moreno Ramos del Laboratorio de Tecnología de Calidad de Alimentos de la FES Cuautitlán.

3.6.2. MODELO EXPERIMENTAL EN CONEJO

3.6.2.1. INOCULACIÓN POR GOTEO

Con este esquema de inoculación superficial se observó que los conejos presentaron una queratoconjuntivitis leve (grado 1), en los tres primeros días posteriores a ésta. En los días subsiguientes se observó una recuperación notable, la cual en el período comprendido entre 7 - 9 días se consideró como recuperación total.

Se observó un daño levemente mayor (grado 1-2) en el lote de conejos inmunosuprimidos.

No se observaron diferencias entre el grupo de conejos con abrasión corneal superficial con talco e hipoclorito.

Se repitió el esquema de inoculación 1 mes después, bajo las mismas condiciones iniciales, obteniendo los mismos resultados.

Dada la recuperación total de los conejos no se consideró necesario su sacrificio para enucleación.

3.6.2.2. INOCULACIÓN INTRAESTROMAL

Evaluación clínica de la Queratitis Amebiana

El 80 % de los conejos presentó hiperemia conjuntival, el 70 % edema epitelial y estromal, el 70 % infiltrado estromal, el 10 % infiltrado estromal anular, el 60% leucoma corneal, el 50 % rubeosis iridis, el 40 % reacción inflamatoria en cámara anterior y el 10 % vascularización corneal.

En el lote de conejos destinados a la evaluación clínica de la QA se presentó mejoría en el cuadro clínico a los 12 días y curación en los 25 días posteriores a su inoculación.

Evaluación de fármacos *in vivo*

Ketoconazol

El grupo tratado de ketoconazol vía oral presentó una mejoría del cuadro clínico a los 15 días y curación a los 27.

El grupo tratado con ketoconazol vía tópica presentó una mejoría del cuadro clínico a los 15 días y curación a los 27.

Itraconazol

El grupo tratado con Itraconazol vía oral presentó mejoría del cuadro clínico a los 13 días y curación a los 21.

El grupo tratado con Itraconazol vía tópica presentó mejoría del cuadro clínico a los 9 días y curación a los 22 días.

Recuperación de las amebas por siembra en medio NNE

En el 6% de los conejos enucleados se recuperó la cepa de *Acanthamoeba polyphaga* (HCl-3), en las 48 horas posteriores a su inoculación, en el resto de los animales fue negativa la recuperación de la cepa.

Reacción en cadena de polimerasa PCR.

Se presentaron resultados positivos en el 90 % del grupo control .

Para el grupo tratado con ketoconazol vía oral fue negativa en el 30 % de los conejos a los 14 días de tratamiento y en el 70 % a los 28 días.

Para el grupo tratado con ketoconazol vía tópica, la prueba fue negativa en el 33 % en los primeros 14 días de tratamiento y en el 67 % a los 28 días

Para el grupo tratado con Itraconazol vía oral, la prueba fue negativa en el 70 % de los animales a los 14 días de tratamiento y en el 30 % a los 28 días.

Para el grupo tratado con Itraconazol vía tópica, la prueba fue negativa en el 70 % de los conejos 9 días y en el 30 % de los animales a los 28 días.

Es importante mencionar que, se evaluaron tres sueros elegidos aleatoriamente de los conejos inoculados intraestromalmente, los cuales presentaron títulos altos de respuesta a la cepa HCI-3:

No de Conejo	título del suero
21	1:1024
22	1:156
27	1:1024

3.7. ISOELECTROENFOQUE

Se hicieron los corrimientos isoenzimáticos de las cepas en estudio comparándolas con cepas de referencia de la ATCC representantes de las especies de importancia que conforman el género:

A. polyphaga, *A. mauritanensis*, *A. hatchetti*, *A. quina*, *A. castellanii*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. palestinensis*, *A. divionensis*, *A. culbertsoni*, *A. lugdunensis*.

Se evaluaron las proteínas totales y las siguientes enzimas: malato deshidrogenasa, alcohol deshidrogenasa, leucin aminopeptidasa, glutamato deshidrogenasa y fosfoglucomutasa.

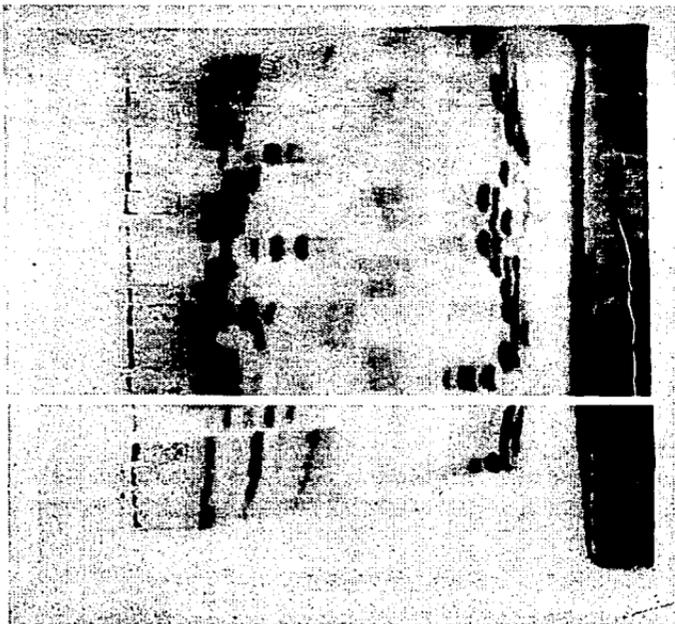
Se observó una similitud de bandas en el corrimiento de proteínas totales de las cepas HCI-1, HCI-2, HCI-3, con respecto a las cepas de referencia PQ, Ap, P23.

Se observó que en los corrimientos con las demás enzimas existen algunas diferencias entre las cepas ya mencionadas.

FOSFOGLUCOMUTASA (FGM)

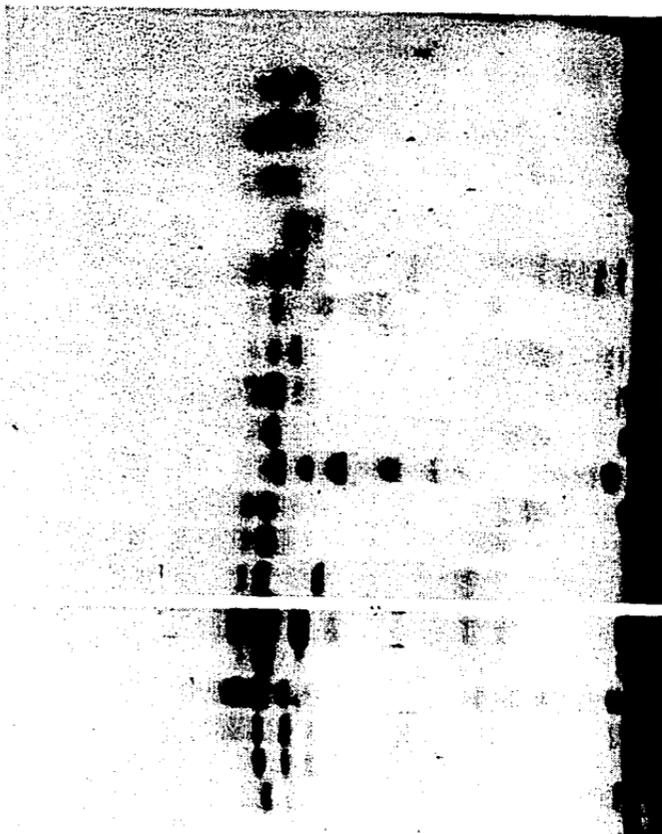
A. divionensis
A. palestinensis
A. lugdonensis
 A. rhyzodes
 A. griffini
A. castellanii (Neff)
A. castellanii (AC)
 A. hatchetii
 A. quina
A. polyphaga (PQ)
 A. polyphaga
A. polyphaga (P-23)
A. mauntaniensis (1652)
A. mauritaniensis (SH1097)

HCl-1
HCl-3
HCl-2
HCl-1



MALATO DESHIDROGENASA (MDH)

A. divionensis
A. palestinesis
A. lugdunensis
A. griffini
A. mauritaniensis
A. rhyzodes
A. castellanii
A. castellanii
A. quina
A. hatchetti
A. lugdunensis (García)
A. mauritaniensis
A. polyphaga
A. polyphaga
A. polyphaga (PQ)
HCl-1
HCl-1
HCl-2
HCl-3



MALATO DESHIDROGENASA (MDH)

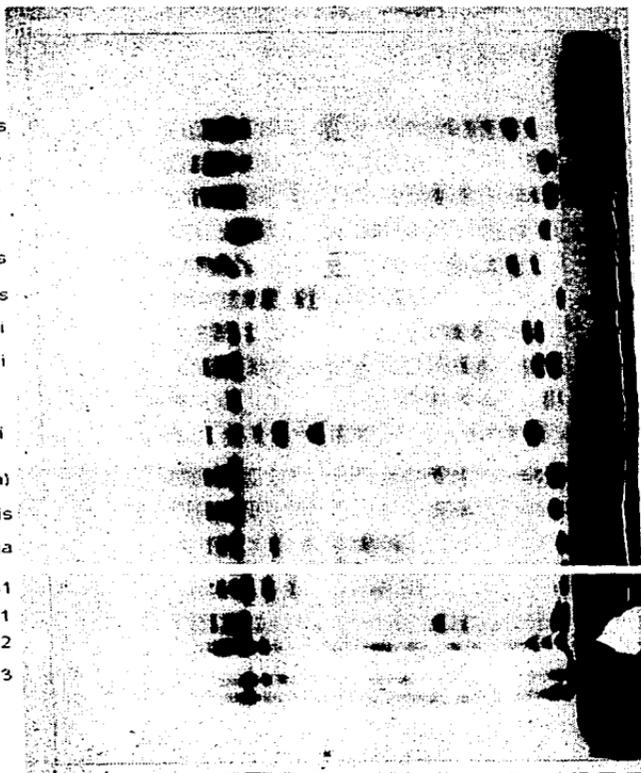
A. divionensis
A.palestinensis
A.lugdonensis
A.rhizodes
A.castellanii (Neff)
A.castellanii (AC)
A.hatchetii
A.quina
A.polyphaga (PQ)
A.polyphaga (PQ)
A.polyphaga
A.polyphaga (P-23)
A.mauritaniensis (1652)
A.mauritaniensis (SH197)

HCl-1
HCl-1
HCl-2
HCl-3

LEUCIN AMINOPEPTIDASA (LAP)

A. divionensis
A. palestinesis
A. lugdunensis
 A. griffini
A. maurentiensis
 A. rhyzodes
A. castellanii
A. castellanii
 A. quina
 A. hatchetti
A. lugdunensis (Garcia)
A. maurentiensis
 A. polyphaga

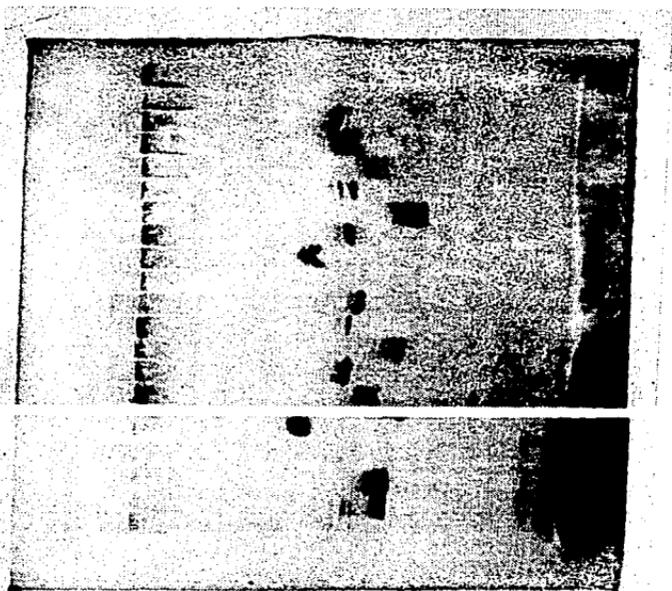
HCL-1
HCL-1
HCL-2
HCL-3



ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH)

A. culbertsoni
A. palestiniensis
A. lugdunensis
A. lugdunensis
A. rhyzodes
A. griffini
A. castellanii
A. castellanii
A. hatchetii
A. quina
A. polyphaga
A. polyphaga
A. mauritaniensis
A. mauritaniensis

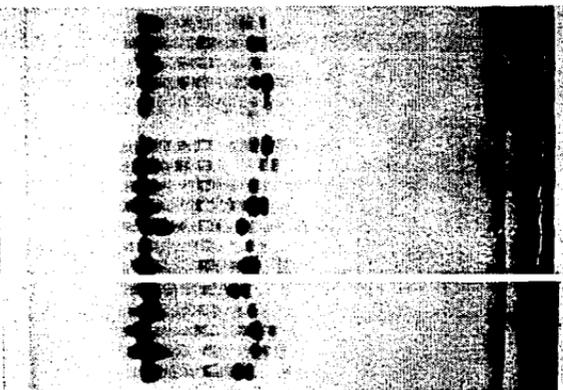
HD
HCl-1
HCl-2
HCl-3



GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH)

A. divionensis
A. palestinensis
A. lugdonensis
A. rhyzodes
A. Griffini
A. castellanii (Neff)
A. castellanii (AC)
A. hatchetii
A. quina
A. polyphaga (PQ)
A. polyphaga
A. polyphaga (P-23)
A. mauritaniensis (1652)
A. mauritaniensis (SH1097)

P23
QD
HCI-3
HCI-2
HCI-1



PROTEÍNAS TOTALES (PT)

A. culbertsoni
A. palestiniensis
A. lugdunensis
A. lugdunensis
A. thyzodes
A. griffini
A. castellanii
A. castellanii
A. hatchetti
A. quina
A. polyphaga
A. polyphaga
A. mauritaniensis
A. mauritaniensis



HD
HCl-1
HCl-2
HCl-3



3.8. PRUEBAS SEROLÓGICAS

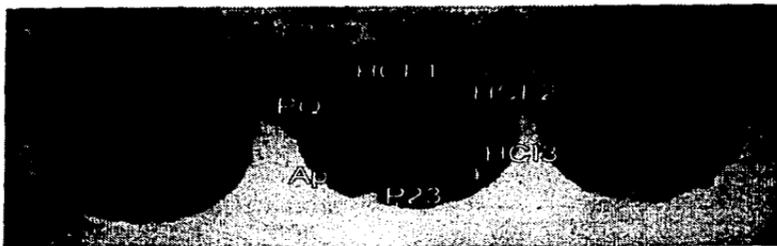
Se obtuvieron sueros anti-*Acanthamoeba* de cuatro de las cinco cepas en estudio. No fue posible obtener el suero anti -*Acanthamoeba* de la cepa HCI-1 porque había contaminación bacteriana en los cultivos y fue muy difícil su axenización.

3.8.1. Titulación de los sueros

se obtuvieron los siguientes títulos:

HCI-2	2048
HCI-3	8192
Ap	8192
P23	1 6384

3.8.2. Inmunodifusión.- se observó una reacción de identidad total entre las cepas de referencia P23, AP y PQ. La cepa HCI-1 presentó una reacción de no identidad con las cepas de referencia.



3.8.3. Western-blot.- Por falta de suero anti-conejo, se hizo un sólo corrimiento con las cepas HCI-2, HCI-3, P23, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Shigella* sp. y suero anti-HCI-2.

El suero anti-HCI-2 reaccionó con las tres cepas amebianas, reconociendo proteínas de bajo peso molecular. Se observaron diferencias comparando las proteínas de bajo peso molecular. Es importante mencionar que para la determinación de proteínas se obtuvieron concentraciones muy bajas de proteínas en las cepas bacterianas y muy altas para las amebas, de manera que rebasaron las concentraciones de la curva patrón. No obstante la baja concentración de proteínas y la débil tinción de las bandas no se observó una reacción del anti-HCI-2 con respecto a las cepas bacterianas.



HCI-3

HCI-2

AP

Salmonella

Shigella

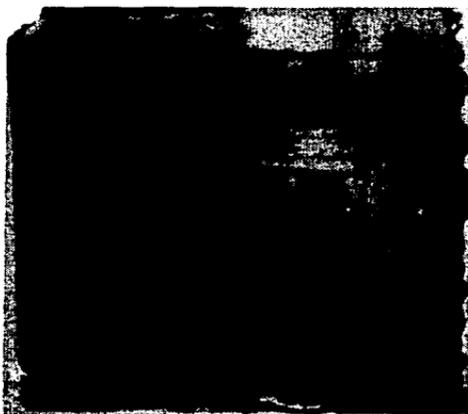
E. coli

P23

HCI-1

HCI-1

Marcador de PM



AP

P23

E. coli

Salmonella

Shigella

HCI-3

HCI-2

HCI-1

HCI-1

Marcador de PM

4. DISCUSIÓN

4.1. MICROCULTIVOS

La implementación de los microcultivos fue importante para la observación de las diferentes fases del desarrollo de las amebas y permitió complementar los estudios de fármacos *in vitro*. A través de ellos fue posible observar con mayor detalle su acción, ya que la técnica propuesta por Kilvington (1991) es cualitativa y sugiere la observación de las amebas en los pozos de las placas de ELISA, lo que no permite una observación tan minuciosa y detallada del efecto de los fármacos como con los microcultivos.

La observación del microcultivo de la cepa HCI-1 en división celular, permite asegurar que de manera general no existen diferencias en este punto en particular entre esta cepa con respecto a las demás especies en estudio que conforman el género *Acanthamoeba*.

Las condiciones ideales de crecimiento que permiten los microcultivos, favorecieron el desarrollo en fase log. de los organismos de la cepa HCI-1 (aún pocos días después de haber sido descontaminada) y de todas las especies en estudio. También se lograron cultivos en fase log. de las cepas: HCI-3, Ap, y P23, que permitieron determinar tiempos de duplicación variable (de 6 horas en la HCI-3 hasta - 8 horas en la HCI-1). La cepa HCI-2 creció de manera irregular sin poder determinar los tiempos aproximados de duplicación. El crecimiento de las amebas descrito con anterioridad coincidió con la capacidad de adherencia y la forma en la que colonizaron la córnea de los pacientes afectados (descritos con mayor profundidad más adelante), de manera que pone en evidencia diferencias entre las cepas en estudio en lo que se refiere al desarrollo, la adherencia, así como la invasión en la córnea y demuestra que aunque estos organismos comparten aspectos importantes como el morfológico y modo de duplicación, también presentan diferencias que deben ser tomadas en cuenta para su descripción al momento de ser ubicadas taxonómicamente.

Con la utilización de los microcultivos se complementa la información al poder observar detalles de la actividad normal, bajo condiciones ideales y de stres de las amebas anfitocicas.

4.2. EVALUACIÓN DE FÁRMACOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Pese a que se han reportados estudios exitosos evaluando el efecto de la Neomicina sobre las amebas anfi-zoicas (Osato y Robinson, 1991; D'Aversa *et al.*, 1995), los resultados de este trabajo mostraron un efecto contrario. En la literatura se menciona que su acción impide la síntesis de proteínas, sin embargo en las fotografías obtenidas las amebas se observan en división celular y sin alteraciones aparentes (fotografía No. 15).

Es probable que la Neomicina no haya presentado un efecto en contra de las amebas por haberse inactivado su efecto bajo las condiciones del modelo de evaluación *in vitro*, el fármaco ni siquiera penetró en las amebas, o bien que los mecanismos metabólicos en la ameba sean independientes del efecto de éste.

La Tobramicina presentó un efecto sobre las amebas, fue evidente la desestabilización de la organización amebiana con su presencia. En la literatura no se menciona a este fármaco como terapia de elección antiamebiana. Vale la pena probarlo con un mayor número de especies, además de comprobar su acción en pruebas *in vivo*. Se cuenta con el antecedente de haber sido utilizado en un paciente con QA aunque en una terapia combinada con el Itraconazol, lo que sugiere evaluar la acción de fármacos en diferentes dosis y en combinación con el Itraconazol por ejemplo, tal y como se administró clínicamente.

En este estudio el Itraconazol presentó un efecto constante y homogéneo en las cepas evaluadas y concordó su efecto en las pruebas *in vitro* e *in vivo* que se llevaron a cabo, afectando la acción de estos fármacos a las dos formas de vida de las amebas (trofozoito y quiste), de igual modo el Ketoconazol evaluado *in vitro* en un estudio preliminar, e *in vivo* en este trabajo presentó un efecto similar al Itraconazol. Además se cuenta con el antecedente de que fueron probados con éxito en los tres primeros casos detectados de Queratitis Amebiana en México.

Cabe mencionar que en el transcurso del trabajo experimental se presentó un caso de EAG como complicación a un tumor neuroectodérmico en un infante, mismo que fue reportado en un estadio avanzado, ya que el daño en cerebro era del 70 %, a pesar de ello se aplicó Anfotericina B intratecal por un periodo de 15 días, se observó una leve mejoría al disminuir la población amebiana, pero las amebas crecieron nuevamente, por lo que se tomó la decisión de utilizar Itraconazol como alternativa, basados en la experiencia de su utilización en

pacientes con QA. Después de su aplicación por un período de 7 días la población trófica y quística disminuyó considerablemente, sin embargo las lesiones crónicas e irreversibles del paciente no permitieron evaluar la acción del fármaco en ese sitio en particular de manera más amplia, ya que el infante murió después de 2 meses de haber sido tratado.

La acción de estos fármacos en las amebas parece ser muy similar a la que se presenta en la investigación de Junes *et al.*, (1994) con respecto al estudio del efecto de los diazoles en los hongos; Las observaciones al microscopio de contraste de fases indicaron una alteración del equilibrio hídrico; se observó un aumento del número y volumen de las vacuolas contráctiles y redondeamiento de los organismos, con la consecuente pérdida de la organización celular y posterior destrucción de las amebas. Esta observación complementa los resultados obtenidos y permite afirmar que la acción del Itraconazol y Ketoconazol es semejante.

Es posible que se pueda considerar al Itraconazol como un fármaco de elección eficaz contra la QA, si se evalúa su acción con un número mayor de cepas de la misma especie y con otras involucradas con la patología, para evitar contradicciones en los resultados que impidan un análisis correcto de su papel como posibles vías de curación.

Las contradicciones en la implementación y recomendación de un esquema terapéutico de elección se debe en gran medida, a que se han evaluado los fármacos con diferentes técnicas (cada autor propone una distinta manera de validar su prueba), por lo que la principal razón que da origen a la confusión de elegir a uno u otro fármaco radica en la falta de una metodología estandarizada para su evaluación, lo que no permite tener un patrón de comparación que sea equivalente entre ellos. Además no se han tomado en cuenta las diferencias intraespecíficas que se encontraron en este trabajo, o sea que no es posible considerar exitoso un fármaco solamente cuando se prueba con una cepa de referencia que se considere sea representativa del género, ya que como se observó en este estudio existen diferencias biológicas importantes que favorecen comportamientos de modo distinto entre ellas. Kilvington (1991) resalta además las diferencias inherentes a las cepas que les permiten ser resistentes a determinados fármacos y a otros no.

Debe considerarse que las discrepancias que se observan entre el efecto de los fármacos *in vivo* e *in vitro* pueden deberse a que en los animales de

experimentación se presentan factores que deben ser tomados en cuenta; La presencia de otros patógenos en los animales de experimentación, los mecanismos de resistencia inherentes del organismo tomado como modelo, además de considerar la respuesta inmune del animal de experimentación, la susceptibilidad genética de cada organismo, situaciones predisponente como traumatismo o irritaciones químicas que alteren el buen funcionamiento de la córnea.

Sería recomendable tomar en cuenta las siguientes consideraciones para lograr encontrar un tratamiento óptimo de la QA y/o confirmar la eficacia del Itraconazol y Ketoconazol como fármacos de elección:

Uno de los puntos más importantes a tomar en cuenta, son las dosis de los medicamentos utilizados, las vías de administración (oral o tópica), así como los tiempos de exposición del fármaco, por ejemplo es importante hacer mención que las amebas que sobrevivieron a la acción del los fármacos estudiados, al restablecer las condiciones ideales para su desarrollo, crecieron con normalidad, es por ello que se recomienda que las terapias sean implementadas por tiempos prolongados.

Osato y Robinson (1991) mencionan la importancia de encontrar un fármaco capaz de eliminar al 100% de la población amebiana, por lo que piensan que no debe considerarse como exitosa la utilización de ningún fármaco que no cumpla con este requisito, si bien es una condición ideal y debe buscarse como meta final, no se debe olvidar que el restablecimiento de una visión adecuada y la conservación del ojo afectado bien vale la aplicación de terapias prolongadas mientras ésta se logra.

Debe considerarse también el efecto de los fármacos en los diferentes estadios tanto trófico como quístico, edad de los cultivos, tipo de medios en los cuales se prueban, recuperación de los organismos (viables) después de la exposición a los fármacos.

El esquema de evaluación de fármacos *in vitro* que se utilizó en este trabajo se tomó del propuesto por Kilvington (1991), las modificaciones que se realizaron permitieron hacer evaluaciones semicuantitativas por lo que es más confiable su interpretación.

4.3. AXENIZACIÓN

A pesar de que en un inicio no se consideró pertinente tomar en cuenta la axenización como un objetivo de trabajo, ya que es parte de la metodología cotidiana para estudiar las amebas anfitriónicas, se le dio más importancia por las diferencias tan marcadas que se presentaron con las distintas cepas en estudio, en cuanto a los tiempos de axenización y forma en la que se logró. Lo que demostró diferencias significativas a partir de este punto de trabajo.

Todas las cepas presentaron tiempos de desarrollo óptimo diferentes, no obstante que se encontraban bajo las mismas condiciones de temperatura, pH y medio de cultivo.

La axenización permite en todo caso llevar a cabo los estudios biológicos necesarios para describir y comparar a las amebas en un mismo ambiente y asegurar que no existe ningún agente externo capaz de modificar los resultados, sin embargo al encontrar bacterias endosimbiontes en amebas ya axenizadas es necesario ahora definir el papel que desempeñan cada una de éstas en la biología de las amebas.

Se sabe que algunas bacterias endosimbiontes aumentan su diversidad como resultado de una interacción con *Acanthamoeba* (Tyndall *et al.*, 1992). Fritsche (1993), encontró que existen bacterias endosimbiontes obligadas que cohabitan con amebas del catálogo del ATCC mantenidas en medios axénicos, así como en amebas aisladas de diversos medios. Es importante conocer si estas bacterias participan activamente en la sobrevivencia de las amebas, modifican, exacerbaban o son las responsables (parcial o totalmente) de la virulencia. De confirmarse esta participación conjunta, se explicarían parte de las diferencias intraespecíficas encontradas, ya que la cepa HCl-3 en donde están presentes las bacterias endosimbiontes presentó una virulencia de mayor grado que la HCl-2 que no las tiene. En lo que se refiere a la cepa HCl-1 no fue posible hacer esa comparación, ya que al momento de hacer los cultivos estaba contaminada con otra bacteria externa. Esta propuesta de estudio, aportaría datos sobre los mecanismos de patogenicidad en su fase parasitaria, por lo que es importante determinar si estas bacterias están presentes también en amebas en su fase de vida libre. Se sabe que algunas *Acanthamoebas* dependiendo del medio en el que se encuentren muestran

una capacidad distinta de liberar enzimas colagenolíticas (Mitra *et al.*, 1993) y tal vez estas bacterias participen activamente en este hecho.

4.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

La observación de las cepas a través del microscopio electrónico de barrido permitió encontrar diferencias morfológicas de los acantópodos entre las cepas en estudio.

La presencia de los acantópodos, su forma, número y tamaño, deben jugar un papel importante en la adherencia a las distintas superficies. Los acantópodos cortos y abundantes, es posible que faciliten la permanencia de estos organismos en la córnea y lentes de contacto, y por ende permitan la invasión en estas superficies. Se observó que existe una relación entre las cepas con este tipo de acantópodos y la eficiencia en la adhesión a las superficies de las botellas de cultivo de tejidos. Es importante comprobar que en efecto existe una relación entre las cepas con este tipo de acantópodos y la eficiencia en la adhesión a las diferentes superficies. *A. polyphaga* es una de las especies aisladas con mayor frecuencia en casos de QA, es posible que la adhesión a la superficie corneal o de lentes de contacto se vea favorecida por la presencia de este tipo de acantópodos.

En la actualidad los lentes de contacto son más hidrofílicos para favorecer el recambio de gases en la superficie corneal, lo que constituye un vehículo ideal para la adhesión de los trofozoítos, los acantópodos cortos y abundantes podrían amoldarse con mayor facilidad a la superficie porosa y húmeda de los lentes, lo que permite asegurar la permanencia de los organismos sin ser removidos con facilidad lo que permite iniciar a su vez el proceso de invasión a la córnea.

Si se relaciona el número, el tamaño y forma de los acantópodos de las amebas en estudio encontramos que:

- Las cepas P23 y Ap presentan una gran cantidad de finos y pequeños acantópodos en todo el cuerpo amebiano (fotografía No. 16), son las cepas que crecieron mejor y más rápidamente en las cajas de cultivo de tejidos, en donde se adhirieron y formaron monocapas en unas cuantas horas. Desafortunadamente no fue posible probar estas cepas en el modelo experimental en conejo para corroborar que esta facilidad en el desarrollo de monocapas esta relacionada entre

otras con los acantópodos y por lo mismo con las etapas iniciales de la invasión de estos protozoos en la córnea.

La cepa HCI-3 que presentó también un número abundante de acantópodos, aunque en menor cantidad que la cepas mencionadas con anterioridad (fotografía No. 19), fue capaz de formar una monocapa en las cajas de cultivo de tejido (medio axénico) y también en medio monoxénico crecieron de forma uniforme y radial en las cajas de Petri y lo hicieron en un tiempo corto (3 días). En este caso si fue posible hacer una correlación clínica, ya que la infección corneal que originó fue capaz de producir una lesión ulcerada de 2 mm en la región paracentral temporal, de 8 días de evolución, la cual se resolvió en 1 mes, utilizando Itraconazol oral y Tobramicina tópica. La gran ventaja para el paciente es que su diagnóstico fue temprano y permitió implementar un esquema adecuado para su eliminación.

-La cepa HCI-2 bajo el microscopio electrónico de Barrido presentó acantópodos más grandes y anchos, en un número más reducido que las cepas anteriores. En medio axénico, formó monocapas en un tiempo más prolongado. En el medio monoxénico se desarrolló de manera desordenada, sin crecimiento radial, asincrónico y en poca cantidad. Esto coincide también con la manera en la que se comportó en el paciente, las lesiones que causó no fueron graves ni aparatosas, al realizar un raspado corneal no se encontró gran cantidad de organismos. Se inició el tratamiento con Itraconazol y Tobramicina y en un período de 15 días la lesión corneal era mínima, desafortunadamente el paciente suspendió y cambió su tratamiento por corticoides, por lo que fue necesario 2 meses después hacer un trasplante de córnea.

-En lo que respecta a la cepa HCI-1, después de su aislamiento del primer caso reportado de QA en México, la cepa presentó un crecimiento homogéneo, sincrónico en medios sólidos de un modo muy semejante a la forma en la que invadió la córnea del paciente, ya que un período de 1 mes invadió casi el 100% de la córnea, desafortunadamente no fue posible relacionar esta exitosa invasión con la presencia de los acantópodos y adherencia a la córnea, a través de la microscopía de barrido, por la contaminación bacteriana que presentó, es probable que la bacteria contaminante produzca enzimas que impidan la adherencia, de manera semejante como lo hacen algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas* o *Staphylococcus* (Gorlin *et al.*, 1996), o bien es factible que exista competencia

entre las amebas y las bacterias por los sitios de adherencia y dado que las bacterias se duplican en periodos de tiempo más cortos, la población bacteriana ocupe en menor tiempo los espacios disponibles.

El hallazgo de las alteraciones morfológicas de la cepa HCI-1 en presencia de las bacterias contaminantes abre un camino de investigación, ya que es necesario determinar el tipo de bacteria, conocer e identificar el o los productos bacterianos que provocan las lesiones en la superficie amebiana y determinar la posibilidad de utilizarlos como una nueva estrategia de tratamiento en base a una sustancia producida de forma natural por las bacterias, tal vez como un mecanismo de defensa propio de estos organismos.

El hallazgo de estructuras semejantes a amebostomas en las cepas estudiadas debe tomarse en cuenta con más detalle. En el género *Naegleria* se relacionan con fagocitosis y virulencia. Es importante continuar la búsqueda de estas estructuras en otros integrantes del género, además de conocer el papel que desempeñan en la virulencia de estos protozoos. Solo existe un reporte que menciona a estas estructuras. Díaz (1991) estudiando la fagocitosis de amebas del género *Acanthamoeba* sugiere su presencia y las considera semejantes a las de *Naegleria* y expone fotografías muy semejantes a las tomadas en el presente trabajo.

4.5. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN

La observación de las cepas en estudio y en particular de la cepa HCI-1, con respecto a las cepas descritas por Bowers y Korn (1968) y Lasman (1982), permite afirmar que no hay diferencias morfológicas significativas entre ellas, las diferencias existentes pueden ser más bien de tipo fisiológico, como las siguientes:

Se observaron diferencias: Al momento de crecer en medios específicos, las cepas asimilaron los nutrientes de manera diferente, lo que favoreció el desarrollo de una cepa y de otras no.

Las cepas presentaron diferentes grados de virulencia, no obstante todas ellas crecieron y se mantuvieron en medios artificiales por tiempos prolongados.

La producción de enzimas o zimogramas diferentes en los corrimientos electroforéticos, en algunas especies y en otras no, incluso entre las cepas consideradas como de referencia.

Por otra parte también llama la atención el hallazgo de un quiste dentro de un trofozoito de la cepa HCI-3, lo que hace pensar en la posibilidad de la existencia del fenómeno de troglitosis o canibalismo.

Niederckon *et al.*, (1994) caracterizaron el efecto citopático de *Acanthamoeba* y menciona que no hay evidencia de troglitosis o fagocitosis de células en cultivo de tejidos y que más bien se da un contacto con éstas a través de canales de calcio y elementos del citoesqueleto. Sin embargo Díaz (1991) considera probable la existencia de la troglitosis en integrantes del género. Otra explicación sobre la presencia del quiste maduro dentro del trofozoito puede ser la formación del quiste en una zona del trofozoito, sin involucrar a todo el cuerpo amebiano, de una manera semejante como lo hacen las bacterias que producen esporas. Vale la pena ampliar el estudio que permita aportar más información sobre este hallazgo, determinar si el trofozoito se destruye y perdura el quiste que se sabe es resistente a un entorno agresivo, si el proceso de enquistamiento "parcial" es parte de un proceso de economía que permita conservar la mínima cantidad de estructuras necesarias para la sobrevivencia del organismo al momento encontrar condiciones ideales para su desarrollo, o bien que las condiciones desfavorables se presentaron súbitamente y solo una región específica e importante del trofozoito se protegió del entorno agresivo.

4.6. PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

4.6.1. MODELO EXPERIMENTAL EN RATÓN

Se considera al ratón como el animal ideal para seguir la infección que se provoca en el SNC por la similitud del cuadro clínico entre el ratón y el humano (Martínez, 1993).

La evaluación de la patogenicidad de estas cepas muestra también diferencias en el comportamiento de las amebas. Mientras que la cepa HCI-1 fue muy virulenta en una primera evaluación de su poder patógeno, las demás fueron invasivas sin presentar la virulencia que mostró la HCI-1.

Llama la atención la disminución de la virulencia después del aislamiento de las cepas y posterior mantención en medios artificiales, aunque no se pierde la capacidad invasiva, que a través del tiempo conservan estos organismos. Lo anterior puede explicarse por las condiciones tan diferentes en las que se mantiene

a la cepa con respecto al medio en el que se encuentra cuando esta en la córnea, en los medios artificiales no es indispensable la liberación de enzimas proteolíticas ya que los nutrientes necesarios para su desarrollo forman parte de los medios de cultivo. Lo que sugiere que para la realización de cualquier prueba es importante asegurarse de que la virulencia sea la misma que cuando estas cepas fueron aisladas.

Al hacer una correlación de la virulencia y el cuadro clínico que produjeron las tres cepas aisladas de los primeros casos clínicos de QA, se encontró que coincide perfectamente el daño causado en córnea y la virulencia reportada.

Existen reportes que indican como aumentar la virulencia. Se menciona que es necesario inocular las amebas intranasalmente en serie de tres para asegurar este aumento de virulencia, lo que debe considerarse como una regla antes de cualquier estudio de correlación clínica (Hadas y Mazur, 1993).

Tanaka (1994) enfatiza que la patogenicidad de *Acanthamoeba* en humanos aún no ha sido dilucidada del todo, se conoce el daño que se produce en el sistema nervioso central y se sospecha que la vía de diseminación es hematogena, pero no se ha descrito el daño en los otros órganos, por lo que resulta conveniente hacer un seguimiento más completo de la invasión en los diferentes órganos y la manera en la que produce el daño en infecciones crónicas del sistema nervioso central.

Vale la pena considerar la inmunosupresión que provocó en los ratones la ingestión de alimento contaminado con aflatoxinas, la cual puede facilitar el desarrollo de la infección. Sería conveniente tomar en cuenta esa inmunosupresión cuando se trate de aumentar la virulencia en ratones, de modo que facilite la invasión de las amebas en un tiempo más corto de lo esperado, con el consecuente aumento de la virulencia. Sin embargo en pruebas rutinarias para evaluar la patogenicidad de cepas aisladas de casos clínicos, es necesario utilizar ratones sanos para determinar el daño que estas amebas sean capaces de provocar a través de mecanismos de patogenicidad propios, de lo contrario es probable que la inmunosupresión permita la invasión de las amebas por no existir mecanismos que lo impidan, más que por la penetración en tejido y liberación de enzimas específicas. Lo que traería resultados erróneos de interpretación del papel que juegan estos protozoos en determinados procesos patológicos de etiología no bien determinada.

Por otra parte resulta interesante considerar si las cepas invasivas no patógenas modifican su virulencia al presentarse algún proceso de inmunosupresión, como el que se dio con los ratones. O bien que un proceso inmunosupresor facilite la invasión de las amebas sin presentarse un proceso inflamatorio, que no permita una correlación clínica adecuada del daño real que produzca la ameba en éstos.

4.6.2. MODELO EXPERIMENTAL EN CONEJO

El análisis de los esquemas de inoculación en el modelo experimental en conejo mostró un curso clínico irregular. La abrasión corneal superficial no fue suficiente para provocar la QA con un curso clínico semejante al que se presenta en el humano. La inoculación intraestromal permite que la ameba produzca una infección corneal leve con tendencia a autolimitarse.

El modelo que se estudió fue implementado con un porcentaje muy alto de trofozoitos (90%), es probable que éstos no pudieran invadir la córnea por las siguientes razones:

- ◆ **Modelo de inoculación por goteo.**- El talco y el hipoclorito produjeron una abrasión corneal muy leve que no dañó el epitelio corneal lo suficiente para permitir la entrada de las amebas como se esperaba, la queratitis que se presentó se resolvió en unos cuantos días.

- ◆ **Modelo por inoculación intraestromal.**- Aunque la inoculación intraestromal provoca un daño en la córnea, este no es suficiente tampoco para dar inicio a la infección, sólo en aquellos casos en los que por error, se produjo un daño mayor al momento de la inoculación fue que se presentó la patología.

- ◆ **Los trofozoitos aparentemente no se adhirieron a la córnea de los conejos y pudieran haber sido fácilmente removidos, es posible que el pH del vehículo de inoculación afectara a los trofozoitos desde un inicio. Si se toma en cuenta a la adherencia como el primer paso para la invasión de estos organismos, se explica la ausencia de síntomas en algunos casos y lo limitado de las lesiones, en otros parece indicar que la adherencia pudiera no haberse dado. Otra posibilidad es que las amebas pudieran haberse adherido sin causar lesiones y la invasión del estroma se detuvo en otra fase del proceso. Dado que las amebas pueden evadir la respuesta inmune local del humano y provocar una lesión crónica severa que**

podiera ser agravada por la respuesta inmune del paciente. En ambos modelos pudieron actuar mecanismos propios de resistencia en el conejo ausentes en el humano.

- ◆ Las amebas pueden ser capaces de evadir la respuesta inmune local en la córnea del humano y provocar una lesión crónica y severa, facilitada posiblemente por la presencia de antígenos de superficie semejantes al hospedero y por se la córnea un sitio inmunologicamente privilegiado. Lo que explicaría en cierta forma la afinidad por el tejido corneal humano y el del cerdo.

- ◆ Otro aspecto que merece consideración es el hecho de que se inocularon cepas axénicas que habían sido subcultivadas *in vitro* bastante tiempo, por lo que la virulencia de la cepa HCl-3 al momento de inocularla en el conejo no fuera la óptima y no hubiese producción de enzimas colagenolíticas y proteasas en general capaces de continuar con la invasión corneal.

- ◆ Se debe tomar en cuenta la posibilidad de la existencia de especificidad de las cepas amebianas a distintos tipos de organismos. Niederkon (1992) probó que una cepa de *Acanthamoeba castellanii* se adhiere de manera distinta a la superficie corneal de ratón, rata, y conejo, aprox. 5 - 20 trofozoitos en 7.07 mm² de superficie corneal, que con respecto a la córnea de hámster, cerdo y el ser humano (aprox. 100 - 200 trofozoitos en 7.07 mm² de superficie corneal).

- ◆ Stopack *et al.*, (1991) realizaron un estudio en el que evaluó la afinidad de *Acanthamoeba* spp. a cultivos de células epiteliales y queratocitos, sugiriendo una dependencia a los componentes celulares de la córnea como sustrato para su desarrollo.

- ◆ Existen datos contradictorios con respecto al modelo experimental Cote *et al.*, consideran al conejo como un buen animal de estudio de la QA. En su trabajo inocularon 1.5×10^5 (90% trofozoitos y 10% quistes) de *Acanthamoeba castellanii*, reportaron opacidad corneal a las 24 horas de haber llevado a cabo la inoculación la cual se hizo mas evidente a las 72 horas.

- ◆ Jiménez *et al.* (1996) consideran que la evolución clínica de conejos inoculados con cepas de *Acanthamoeba polyphaga*, que se presenta en los primeros tres días posteriores a la inoculación, son suficientes para considerar exitoso el montaje del modelo, sin embargo no se presenta un daño corneal que pueda ser comparativo con el que se produce en la córnea de los pacientes con esta patología, lo que impide conocer los mecanismos de patogenicidad de las amebas

anfizoicas en su invasión en la córnea humana. Establecieron además un modelo experimental en conejo con inoculación intraestromal con cepas monoxénicas con resultados levemente positivos en los 4 días posteriores a la inoculación. Es probable que las diferencias del modelo descrito y el elaborado en el presente trabajo radica en el hecho de que en el primero, la presencia de las bacterias y sus productos pueden influir de manera importante en el cuadro clínico que se presenta en los conejos, lo que sugiere que las amebas y bacterias actúan de manera sinérgica para producir el daño en la córnea.

♦ Un aspecto poco estudiado son las bacterias endosimbiontes como posibles participantes en la invasión corneal de las amebas.

La falta de un modelo experimental adecuado no ha facilitado entre otras cosas: una identificación y descripción del modo de acción de estos organismos en la córnea, que permita establecer si el modo de invasión es el mismo para todas las cepas involucradas en esta patología.

Es importante continuar con la búsqueda de un modelo idóneo para la QA, en donde se hagan ensayos de inoculación con poblaciones de quistes y trofozoítos en diferentes proporciones y determinar en primera instancia si la QA se inicia después de que enquistan los organismos en la córnea o bien si esta inducción se da por la presencia del trofozoíto, y considerar a este evento como el inicial para la invasión amebiana.

El establecimiento de un modelo experimental en cerdos puede dar más información referente a los pasos que dan inicio a la infección y los mecanismos de patogenicidad que se presentan.

A pesar de las limitaciones del modelo, fue posible evaluar el efecto de 2 fármacos de interés clínico en el tratamiento de la QA. el Itraconazol resultó ser más efectivo en su acción contra las amebas en estudio, en la evaluación *in vivo* e *in vitro*, lo que permite continuar con el estudio de otras cepas del género.

La técnica de PCR permitió el seguimiento de las amebas o fragmentos de amebas en la córnea del conejo.

4.7. ISOELECTROENFOQUE

El análisis de las diferencias encontradas en los corrimientos isoenzimáticos de los tres primeros aislamientos de QA en México hizo pensar en un inicio que se

estaba frente a una especie del género *Acanthamoeba* (HCI-1) nunca antes descrita, sin embargo se encontró en diferentes reportes que el comportamiento de las cepas aisladas de casos de QA no siguen entre otras cosas: el mismo patrón de crecimiento óptimo a mayor temperatura como lo hacen las cepas responsables de EAG. Las cepas procedentes de casos de QA crecen mejor a 37° C, mientras que las aisladas de cavidades nasales lo hacen a 40° C. Lo que impide correlacionar la patogenicidad en ambos tipos de aislamientos. Por otra parte paralelo al aislamiento de la cepa en cuestión se comenzó a observar la dificultad para ubicar taxonómicamente a través, de corrimientos isoenzimáticos a 31 cepas patógenas aisladas de piscinas. De Jonckheere (1991) basado en la comparación de isoenzimas de cepas de *Acanthamoeba* aisladas de pacientes con Queratitis en Europa, concluyó que los aislamientos corneales son diferentes de los descritos hasta ese momento, aunque se observan diferencias en algunas enzimas y concordancia en proteínas totales, lo que sugiere se trata de un grupo específico involucrado en la QA.

Penin (1991) encontró una cepa procedente de un caso de QA, que al ser analizada morfológicamente y de modo específico el quiste, presentaba un endoquiste con 6 brazos rodeados de un exoquiste no reticular, por lo que fue ubicada dentro del grupo II acorde a la clasificación de Pussard y Pons, sin embargo el análisis isoenzimático no permitió identificar a la cepa en cuestión, el corrimiento no coincidió con ningún patrón previamente identificado, por lo que el autor afirma que con ello queda demostrada la heterogeneidad de las cepas del género y de modo especial *A. polyphaga* y *A. castellanii*.

Jacobson y Band (1987) reportaron aislamientos de *A. polyphaga* procedentes de suelo que mostraron heterogeneidad genética, lo que hace pensar que puede aplicarse la misma idea para aquellos casos procedentes de infecciones corneales.

De Jonckheere (1991) considera que un número limitado de especies es el que esta directamente relacionada con los casos de QA, los cuales presentan una heterogeneidad genética lo que explicaría las divergencias en los patrones isoenzimáticos cuando se comparan con cepas tipo o de catálogo.

Las diferencia encontradas en los corrimientos isoenzimáticos concuerdan con lo expuesto con anterioridad. Existen similitudes en algunos corrimientos que nos hace pensar que estamos frente a cepas de la misma especie, sin embargo en

otros se presentan diferencias tan marcadas que confunden el diagnóstico. Esas diferencias no solamente se presentan entre las cepas de estudio, sino que se observan entre las cepas utilizadas como de referencia, lo que impide aún más la identificación adecuada.

Un gran número de aislamientos clínicos de córnea se diagnostican solamente por las características morfológicas de las amebas, y la mayoría de éstos se ubica en la especie *A. polyphaga*, pese a que este grupo de organismos que conforma a la especie está integrado por representantes con una heterogeneidad que no permite un diagnóstico certero, y por ende que impide la implementación de un esquema de tratamiento adecuado, con la consecuente desorganización biológica y clínica que impide también saber hasta el momento si se esta trabajando con especies diferenciables a través de técnicas más específicas, que comparten morfología y difieren en la fisiología, las cuales incluso puedan tener mecanismos de patogenicidad semejantes o diferentes. O simplemente se trata de una especie cosmopolita, desarrollándose exitosamente en los diferentes ambientes en donde es capaz de crecer, con la consecuente adaptación fisiológica que ha permitido la controversia.

A pesar de las limitaciones que trae consigo la utilización de técnicas isoenzimáticas en la identificación amebiana, ésta fue la única herramienta confiable por muchos años para organizarlas y ubicarlas taxonómicamente.

En la actualidad podrían ensayarse otras como los anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie, las sondas génicas dirigidas contra el RNA ribosomal y los mapas de oligonucleótidos, así como las secuencias conservadas y no conservadas de las amebas.

4.8. SEROLOGÍA

Las cepas en estudio comparten entre sí determinantes antigénicos, sin embargo presentan también algunos que solamente se observan en cada cepa, lo que indica hay diferencias significativas entre ellas. Tal vez sea ésta una explicación de las confusiones que se presentan al momento de realizar diagnósticos serológicos e implementar los tratamientos.

Visvesvara (1993) Enfatiza la dificultad que implica la identificación específica de las amebas que integran el grupo II, ya que se utilizan básicamente

critérios morfológicos, de modo que, sugiere la identificación de los organismos a través del uso de 15 sueros dirigidos contra estas especies, sin embargo no específica si, éstos han sido producidos una vez caracterizados o identificados los determinantes antigénicos de cada especie, así como la adsorción de los mismos en caso de presentarse una reacción cruzada, de no ser así la utilización de dichos sueros no es de gran utilidad para la identificación específica lo que trae consigo errores al momento de realizar los diagnósticos.

Sería conveniente llevar a cabo un estudio que determine e identifique los diferentes antígenos de superficie de las especies que conforman el género, además de conocer si la expresión de los determinantes antigénicos de superficie varía de acuerdo a la virulencia de las amebas, con el tiempo o con el crecimiento en presencia de anticuerpos específicos, complemento y macrófagos.

Osato y Robinson (1991) mencionan que las pruebas inmunológicas con estas amebas son poco específicas y se presentan reacciones cruzadas.

Es importante tomar en consideración la respuesta inmunológica que despertaron las amebas en los conejos inoculados intraestromalmente, a pesar de no haberse presentado una lesión corneal de consideración, falta saber si esa respuesta confiere protección a los conejos. Sería conveniente evaluar también, si se despierta una respuesta mucosal en estos animales de experimentación.

Es necesario continuar con la búsqueda de organismos bacterianos o bien otros protozoos patógenos, para evaluar si existe o no un cruce antigénico, entre éstos y las amebas, que puedan ser los responsables de títulos elevados de anticuerpos, o bien comprobar con más representantes del género si son altamente antigenicos en general, lo que explicaría los títulos altos de anticuerpos que se presentan en personas sanas sin contacto previo aparente con estas amebas anfitoicas.

5. CONCLUSIÓN

El género *Acanthamoeba* en general y la especie *A. polyphaga* en particular es un grupo heterogéneo de protozoos con una organización más compleja que la planteada en la actualidad. La heterogeneidad genética les ha dado la posibilidad de adaptarse con éxito a diferentes medios, ha facilitado su capacidad de invadir y desarrollarse en diferentes ambientes como organismos de vida libre y patógenos, lo que les ha permitido incluso tener afinidad hacia ciertos sitios como la córnea humana con la ventaja para estos organismos de contar con un sitio más de sobrevivencia, demostrado por la cantidad de aislamientos en esos sitios y el SNC.

Es posible que se trate de un grupo de organismos en transición biológica entre la vida libre y el parasitismo obligado. Es necesario utilizar aquellas técnicas de biología molecular para comenzar a descubrir los aspectos importantes que permitan determinar las relaciones filogenéticas de estas amebas, además de conocer las diferencias intraespecíficas a nivel molecular, que permitan una organización taxonómica acorde a estos protozoos.

No menos importante es el análisis de estos organismos desde el punto de vista clínico, en donde es importante antes que nada difundir la existencia de estas amebas como patógenos. De nada sirve implementar técnicas sofisticadas para su detección, si no se toma en cuenta en los diagnósticos diferenciales iniciales o por asombroso que parezca se niega su existencia. Esta difusión debe llevarse a cabo por etapas en las que se incluya el adiestramiento del personal calificado para la observación de estos protozoos, primero con los medios con los que se cuenta en un laboratorio de análisis clínicos. Una vez que se logre el conocimiento de aspectos generales de la biología de las amebas anfitoicas, es necesario establecer su detección de manera rutinaria con medios simples y específicos para su aislamiento. Hacer un análisis de los signos y síntomas de los padecimientos tempranamente para poder organizar un cuadro clínico certero que permita su detección. Ese diagnóstico oportuno debe conducir necesariamente a la implementación de un esquema terapéutico adecuado que limite el daño en la córnea, porque al fin y al cabo los estudios biológicos de las amebas anfitoicas son indispensables no solamente para organizarlas de una manera más completa, que considere la mayor cantidad de aspectos biológicos que las distingua, sino que

ese conocimiento se aplique para dar servicio a la clínica con el beneficio de las personas que padecen las distintas patologías en las que participan como agentes etiológicos.

Sin embargo hasta este punto la mejor estrategia para limitar las infecciones amebianas, es la prevención, la cual debe implementarse al momento de difundir la existencia de estos organismos en los medios especializados.

ANEXOS

ANEXO No. 1
medios de cultivo

MEDIO CASOY

Peptona caseína	17.0 gr
Peptona harina de soya	3.0 gr
D-glucosa	2.5 gr
NaCl	5.0 gr
K ₂ HPO ₄	2.5 gr
Agua destilada	1 lt

MEDIO PBSGM (CHANG MODIFICADO)

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

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.

Cuando los tubos van a ser utilizados se les adicionan 0.3 ml de suero fetal de bovino, El cual se prepara de la siguiente forma:

El suero fetal de bovino siempre se mantiene en congelación, se descongela minutos antes de ser utilizado en baño de agua a 56° C durante 30 minutos para ser descomplementado.

Se prepara un mezcla de antibióticos a base de penicilina G sal sódica (laboratorios Lakeside) y kanamicina (Bristol).

- ⇒ Penicilina G 1 000 000 U en 2 ml de H₂O destilada
- ⇒ Kanamicina 1 g en solución 3 ml
- ⇒ Volumen total de 5 ml

Se agrega 1.0 ml de 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.

BACTOCASITONA AL 2 %

Bactocasitona Difco	2.0 g
Agua destilada	100 ml

Se disuelve la Bactocasitona en agua destilada, se vacian en 2.7 ml del medio en tubos de tapón de rosca y se esteriliza a 15 lb de presión durante 15 min.

Antes de utilizarse se agregaron 0.3 ml de suero fetal de bovino (en condiciones de esterilidad) a cada tubo con bactocasitona.

ANEXO No. 2
Reactivos y soluciones para isoelectroenfoque.

Revelado de enzimas:

Fosfatasa ácida (AP)

Reactivo	Concentración
Na- <i>B</i> -naftil-ácido fosfato.....	100 mg
Sal Negra K.....	100 mg
Acetato amortiguador 0.05 M pH 5.....	100 mg

Leucinaminopeptidasa (LAP)

Reactivo	Concentración
<i>B</i> - leucín <i>B</i> naftilamida.....	40 mg
Sal negra K.....	50 mg
Tris malato 0.2 M amortiguador pH 6.0.....	100 ml

Propionil -esterasa (PE)

Azul rápido RR sal.....	100 mg
fosfato 0.1 M amortiguador pH 5.7.....	100 ml
1% alfa naftilpropionato (en acetona al 50%).....	2 ml

Fosfoglucomutasa (FGM)

Na ₂ alfa-D-glucosa-1-fosfato- 4 H ₂ O.....	60 mg
NADP.....	10 mg
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.....	80 unidades
NBT.....	20 mg
PMS	1 mg

Mg Cl ₂	80 mg
Tris-HCl 0.5 M pH 7.7.....	10 ml
Agua destilada	70 ml
Glucosa -fosfato isomerasa (GFI)	
D-fructosa-6-fosfato.....	160 mg
NADP.....	10 mg
Glucosa -6-fosfato deshidrogenasa.....	80 unidades
NBT.....	10 mg
PMS	1 mg
MgCl ₂	1 mg
Tris-HCl 0.1 M pH 8.1.....	15 ml

AMORTIGUADORES

Acetato 0.05 M amortiguador pH 5.0

Solución 1

CH ₃ COONa.....	1.64 gr
Agua destilada	200 ml

Solución 2

CH ₃ COOH.....	0.6 gr
Agua destilada	100 ml

Se mezclan 176 ml de la solución 1 y 74 ml de la solución 2 en 250 ml de agua destilada.

Tris malato 0.2 M amortiguador pH 6.0.

Solución 1

Tris.....	7.26
Ácido málico.....	6.96 gr

Agua destilada.....150 ml

Solución 2

NaOH.....1.6 gr

Agua destilada.....100 ml

Se mezclan 125 ml de la solución 1 y 160 ml de la solución 2 en 310 ml de agua destilada .

Fosfato 0,1M amortiguador pH 5.7

Solución 1

NaH₂PO₄.....6.875 gr

Agua destilada250 ml

Solución 2

NaHPO₄.....3.415 gr

Agua destilada.....50 ml

Se mezclan 230 ml de la solución 1 y 20 l de la solución 2 en 250 ml en agua destilada.

Tris-HCl 0.5 M amortiguador pH 7.1.

Solución 1

Tris.....18.15 gr

Agua destilada.....150 ml

Solución 2

HCl.....2.1 ml

Agua destilada250 ml

Se mezclan 125 ml de la solución 1 y 250 ml de la solución 2 en 125 ml de agua destilada.

ANEXO No. 3
Soluciones y Reactivos para la técnica de Western blot.

Filtrar todas las soluciones a través de un filtro de 0.45 um. Usar siempre agua bidestilada.

Solución stock de monómeros
 (30% t, 2.7 % c bis)

Acrilamida		60.0 g
Bis- acrilamida		1.6 g
Agua	Aforar	200 ml
Almacenar en frasco ámbar a 4°C .		

Amortiguador del gel separador 4x
 (1.5 m tris-Cl, pH 8.8)

Trizma- base		36.3 g.
Ajustar a pH 8.8 con HCl		
Agua	Aforar	200 ml

Amortiguador del gel concentrador 4x
 (0.5 m tris-Cl, pH 6.8)

Trizma- base		3.0 g
Ajustar a pH 6.8 con HCl		
Agua	Aforar	50 ml

Lauril sulfato

SDS (10%)		5.0 g
Agua	Aforar	50 ml

Iniciador

Persulfato de amonio		1.0 g
Agua	Aforar	1.0 ml

Preparación del gel

(Basado en el sistema de laemmlí modificado para las unidades de electroforesis mighty small).

gel separador	gel concentrador	
Sol. De acrilamida	3.33 ml	0.67 ml
Amort. Del gel separador 4x	2.50 ml	
Amort. Del gel concentrador 4x		1.25 ml
Lauril sulfato (10%)	0.10 ml	0.05 ml

Agua	4.00 ml	3.00 ml
Iniciador	50 ul	25 ul
Temed *	5.0 ul	2.0 ul*

Tetrametilendiamina.

Adicionar sobre el gel separador 100ul de butanol saturado con agua para evitar la inhibición de la polimerización por el oxígeno.

Amortiguador de tratamiento

Amort. 2x de sds (tris-cl 0.125 m, pH 6.8, sds 4% , glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%)

Tris-HCl 4x, pH 6.8	2.5 ml
SDS 10%	4.0 ml
Glicerol	2.0 ml
2- mercaptoetanol	0.2 ml
Azul de bromofenol	0.2 mg
Agua	Aforar 10.0 ml

Dividir en alícuotas de 1.0 ml y almacenar entre -40°C y -80°C.

Amortiguador de electroforesis

(Tris 0.025 m, pH 8.3, glicina 0.192 m, sds 0.1%)

Tris- base	12.1 g
Glicina	57.6 g
SDS	4.0 g
Agua	Aforar 4.0 lt

Marcador sigma (p.m. Alto rango)

se utiliza en alícuotas de 3 µl adicionando 7µl de amortiguador de tratamiento.

Amortiguador de transferencia

(tris 0.025 m, pH 8.3, glicina 0.192 m, sds 0.1%)

Tris-base	6.06 g
Glicina	28.8 g
SDS	2.0 g
Agua	1.3 l
Metanol	400 ml
Agua	Aforar 2.0 l

No ajustar el pH, deberá ser entre 8.2- 8.4.

Si se requiere teñir el gel se utilizan las siguientes soluciones:

Colorante

(azul de coomassie r-250 0.025%, metanol 40%, ácido acético 7%)

Azul de coomassie r-250		0.5 g
Metanol		800 ml
Ácido acético		140 ml
Agua	Aforar	2.0 lt

Solución desafiadora i

(metanol 40%, ácido acético 7%)

Metanol		400 ml
Ácido acético		70 ml
Agua	Aforar	1.0 lt

Solución desafiadora ii

(metanol 5%, ácido acético 7%)

Metanol		500 ml
Ácido acético		70 ml
Agua	Aforar	10.0 lt

Sustrato y cromógeno

Etanol		3.5 ml
4-cloro 1-naftol		10 mg
PBS		16.5 ml
Peróxido de hidrogeno		20.0 μ l

Se mezclan ambas soluciones antes de su uso.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, S.N y Lawande, R.V. (1982). Incidence of free. living Amoeba in the nasal passages of local population in Zaria, Nigeria. *J. Trop. Med. Hyg.* 85: 217-222.
2. Aitken, D., Kinnear, F., Kerness, C., Lu W y Seal, D. (1996). Amoebic Keratitis in a wearer of disposable contact lenses due to a mixed *Vahlkampfia* and *Hartmannella* infection. *Ophthal*, 103 (3):485-94.
3. Alizadeh H., Pidherney MS., McCulley JP y Niederkorn JY. (1994). Apoptosis as a mechanism of cytolysis of tumour cells by a pathogenic free living Amoeba. *Infect Immunology*. 62(4): 1298-303.
4. Alizadeh H., He Y., Mc Culley JP., Ma. D. Stewart GL., via M., Haehling E y Niederkorn JY. (1995). Successful immunisation against *Acanthamoeba* keratitis in a pig model. *Cornea*. 14(2): 180-6.
5. Alizadeh H., Taylor W., McCulley J.P., Stewart G.L., Haehling E., van Klink F., Niederkorn J.Y. (1995). Successful immunisation against *Acanthamoeba* keratitis in a Chinese hamster model. *Investigative Ophthalmology and visual Science*. 35(4): 1919-6
6. Allen, S. D., Newsome, A. L y Powell, D. A. (1992). Isolation and characterisation of free-living amoebae from sputum specimens. Vith International Conference on the Biology.
7. Anzil, A. P., Rao, C., Wrzolek, M. A., Visvesvara, G. S., Sher, J. H. y Kozlowski, P. B. (1991). Amoebic mingoencephalitis in a patient with AIDS caused by a newly recognised opportunistic pathogen. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 115 : 21-25.
8. Álvarez, R.F., Méndez de la Rosa, R.M., Rivera, A.F., Ramírez, F.E y Bonilla, L.P. (1995). Síndrome hemofagocítico relacionado con septicemia por ambas de vida libre de la familia Leptomyxidae. *Revista de Salud del Distrito Federal*. 3(5,6).
9. Armstrong, M., The Laboratory investigation of infective keratitis. (1994). *British Journal of Biomedical Science*. 51(1): 65-72.

10. Astorga, B., Kustersch, C y Weitz, J.C. (1993). The first isolation in Chile of a free life Amoeba in a user of Contact lenses with severe keratitis. *Rev. Med. Chil.* 121(11): 1340-1.
11. Auran, J. D., Starr, M. B y Jakobiec, F. A. (1978). Amoebic Keratitis: a review of the literature. *Cornea.* 6 : 2- 26.
12. Ayers, K. M., Billups, L. H. y Garner, F. M. (1972). Acanthamoebiasis in a dog. *Vet. Pathol.* 9 : 221-226.
13. 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.
14. Badenoch, P. R. (1991). The pathogenesis of *Acanthamoeba* Keratitis. Australian and New Zeland *J. Ophthalmol.* 19 : 9 - 20.
15. Badenoch, P.R., Adams, M y Coster, D.J. (1995). Corneal Virulence, Cytopathic Effect on Human Keratocytes and Genetic Characterisation of *Acanthamoeba*. *International Journal for Parasitology.* Vol. 25(2): 229-239.
16. Balamuth, W. (1964). Nutritional studies on axenic cultures of *Naegleria gruberi*. *J. Protozool.* 11 (suppl.) : 19 - 20.
17. 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.
18. Beattie, A. M., Slompvic, A. R., Rootman, D. S y Hunter, W. S. (1990). *Acanthamoeba* Keratitis with two species of *Acanthamoeba*. *Canad. J. Ophthalmol.* 25: 260 - 262.
19. 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.
20. Bier, J. W. y Sawyer, T. K. (1990). Amoebae isolated from laboratory eyewash stations. *Curr. Microbiol.* 20 : 349 - 350.

21. Booth A y Morrell AJ. (1994). Treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Eye* 8 (Pt 6): 719-20.
22. Bottone EJ., Pérez AA., Gordon RE y Qureshi MN. (1994). Differential binding capacity and internalisation of bacterial substrates as factor in growth rate of *Acanthamoeba* spp. *Journal Medical Microbiology*. 40(2) p148-54.
23. Bottone, E.J., Madayag, R.M y Qureshi, M.N. (1992). *Acanthamoeba* keratitis; synergy between amoebic and bacterial contaminants in contact lens care systems as a prelude to infection. *J. Clin. Microbiol.* 30(9): 2447-2450.
24. 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.
25. Bose, K., Ghosh, D. K., y Battacharya, A. (1989). Membrane carbohydrate characterisation of *Acanthamoeba astronyx*, *A. castellanii* and *Naegleria fowleri* by fluorescein-conjugated lectins. *Int. J. Parasitol.* 19 : 737-741.
26. Bowers, B y Korn, D.E. (1968). The Fine Structure of *Acanthamoeba castellanii*. *J of Cell Biol.* 39: 95-111.
27. Brandt, F. H., Ware, D. A. y Visvesvara, G. S. (1989). Viability of *Acanthamoeba* cysts in ophthalmic solutions. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 1144-1146.
28. Brasseur G., Favennec L., Perrine D., Chenu Jp y Brasseur P. (1994). Successful treatment of *Acanthamoeba* keratitis by heximidine. *Cornea.* 13(5): 459-62.
29. Butt, C. (1966). Primary Amoebic meningoencephalitis. *N. Engl. J. med.* 274 : 1473.
30. Byers, T. J. (1979). Growth, reproduction, and differentiation in *Acanthamoeba*. *Int. Rev. Cytol.* 61: 283-338.
31. Byers, T.J y Gast, R.J. (1994). DNA Probe Design for *Acanthamoeba* and other Pathogenic Free-living Amoebas. *Invest. Opht. Vis. Sci.* Vol. 35(4).

32. Byers, T.J. Kim, B. J., King, L. E., y Hugo, E. R., (1995). Molecular aspects of the cell cycle and encystment of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*. 13: s373-s384.
33. Campbell, S. (1993). Amebic brain abscess and meningoencephalitis. *Semi. Neurol.* 13(2): 153-60.
34. Cerva; L., Serbus, C y Skocil, V. (1973). Isolation of limax amoebae from the nasal mucosa of man. *Folia Parasitologica*. 20: 97-103.
35. Chang, S. L. (1971). Small, free-living amoebas: Cultivation, quantitation, identification, classification, pathogenesis, and resistance. *Cur. Trop. Comp. Pathobiol.* 1 : 201-254.
36. Chang, S. L. (1972). Pathogenic Free- Living Amoeba and recreational Water. *Proxc. Water pollute Res. (Israel)*, 13 : 1-12.
37. Chang, S. L., 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.
38. 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 management of *Acanthamoeba* Keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 100 : 389-395.
39. 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.
40. Cohen, E. J., Higgins, S. E., Arentsen, J.J., Eagle, R. C., and Liabson. P.R. (1991). Clinical course of *Acanthamoeba* Keratitis. *Reviews of Infect diseases*. 13: s426
41. Cordovilla P., Valdivia E., González A., Gálvez A., Martínez Bueno M y Maqueda M. (1993). Antagonistic action of the bacterium *Bacillus licheniforme* M-4 toward the amoeba *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot Microbiolog.* 40(3): 323-8.
42. Coté, M. A., Irvine, J. a., Rao, N. A., y Trousdale, M. D. (1991). Evaluation of the rabbit as a model of the *Acanthamoeba* keratitis. *Reviews of Infectious diseases*. 13: s443-s444.

43. Costas, M y Griffiths, J.A. (1985). Enzyme Composition and the Taxonomic of *Acanthamoeba*. J. Protozool. 32(4): 604-607.
44. Culbertson, C. G., Smith, J. y Minner, J. (1959). *Acanthamoeba* observations on Animal Pathogenicity. Science. 127 : 1506.
45. Curtis, F. T., Newsome, A., Culbertson, C y Stephen, D.A. (1992). Identification of *Acanthamoeba* in Broncoalveolar lavage specimens. Vth International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-living Amoebae. Virginia. USA.
46. D'Aversa, G., Stern, G.A y Driebe, W.T. (1995). Diagnosis and successful medical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Arch Ophthalmol. 113 (9): 1120-3.
47. 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.
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.
49. De Jonckheere, J. F. (1984). Postgraduate course on biochemical techniques for diagnosis of primary amoebic meningoencephalitis. UNAM. México : 70 pp.
50. De Jonckheere, S. D y 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.
51. De Jonckheere. (1991). Ecology of *Acanthamoeba*. Reviews of Infections Diseases. 13(suppl5): S385-7.
52. Díaz, J., Ozuna, A., Rosales, M. J., Cifuentes, J y Mascaro, C. (1991). Sucker-Like structures in two stains of *Acanthamoeba*: scanning electron microscopy study. Inst. J. Parasitol. 21 : 365 -367.
53. Donzin, P. B., Mondino, B. J., Wisman, B.A y Bruckner, D.A. (1989). Microbial analysis of contact lens care systems contaminated with *Acanthamoeba*. Am. J. Ophthalmol. 108 : 53 -56.

54. 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.
55. Elder, M.J., Kilvington, S y Dart, J.K. (1994). A Clinicopathologic study of in vitro sensitivity testing and *Acanthamoeba* keratitis. Invest. Ophthalmol Vis. Sci. 35(3): 1059-64.
56. 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.
57. Epstein, R. J., (1994). *Acanthamoeba* keratitis and corneal neovascularization. Journal. 2083: 152.
58. 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.
59. Ferrante, A., Abell, T.J y Lederer, E. (1987). Effects of sinefungin and difluoromethylornithine on pathogenic free-living amoebae *in vitro*. FEMS Microbiology letters. 40: 67-70.
60. Ferrante, A. (1991). Free-living amoeba : Pathogenicity and immunity. Parasite. Immunol. 13 : 31 - 47 .
61. Font, R.L., Tapert, M.J., Robinson, N.M., Osato, M.S y Jones, D.B. (1981). An animal of *Acanthamoeba* keratitis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 20(suppl1): 8
62. Fritsche, T.R., Gautom, R.T., Seyedirashti, S., Bergeron. D.L y Lindquist, T.D. (1993). Occurrence of bacterial endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. isolated from corneal and environmental specimens and contact lenses. J. Clin. Microbiol. 31(5): 1122-6.
63. Gálvez, A., Valdivia, E., González, S.A., Lebbadi, M., Martínez, B.M y Maqueda, M. (1993). Purification, Characterisation, and lytic activity against *Naegleria fowleri* of two amoebicins produced by *Bacillus licheniformis* A12. Appl. Environ Microbiol. 59(5): 1480-6.

64. Garner, A. (1993). Pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis: hypothesis based on analysis of 30 cases. *British J. Ophthalmol.* 77: 366-370.
65. Giovannini A., Tittarelli R., Bertelli E., Frogia G. B., Mariotti C., Manso E. y Biasco F. (1994). Bilateral *Acanthamoeba* keratitis in a gas-permeable contact lens wearer. *Ophthalmologica.* 280(6): 321-4.
66. 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 organism. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110: 749-751.
67. Gordon, M.S., Steinberg, P. J., DuPuis, H.M., Kozarsky, E. P., Nickerson, F. J. y Visvesvara, S.G. (1992). Culture Isolation of *Acanthamoeba* Species and Leptomyxid Amebas from Patients with Amebic Meningoencephalitis, Including Two Patients with AIDS. *Clin. Inf. Dis.* 15: 1024-30.
68. Gorlin, A., Wilson, L. y Ahearn, D. (1996). Effect of adhered bacteria on the binding of *Acanthamoeba* to hydrogel lenses. *Arch. Ophthalmol.* 114 (5): 575-80.
69. Gullet, J., Mills, J., Hadley, K., Podemski, B., Pitts, L. y Gelber, R. (1979). Disseminated granulomatous *Acanthamoeba* infection presenting as an unusual skin lesion. *Am. J. Med.* 67: 891-896.
70. Gunter, O. (1992). Free-living amoebae a hygienic problem for haemodialysis. Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. Virginia. USA.
71. Gray, T. B., Gross K. A., Cursons R. T. y Shewan J. F. (1994). *Acanthamoeba* keratitis: a sobering case and a promising new treatment. *J. of Oftamol.* 22(1): 73-6.
72. Gray, T. B., Cursons, R. T., Sherwan, J. F. y Rose, P. R.(1995). *Acanthamoeba*, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. *Br. J: Ophthalmol.* 79 (6):601-5
73. Griesemer D. A., Barton L. L., Reese C. M., Johnson P. C., Gabrielsen J. A., Talwar D. y Visvesvara, G. S. (1994). Amebic meningoencephalitis caused by *Balamuthia mandrillaris*. *Pedriatr-Neurol.* 10(3): 249-54.

74. Griffin, J. L. (1972). Temperature tolerance of pathogenic and non-pathogenic free-living amoebae. *Science* 178 : 69.
75. Hanssens M., De Jonckheere, J. F. y Meunynck, Ch. (1985). *Acanthamoeba* Keratitis. A clinicopathological case report. *Int. Ophthalmol.* 7 : 203 - 213.
76. Hadas E y Masur T. (1993). Bioquimical markers of pathogenicity and virulence of *Acanthamoeba* sp. *J. Announcement:* 9405.
77. Hu, W. N., Ahn, J., Kopachik, W. y Band N. (1992). Virulence Related Gene Expression in *Naegleria fowleri*. . Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-Living Amoebae. Virginia. USA.
78. Hunt, S., Reed, S., Matthew's, W. y Torian, B. (1995). Cutaneous *Acanthamoeba* infection in the acquired immunodeficiency syndrome: response to multi drug therapy. *Cutis*, 56 (5): 285-7.
79. 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.
80. Illingworth, C., Cook, S., Karabatsos, C. y Easty, D. (1995). *Acanthamoeba* Keratitis: Risk factors and outosome. *Br. J. Ophthalmol.* 79(12): 1078-82.
81. Jacobson, L. M. y Band, R. M. (1987). Genetic heterogeneity in natural population of *Acanthamoeba* from soil an isoenzyme analysis. *Br. J. Phthalmol.* 79 (12): 1078-82
82. Jager, B.V y Stamm, W.P. (1972). Brain abscesses caused by free-living amoeba probably of the genus *Hartmannella* in a patient with Hodgkin's disease. *Lancet* ii: 1343-1345.
83. James, R. E., Mitro, K., Zhou, M. O., Bobbett, H.G. y Bhagavathiammai. (1992). Partial Characterisation of Proteases Secreted by *Acanthamoeba*. Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-Living Amoebae. Virginia. USA.
84. Jantzin, H. y Schulze, I. (1989). The cell cycle and the genome organisation in *Acanthamoeba castellanii*. *Memorias del V International*

conference on Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. Bélgica

85. Jiménez, C.E y Vega, P.M. (1995). La Reacción en cadena de la polimerasa para *Acanthamoeba*. Bioquímica 2. Vol. XX(79): 294-297.
86. Jiménez, E., Wong, Ch. H., Jiménez, C.J.M. y Rentería, G. H. (1996). Reproducción de la Queratitis por *Acanthamoeba* en Conejos de Nueva Zelanda. Rev. Mex. Oftamol. 70(3): 108-111.
87. John, D. T., Mobley, N. C. y Bartsch, K. E. (1983). Isolation of pathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* from an Oklahoma lake J. Protozool. 30 : 22A.
88. John, T., Desai, D. y Sahn, D. (1989). Adherence of *Acanthamoeba castellanii* and Trophozoites to unworn soft contact lenses. Am. J. Ophthalmol. 108 : 658 - 664.
89. Johns, M. D y 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.
90. Johns, K. J., Parrish C. M., seal, M. R., Jerkins, G. W., Berrie, W. R. y Litchford, D. W. (1989). *Acanthamoeba* Keratitis in Tennessee: a growing problem in patients wearing Contact lenses. J. Tennessee Med. Ass. 82 : 584 - 588.
91. John, T., Desai, D. y Sahn, D. (1991). Adherence of *Acanthamoeba castellanii* and trophozoites to Extended Wear soft contact lenses. Rev. of Infect. Dis. 13(suppl5): S419-20.
92. John, T., Lin, J., Sahn, D. y John, H. (1991). Effect of Corticosteroids in Experimental *Acanthamoeba* Keratitis. Rev. of Infect. Dis. 13 (suppl5): S440-2.
93. Johns, J. K., Head, S. W., Robinson, D. R., William, E. T. y O'Day, M.D. (1991). Examination of the Contact lens with light Microscopy: An Aid in Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis. Rev. of Infect. Dis. 13 (suppl5): S426
94. John D. T. (1993). Opportunistically Pathogenic Free-Living Amoebae. Parasitic Protozoa. Academic Press, Inc., San Diego. Segunda Ed.

95. Junes Ph., Assouline M., David T., Legeais J.M., Renard G. y Pouliquen Y. (1994). Prospective evaluation of oral Itraconazole for the treatment of *Acanthamoeba* and fungal ocular infection. Invest. Ophthalmol. and vis. Sci. 35(4): 2284.
96. Kadlec, V. (1978). The occurrence of amphizoic amoebae in domestic animal. J. Protozool. 25 : 235 - 237
97. Keleti, G. y 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.
98. Kelly, L.D. y Xu, L. (1995). Adherence of Viable Versus non Viable *Acanthamoeba* Cysts to unworn soft Contact Lenses. Invest. Ophth. Vis. Sci. 36 (4).
99. Kenney, M. (1971). The micro-kolmer complement fixation test in routine screening for soil amoeba infection. Hlth. Lab. Sci. 8: 5-10.
100. 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.
101. Kilvington, S., Larkin, D. F., White, D. C. y Beeching J.R. (1990). Laboratory investigations of *Acanthamoeba* Keratitis. J. Clin. Microbiol. 28(12): 2722 - 2725.
102. Kilvington, S., Beeching, J.R. y White, D.G. (1991). Differentiation of *Acanthamoeba* Strains from Infected Corneas and the Environment by Using Restriction Endonuclease Digestion of Whole-Cell DNA. J. of Clin. Microbiol. Feb: 310-314.
103. Kilvington, S. (1991). Moist-heat disinfection of *Acanthamoeba* cysts. Rev. of Infect. Dis. 13: s418
104. Kilvington, S. Anthony, A., Davies, D. J. G. y Meakin, B. J. (1991). Effect of contact Lents disinfecting against *Acanthamoeba* cysts. Rev. of Infect. Dis. 13: s414-415.
105. Kirkness, C. M., Seal, D.V., Hay, J. y Morrell. (1995). Successful Treatment of 7 Cases of *Acanthamoeba* Keratitis Using a Tropical Chlorhexidine-propramide Combination. Invest. Ophth. Vis. Sci. . 36(4).

106. Kitay, S. E., Kowalski, R. P., Kerenchak, L. M. y Wiley, L. (1995). Can *Acanthamoeba* Survive the U.S Postal Service. Invest. Ophth. Vis. Sci. Vol. 36(4).
107. Klink F., Taylor W., Alizadeh H., Jaguer M., van Rooije M. y Niederkon, J. (1996). The role of macrophages in *Acanthamoeba* Keratitis. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 37(7):1271-81.
108. Kong, H., Park, J. y Cung, D., (1995). Interstrain polymorphisms of isozyme profiles and mitochondrial DNA fingerprints among seven strains assigned to *Acanthamoeba polyphaga*. Korean J. parasitol. 33 (4): 331-40.
109. Kremer, Y., Cohen, E. J., Eagle, R. C. Jr., Udell, Y. y Laibson, P.R. (1994). Histopathologic evaluation of stromal inflammation in *Acanthamoeba* Keratitis. CLAO J. 20(1): 45-8.
110. Lares Villa F., De Jonckere J. F., De Moura H., Rechi Iruretagoyena A., Ferreira., Guerrero E., Fernández Quintanilla G., Ruiz Matus C. y Visvesvara GS. (1993). Five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, México: study of the isoletes. J. Clin. Microbiol. 31(3): 685-8.
111. Larkin, D. F. (1990). Experimental *Acanthamoeba* Keratitis I. Preliminary findings. British. J. Ophthalmol. 74 : 551 - 555.
112. Larkin, D. F. e Easty, D. F. (1991). Experimental *Acanthamoeba* Keratitis: II Immunohistochemical evaluation. J. J. Ophthalmol. 75 : 421 - 424.
113. Larkin, D. F. y Easty, D. F. (1991). The relationship of *Acanthamoeba* to the external eye flora. Rev. of Infect. Dis. 13: s 394 - 395.
114. Lasman, M. (1982). The Fine structure of *Acanthamoeba astronyxis*, with Special Emphasis on Encystment. J. Protozool. 29 (3): 458-464.
115. Ledee, D., Hay, J., Byers, T., Seal, D. y Kerlees, C. (1996). *Acanthamoeba griffini*. Molecular characterisation of new corneal pathogen. Invest. Ophthalmol. Vsi Sci. 37 (4): 544-50.
116. Ledee, D.R., Byers, T.J., Hay, J., Kirknees, C.M. y Seal, D.V. (1995). *Acanthamoeba griffini* Confirmed from Corneal Infection Contact Lens

- Storage Case and Home Water Supply Using sr DNA Analysis. Invest. Ophth. Vis. Sci. Vol. 36(4).**
117. Ledee, D.R. y Byers, T.J. (1994). Mitochondria sr DNA gene sequence based systematics of *Acanthamoeba*. Invest. Ophth. Vis. Sci. Vol. 35(4).
118. Lewis, E..J. y Sawyer, T.K. (1979). *Acanthamoeba tubiashi* n sp., a new species of fresh-water amoeba (Acanthamoebidae). Trans Am. Micros. Soc.98:543-549.
119. Limp, MA. (1990). Is the dry eye contact lens wearers at risk. Yes. Cornea. 9 : 48 - 50.
120. Liedel, K.K. y Begley, C.G. (1995). Efficacy of three Disinfection Systems Against *Acanthamoeba* on the Contact Lenses Surface. Invest. Ophth. Vis. Sci. 36 (4).
121. Linquist, T. D., Sher, N. A., y Doughan D. J. (1988). Clinical signs and medical therapy of early *Acanthamoeba* Keratitis. Arch. Ophthalmol. 106 : 73 - 77.
122. Ludwig, I. H., Meisler, D. M. Rutherford, I., Bican, 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.
123. Lund, O. E. Stefani, F. H. y Dechant, W. (1978). Amoebic Keratitis: A clinicopathological case report. Brit. J. Ophthalmol. 62 : 373 - 375.
124. Mannis, M. J. Tamaru, R., Roth, A. M., Burns, M., y Thirkill, C. (1986). *Acanthamoeba* esclerokeratitis. Arch. Ophthalmol. 104 : 1313 - 1317.
125. Martínez, A. J. y Amado, D.E., (1979) Meningoencefalitis producidas por amebas de vida libre. Protozool. Epidemiol. y Neuropatol. Morfología Normal y Patológica. 3 (B): 679-704.
126. Martínez, A. J. (1980). Is *Acanthamoeba* encephalitis an opportunistic infection. Neurology. 30 : 567 - 574

127. Martínez, A. J. (1985). Free- Living Amebic: Natural History, Prevention, Diagnosis, Pathology, and Treatment of disease. CRC. Press, Boca Raton, Florida.
128. Martínez, A. J. (1993). Free living amebas: Infection of the central nervous system. *Mt Sinai J. Medical.* 60(4): 271-8.
129. Martínez, A. J., Guerra A. E., García-Tamayo J., Cespedes G. y González Alfonso JE., Visvervara GS. (1994). Granulomatous amebic encephalitis and report of a spontaneous case from Venezuela. *Acta Neuropathol. Berl* 87(4): 430-4.
130. Mathers, W., Stevens, G., Rodríguez, 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.
131. Mathers, W., Stevens, J., Foberg, R., Meico, P., Wenzel, R., Elgen, R. (1996). Outbreak of Keratitis presumed to be caused by *Acanthamoeba* . *Am J. Ophthalmol.* 21 (2): 129-42.
132. Matyi, A. (1989). *Acanthamoeba* Keratitis in Hungary. *Memorias del V International conference on Biology and pathogenicity of free-living amoebae.* Bélgica.
133. Mazur T. y Hadas E. (1994). The effect of the passages of *Acanthamoeba* strains through mice tissues on their virulence and its biochemical markers. *Parasitol. Res.* 80 (5): 431-4.
134. McLaughlin, G. L., Stimac, J.E. y Luke, J. M. (1991). Development of *Acanthamoeba*-Cornea Coincuation Assays. *Rev. of Infect. Dis.* 13 (5): S 397-8.
135. Meisler, D. M. y Rutherford, I. (1991). *Acanthamoeba* and disinfection of soft contact lenses. *Rev. of infect. Dis.* 13 : 410 - 412.
136. Mitra, M., Alizadeh, H., Gerard, R. y Neiderkom J. (1995). Characterisation of plasminogen activator by *Acanthamoeba*. *Mol. Biochem. Parasitol.* /3 (1-2): 57-64.
137. Morton, L. D., Mc Laughhlin, G. L. Whiteley, H. E. (1991). Effects of temperature, amebic, and carbohydrates on *Acanthamoeba* adherence to corneal epithelium in vitro. *Infect. Immun.* 59 : 3819 - 3822.

138. Morton, L.D., Mc Laughlin, G.L. y Whiteley. (1991). Adherence Characteristics of Three Strains of *Acanthamoeba*. Rev. of infect. Dis. 13 (suppl5): S424.
139. Moore, M. B. y Mc Culley, J. P. (1989). *Acanthamoeba* Keratitis associated with contact lenses : Six consecutive cases of successful management. Br. J. Ophthalmol. 73 : 271 - 275.
140. Moore, M. B. (1989). Parasitic Infections. In The Cornea. Ed Kauffman, H. E., Mc Donald, M.B : SR. Wattman. Churchill, Livingstone. New York. 271 - 297.
141. Moore, M. B. y Mc Culley, J. P. (1985). *Acanthamoeba* Keratitis associated with soft contact lenses . Am. J. Ophthalmol. 100 : 396 - 403.
142. Moore, M. B., Mc Culley, J. P., Newton C., Cobo, L.M. y Foulks, G. N. (1987). *Acanthamoeba* Keratitis a growing problem in soft and hard contact lens wearers. Ophthalmol. 94: 1645-1650.
143. Moore, M. B., Ubelaker, J., Silvano, R., Martin, J. Mc Culley, J. P. (1991). Scanning electron microscopy of *Acanthamoeba castellanii*: adherence to superfaces of new and used contact lenses and human corneal button epithelium. Rev. of Infect. Dis. 13: s 423.
144. Murakawa, G.J., Mc Calmont, T., Telang, G.H., Hoffman, M.D., Kantor, G. R. y Berger, T.G. (1995). Disseminated acanthamebiasis in patients with AIDS. A report of five cases. Arch Dermatol. 131 (11):1291-6
145. Nagington, J., Watson, P. G., Playfair, T. J., Mc Gill, J., Jones, B. R. y Steel, A. D. McG. (1974). Amoebic infection of the eye. Lanceti : !537 - 1540
146. Nagington, J. (1975). Isolation of amoebae from eye infections in England. Trans. Ophthalmol. Soc. U. K. 95 : 207 - 209.
147. Nguyen, M., Brer, C., Boehnke, M. y Haas, A., (1992). *Acanthamoeba* keratitis: Clinical signs and Laboratory diagnosis. VIth International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-Living Amoebae. Virginia. USA.

148. Niederckon, J. K., Ubelaker, J. E., Mc Culley, J. P., Stewart, G. L., Meyer, D. R., Mellon, J.A., Silvany, R. E., He, Y., Picherney, 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.
149. Niederckorn J., Peeler JS., Ross J. y Calanan D. (1989). The immunogenic privilege of corneal allografts. Reg. immunolog. 2 (2): 117-24.
150. Niederckorn, J. Y., Klink, F., Mc Culley, J.P., Alizadeh, M., Picherney, M., Steward. y G.L., Silvany, R., (1992). Characterisation and pathogenic Potential of an Ocular Isolate and a Soil Isolated of *Acanthamoeba castellanii*. Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of free- Living Amoebae. Virginia. USA.
151. Nisson S. E. y Montan P. G. (1994). The hospitalised cases of contact lens induced Keratitis in Sweden and their relation to lens type and wear schedule: results of three-year retrospective study. CLAO J. 20(2): 97-101.
152. Ockert, G., (1992). Free-living amoebae, a hygienic problem for haemodialysis. . Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of free- Living Amoebae. Virginia. USA.
153. Ockert, G. (1993). Occurrence, parasitism and pathogenic potency of free-living amoeba. Appl Parasitol. 34(2): 77-88.
154. Osato, S. M. y Robinson, M. N. (1991). In vitro Evaluation of Antimicrobial Compounds for Cysticidal Activity Against *Acanthamoeba*. Reviews of Infectious Diseases. 13 (suppl5): S43 1-5.
155. Okada K., Ishibashi Y., Nyunt A.K., Tetsuka S., Miyanaga Y., Horikam H. y Ishii K. (1995). Drug sensinty of *Acanthamoeba*. Ivest. Ophptomol. and vis. Sci. 36 (4): 1530-478
156. Page, F. C., (1976). An Illustrated Key to freshwater and soil Amoebae with notes on cultivation and Ecology. Freshwater Biol. Assoc., Ambleside, Cumbria. England.
157. Page, C. F. (1988). A new Key to freshwater and soil Gymnamoebae. Freshwater Biol. Assoc., Sci. Publication. England.

158. Parrish C. M., O'Day D. M., Robinson R. D., Head W. S., Logan R. A. y Boynton. (1994). Are *Acanthamoeba* species part of the normal ocular flora of corneal donors?. *Invest. Ophthalmol. and vis. Sci.* 35.
159. Pearl, M. A. Visvesvara, S. G., Martinez, J. A., Theodore, H. F., Daggett, P. M. y Sawyer, K. T. (1990). *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. *The Rev. of Infect. Dis.* 12(3).
160. Penny, A. y Asbell. (1993). *Acanthamoeba* Keratitis: there and Back Again. *The Mount Sinai J. of Med.* 60 (4).
161. Pérez, M.I., Mascaró, M.C. y Osuna, A. (1983). *Hartmannella* spp. y *Naegleria fowleri*: Estudio electroforético de proteínas totales (Protozoa.). *Rev. Iber. Parasitol.* 43(1): 93-100.
162. Pernin, P., Cariou, M. L. y Jacquier, A. (1985). Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria* *J. Protozool.* 32 (4): 592-603.
163. Perkovich, T.B., Meisler, M.D., McMahon, T.J. y Rutherford, I. (1991). Adherence of *Acanthamoeba* to Soft Contact Lenses. *Rev. of Infect. Dis.* 13 (suppl5): S421-2.
164. Perrine, D., Barbier, D., Chenu, P. y Georges, P. (1992). Comparative Study of Cysticidal Effects of Three Diamidines on *Acanthamoeba* Strains Isolated from Keratitis. Vth International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-Living Amoebae. Virginia. USA.
165. Pffister, D., Cameron, J., Krachmer, J. y Holland, E. (1996). Confocal Microscopy findings of *Acanthamoeba* Keratitis. *Am. J. Ophthalmol.* 121 (2): 207-8.
166. Pidherney, M.S., Alizadeh, H., Stewart, G.L., Mc Culley, J.P. y Niederkorn, J.Y. (1993). *In vitro* and *in vivo* tumoricidal properties of a pathogenic/free-living amoeba. *Cancer lett.* 72(1-2): 91-8.
167. Pussard, M. (1973). Modalités de la division nucléaire et taxonomie chez les amibes (Amoeba, Protozoa). Révision des notions de promitose, mesomitose et métamitose. *Protistol.* 9 : 163 - 173.
168. Pussard, M., y Pons, R. (1977). Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistol.* 13:557-598.

169. Rabinovich, T., Weissman, S. S., Ostler, H. B., Sheppard, J. D., y Teikari, J., (1991). *Acanthamoeba* Keratitis: clinical signs and analysis of outcome. *Rev. of Infect. Dis.* 13: s 427
170. Rivera, F., Ortega, A., López-Ochoterena, E. y Paz, M. E. (1979). A quantitative morphological and ecological study of protozoa polluting tap water in México City. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 98 : 465- 469.
171. Rivera, F., Galván, M., Robles, E., Leal, P., González, L. y Lacy, A. M. (1981). Bottled mineral waters polluted by protozoa in México. *J. Protozool.* 28 : 54 - 56
172. 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.
173. 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.
174. Rivera, F., Romero, R. y Medina, F. (1984). Meningoencephalitis amibiana primaria producida por *Naegleria fowleri* . *Rev. Fac. de Med. México.* 27 : 113 - 122.
175. 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.
176. 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.
177. 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*. *Rev. de Enf. Inf. en Ped.* 2 : 91 - 94.
178. Rivera, F., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Rodríguez, S., Labastida, A. Ortiz, R. y Hernández, D. (1991). *Acanthamoeba* isolated during an atmospheric survey in Mexico City. *Rev. of Infect. Dis.* 13: s 388-389.

179. Rivera, F., Lugo, A., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ortiz, R., Gallegos, E., Labastida, A. y Chávez, M. (1992). Seasonal distribution of air-borne protozoa in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollut.* 61: 17-36.
180. Rivera, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Ortiz, R., Zaldivar, B., Ramírez, P. y Duran, A. (1993). Pathogenic and free-living amoebae isolated from swimming pools and physiotherapy tubs in Mexico. *Environ. Res.* 62(1): 43-52.
181. Rivera, F., Bonilla, P., Ramírez, E., Calderón, A., Gallegos, E., Rodríguez, S., Otiz, R., Hernández, D., y Rivera, V., (1994). Seasonal distribution of air-borne pathogenic and free-living amoebae in Mexico City and its suburbs. *Water, Air and Soil Pollut.* 74: 65-87.
182. Robert, V. B., y Rorke, L. B. (1993). Primary amebic meningoencephalitis, probably from *Acanthamoeba* Ann. Intern. Med. 79:174-179.
183. Rodríguez Zaragoza S. (1994). Ecology of free-living amoebas. *Crit. Rev. Microbiol.* 20 (3): 225-41.
184. Romanowski, E.G., Roba, L.A., Wiley, L. y Gordon, Y.J., (1994). The Effect of Tropical Corticosteroids on AD5 Shedding in the NZ Rabbit Ocular Model. *Virus. Invest. Ophth. Vis. Sci.* 35 (4).
185. Rondanelli, E. G. (1987). Infection diseases. J. Amphizoic amoebae human pathology. Ed. Piccin Nuova libreria. Padua Italy. 279 pp.
186. Sawyer, T. K. y Griffin, J. L. (1975). A proposed new family, Acanthamoebidae. fam. (order Amoebidae), for certain cyst-forming filose amoebae. *Trans. Amer. Micros. Soc.* 94:93-98.
187. Sawyer, T. K., (1989). Free- living pathogenic and non-pathogenic amoebae in Maryland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 55(5): 1074-1077.
188. Ruddell T.J. y Easty D.L. (1995). Drug therapy in murine model of *Acanthamoeba keratitis*. *Eye.* 9 (Pt 1): 142-3.
189. Shoeman C. J., Van Der Vyver A. E. y Visvesvara G. S. (1993). Primary amoebic meningoencephalitis in southern Africa. *J. Infect.* 26 (2): 211-4.

190. Schuster, F.L. y Michael, J. (1989). Surface antigens of *Acanthamoeba* as defined by monoclonal antibodies. *Memorias del V International Conference on Biology and Pathogenicity*. Bélgica.
191. Sengupta K., Das P., Johnson TM., Chaudhuri PP., Das D. y Nair GB. (1993). Production and characterisation of monoclonal antibodies against a highly immunogenic fraction of *Entamoeba histolytica* (NIH:200) and their application in the detection of current amoebic infection. *J. Euk. Microbiol.* 40 (6): 722-6.
192. Smith, J.M. y Huizinga, W.H. (1992). Comparative study of cytopathic mechanisms of *Naegleria* species. . *Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-Living Amoebae*. Virginia. USA.
193. Simitzis-Lc., Flohuc AM., Hasle DP., Paniagua- Crespo E., Colin J., Lagoutte F., Danval A. y Bellon C. (1989) *Acanthamoebic Keratitis*. Epidemiological and parasitologic study. *J. Ophthalmol.* 12 : 361 - 366.
194. Simmons, A., Connor, R., Hay, J., Seal, D.V. y Tomlinson, A. (1994). Effect of Co-Incubation with Different Bacteria on Adherence of *Acanthamoeba* to Hydrogel Contact Lenses. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 35 (4).
195. Singh, B. N. y Hanumaiah, V. (1979). Studies on pathogenic and non-pathogenic amoebae and bearing of nuclear division and locomotive form and behaviour on the classification of the order Amoebidae. Monograph No. 1 Association of Microbiologist of India. IND. J. Microbiol. 80 pp.
196. Silvany, R. E. y Luckenbach, M. A., (1987). The rapid detection of *Acanthamoeba* in paraffin-embedded sections of corneal tissue with Calcofluor White. *Arch. Ophthalmol.* 105 : 1366 - 1367.
197. 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.
198. 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.

199. Stopak, S. S., Roat, M. I., Nauheim, R. C., Turgeon, P. W., Sossi, G., Kowalski, R. P. y Thoft, R.A. (1991). Growth of *Acanthamoeba* on human corneal epithelial cells and keratocytes *in vitro*.
200. Tanaka Y., Suguri S., Harada, M., Hayabara T., Suzumori K. y Ohta N. (1994). *Acanthamoeba* specific human T-cell clones isolate from healthy individuals. Parasitol. Res. 80 (7): 549-53.
201. Taylor, W.M., Pidherney, M.S., Alisadeh, H. y Niederkorn, J.Y. (1994). *In vitro* Characterisation of *Acanthamoeba castellanii* Cytopathic Effect. Invest. Ophthal. vis. Scie. 35 (4) 603-.
202. Thong, Y. H. y Ferrante, A. (1987). Experimental pharmacology. In Rondanelli. Infection diseases. I Amphizoic amoebae human pathology. Ed. Piccin Nuova Libreria. Padua Italy. 279 pp.
203. Trousdale, M.D., Stevenson, D., Nakamura, T., Nóbrega, R., Mircheff, A. K. y Wood, R.L. (1994). Experimental Adenovirus Eye Dishe in Rabbits Induced with high and low titered Adenovirus Type 5 E3⁺ and E3⁻ Virus. Invest. Ophth. Vis. Sci. 35 (4).
204. Tyndall, R. L. y Domingue, E. L. (1992) Cocultivation of *Legionella pneumophila* and free-living amoebae. Appl. Environ. Microbiol. 44: 954-59
205. Ubelaker, J. E. y Moore, M. B. (1991). *In vitro* intercellular adherence of *Acanthamoeba castellanii*: a scanning and transmission electron microscopy study. Cornea 10 : 299 - 304.
206. Villemez, C. y Yang, S. (1992). *Acanthamoeba castellanii* (Neff) Possess Differentiation Receptors. Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of free- Living Amoebae. Virginia. USA.
207. Vass, A. y Tyndall, R. (1992). Interactions of Free-living Amoebae with Bacteria Resulting in Bacterial Diversity. . Vith International Conference on the Biology and Pathogenicity of free- Living Amoebae. Virginia. USA.
208. 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.

209. Visvesvara, G. S., Martínez, A. J. Shuster, F. L. Leitch, G. J., Wallace, S. V., Sawyer, T. K. y Anderson, M. (1990). Leptomyxid amoeba, a new agent of amebic meningoencephalitis in human and animals., J. Clin. Microbiol. 28 (12): 2750-2756.
210. Visvesvara, G. S., y Stehr-Green, J. K. (1990). Epidemiology of free-living amoeba infections. J. Protozool. 37 (4): 255-335.
211. Visvesvara, G. S. (1991). Classification of *Acanthamoeba*. rev. Infect. Dis. 13 : 369 - 372.
212. Visvesvara, G. S., Moura, H., Wallace, Sara. y Matinez, J. (1992). Isolation and Immunohistochemical Identification of *Acanthamoeba* and *Leptomyxid* amebas in patients with and without AIDS. Vth International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-Living Amoebae. Virginia. USA.
213. Visvesvara, G. S. y Shuster, F. L. (1993). *Balamuthia mandrilaris*, N.G. sp., agent of amebic meningoencephalitis in human and other animals. J. Eukariot. Microbiol. 40 (4): 504-14.
214. Warhurst, D.C. y Thomas, S.C. (1978). An isoenzyme difference between a "smooth"(S) and "rough"(R) strain of *Naegleria gruberi*. Protistologica. XIV(1): 87-89.
215. Weekers, P. H. H., Bodelier, P. L. E., Wijen, J. P .H., Vogels, G. O. (1993). Effects of grazing by the Free-Living Amoebae. *Acanthamoeba castellanii*, *Acanthamoeba polyphaga*, and *Hartmannella vermiformis* on various bacteria. A ppl. Environ. Microbiol. 59 (7): 2317-2319.
216. Weekers, P. H. H. (1993). *Acanthamoeba* and *Hartmannella*. Ecophysiological, biochemical and molecular biological differences. Tsis Doctoral. Universidad Católica de Nijmegen.
217. Wilhelmus, K. R. (1986). Rapid Diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis using Calcofluor White. Arch. Ophthalmol. 104 1309 - 1311.
218. Willaert, E. y Stevens, R. (1976). Indirect Immunofluorescent Identification of *Acanthamoeba* Causing Meningoencephalitis. Pathology Biol. 24 (8): 545-547.

219. Wright, P. (1989). *Acanthamoeba* Keratitis. Memorias del V International Conference on Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. Bélgica.
220. Yagita, K. y Endo, T. (1990). Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNA of *Acanthamoeba* strains in Japan. J. P. Protozool. 37 : 570 - 575.
221. Yagita, K., Endo, T. y Jonckheere, F. J. (1992). Molecular Epidemiology of *Acanthamoeba* strains from human eye infections. Vth International Conference on the Biology and Pathogenicity of free-living amoebae. Virginia. USA.
222. Yagita, K., Matias RR., Yasuda T., Natividad FF., Enriquez GL. y Endo T. (1995). *Acanthamoeba* sp. from the Philippines. electron microscopy studies on naturally occurring bacterial symbionts. Parasitol. Res. 81 (2). 98-102.
223. Yihua Wang., Jan PG Bergmanson y Osato, M. (1994). Inhibition of *Acanthamoeba* replication by elemental chlorine. Investigative Ophthalmol. and Vis. Sci. 35(4): 1920-7.
224. Yu- Guang, H. J., Niederkorn, J. P., Mc Culley., Stewart, D. R., Silvano, R. y Daugherty, J. (1990). *In vivo* and *in vitro* Collagenolytic activity of *Acanthamoeba castellanii*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.. 31 2235 - 2240.
225. Zanetti, S., Fiore, P.L., Pinna, A., Usai, S., Carta, F. y Fadda, G. (1995). Susceptibility of *Acanthamoeba castellanii* to contact lens disinfecting solutions. Antimicrob Agents Chemother. 39(7):1596-8.