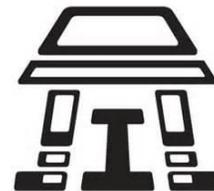




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
CARRERA DE OPTOMETRÍA**



**DESCRIPCIÓN BIOLÓGICA DE AMIBAS DE VIDA LIBRE
DIFERENTES AL GÉNERO *Acanthamoeba* AISLADAS DE
UN CASO CLÍNICO DE QUERATITIS AMIBIANA
BILATERAL.**

**TESIS PARA OBTENER LA LICENCIATURA EN OPTOMETRÍA
QUE PRESENTA:**

ROSI JAZMÍN MARES VALENCIA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARITZA OMAÑA MOLÍNA

**ASESORA DE TESIS: M. en C. MA. DOLORES HERNÁNDEZ
MARTÍNEZ**

Los reyes Iztacala, 11 de octubre del 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

Esta tesis se la dedico a mi familia, por no perder la Fe en mí.

*A mis padres que hoy, una vez más, ven los frutos de su esfuerzo y
dedicación.*

A mis hermanas que siempre me han aconsejado y apoyado.

A mi hijo por ser el motor que me inspira a ser mejor cada día.

A ustedes les dedico mi más grande logro.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios:

Por haberme permitido llegar a este día, ser la luz que guía mi camino y me da fortaleza para salir adelante en los momentos de debilidad. Por brindarme una vida llena de aprendizajes, experiencias y sobre todo felicidad.

A mi familia:

A mis padres, José y Rosy por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida. Gracias por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera y ser mis mejores maestros de vida. Por los valores que me han inculcado, y sobre todo, ser mi ejemplo de vida a seguir, gracias.

A mis hermanas Sacnicté, Selene, Lupita, por ser parte importante de mi vida y ser mi ejemplo de querer superarme profesionalmente.

A mi hijo Axel Emmanuel, por llenar mi vida de alegría y amor, que con su sonrisa me inspira a seguir adelante. Gracias por ser el pegamento que une a la familia. Te amo.

A mis asesoras de tesis:

A mi directora de tesis, Doctora Maritza, por haberme apoyado en las buenas y en las malas. Por haberme brindado su apoyo y amistad, por haber puesto su confianza en mí y dedicar tiempo a este trabajo.

A mi asesora de tesis, profesora Dolores por haber compartido conmigo sus conocimientos, su amistad y su tiempo.

A los profesores, Oscar Ramos, Bertha Hashimoto y Luz Elena Maya por dedicar un poco de su tiempo a la revisión de mi trabajo.

Gracias.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	AMIBAS DEL GÉNERO <i>Acanthamoeba</i>	2
1.2	QUERATITIS AMIBIANA.....	2
1.2.1	Cuadro clínico de la QA.....	3
1.2.2	Fisiopatología de la QA.....	3
1.2.3	Diagnóstico de QA.....	4
1.2.4	Tratamiento de QA.....	5
1.3	AVL como agentes causales de infecciones corneales.....	5
2.	JUSTIFICACIÓN.....	6
3.	OBJETIVO GENERAL.....	7
3.1	OBJETIVOS PARTICULARES.....	7
4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	8
4.1	DESCRIPCIÓN DEL CASO CLÍNICO.....	8
4.2	CULTIVOS AMIBIANOS.....	10
4.2.1	Medio monoxénico (medio NNE).....	10
4.2.2	Medios axénicos.....	10
4.3	IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS AMIBIANAS.....	11
4.4	DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE CRECIMIENTO.....	11
5.	RESULTADOS.....	13
5.1	Medio NNE.....	13
5.2	Axenización.....	13
5.3	Identificación morfológica de las cepas en estudio.....	14
5.4	Temperatura óptima de crecimiento sobre el medio NNE.....	17
5.5	Interacción con células MDCK.....	23
6.	DISCUSIÓN.....	25
7.	CONCLUSIÓN.....	28
8.	ANEXOS.....	30
9.	REFERENCIAS.....	35

Descripción biológica de amibas de vida libre diferentes al género *Acanthamoeba* aisladas de un caso clínico de Queratitis Amibiana bilateral.

1. INTRODUCCIÓN

Las amibas de vida libre (AVL) son protozoos cosmopolitas que habitan cualquier tipo de ambiente, especialmente lugares húmedos como el suelo y el agua, aunque también se pueden encontrar en el aire el cual utilizan como vehículo para su dispersión (1).

Algunas especies de este grupo son conocidas también como organismos anfizoicos (ambos lados), porque pueden vivir en su fase exozoica como organismos de vida libre y, en la fase endozoica son parásitos para el ser humano y algunos animales (Page 1988) (1).

Algunas especies del género *Acanthamoeba* son oportunistas, se comportan como endoparásitos en personas inmunosuprimidas. El SIDA ha remarcado la importancia de las infecciones provocadas por AVL, por su capacidad de inmunosuprimir y predisponer a infecciones oportunistas con alta morbilidad y mortalidad (2).

Hasta el momento, las especies de AVL capaces de provocar enfermedades en el humano incluye a: *Naegleria fowleri* la cual provoca meningoencefalitis amibiana primaria (MEAP), *Balamuthia mandrillaris* y varias especies del género *Acanthamoeba* pueden provocar encefalitis amibiana granulomatosa (EAG). *Acanthamoeba* es también agente causal de lesiones en piel, infecciones severas en pulmón, oídos, nariz y en ojos donde provoca queratitis amibiana (QA) (1), la cual trataremos en este estudio.

1.1 AMIBAS DEL GÉNERO *Acanthamoeba*

Las amibas de género *Acanthamoeba* son protozoos eucariontes descritos por primera vez en 1930 por Sir Aldo Castellani. En 1958, Culbertson demostró el potencial patógeno de *Acanthamoeba* spp., al hacer pruebas de seguridad de la vacuna de la polio se dio cuenta que los cultivos celulares se habían contaminado con estas amibas, al inocularlas en animales de experimentación se percató que eran capaces de provocar una infección en el sistema nervioso central (SNC). En 1972, se hizo evidente que *Acanthamoeba* era capaz de producir enfermedad en el ser humano y en 1974 se reportó la primera infección en el ojo causada por *Acanthamoeba* en el Reino Unido (3). Hasta el 2006, el número de casos reportados a nivel mundial se estimaba en 200 casos para infección sistémica y más de 3000 para queratitis amibiana (4). A la fecha, no se sabe con certeza el número de casos a nivel mundial, es probable que muchos de ellos hayan pasado inadvertidos por la falta de conocimiento acerca de este grupo de organismos.

1.2 QUERATITIS AMIBIANA

La queratitis amibiana (QA), es una infección corneal de curso crónico activo y de difícil resolución, que afecta a la córnea, la conjuntiva y otras estructuras oculares, se limita principalmente a un ojo, y ocurre con mayor frecuencia en personas inmunocompetentes (5), por lo general usuarios de lentes de contacto, por una mala higiene de estos y los estuches que los contienen.

Los principales agentes causales de QA son *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, de las cuales los agentes causales aislados con mayor frecuencia son *A. polyphaga* y *A. castellanii*, debido probablemente a que éstas especies son más abundantes en la naturaleza y resisten a condiciones adversas cuando son expuestas a determinados agentes recomendados para la desinfección de los lentes de contacto. En la actualidad, con base en la biología molecular, las amibas del género *Acanthamoeba*, se agrupan en 17 genotipos desde T1 hasta T17 y se realiza sobre bases moleculares, utilizando la región DF3 del rRNA amibiano de la subunidad 18s.

1.2.1 Cuadro clínico de la QA

La mayoría de los casos de QA (85%), se relaciona con el uso de lentes de contacto y mala higiene de los mismos. Se considera que el agua o las soluciones de lentes de contacto son la fuente de contaminación, el 14 % de los casos se asocia con traumatismo corneal y en el 1% no se encuentra relación alguna para su presencia. En su inicio, las amibas invaden el epitelio corneal, pero si la infección progresa, éstas invaden el estroma corneal.

La QA se caracteriza por presentar limbitis, queratopatía punteada, infiltrados epiteliales, subepiteliales o perineurales (queratoneuritis radial). En este momento el paciente presenta enrojecimiento, visión borrosa. Si la infección progresa, puede observarse ulceración, infiltrados anulares, placas endoteliales, uveítis anterior con o sin hipopion, y con menos frecuencia, edema corneal. Si el proceso se agrava, se pueden producir abscesos, escleritis, glaucoma, catarata e infección microbiana secundaria. Lo más característico es la presencia de un infiltrado anular compuesto por células inflamatorias (neutrófilos) (6).

1.2.2 Fisiopatología de la QA

A través de estudios *in vitro*, utilizando córneas de hámster, se ha observado que las amibas se adhieren al epitelio sano, sin un punto de entrada traumática, seguido de la migración de los trofozoítos hacia uniones celulares y la penetración de las amibas a las capas más superficiales de la córnea desde la primera hora de interacción (7). Es probable que los factores de virulencia que permiten la adherencia y la penetración de los trofozoítos en las primeras capas del epitelio se logren gracias a la combinación de mecanismos dependientes de contacto (adherencia y fagocitosis) y mecanismos independientes de contacto (proteasas extracelulares) (7, 8). Esto es facilitado por proteínas de diferente peso molecular, presentes en las células epiteliales corneales, se cree que interactúan con una proteína de unión a manosa de 136kDa que se expresa en la membrana de las amibas. Éstas son capaces de introducirse bajo las células epiteliales, migrar hacia las capas más profundas desorganizando la arquitectura normal de la córnea en

donde la fagocitosis e inducción de apoptosis juegan un papel relevante como mecanismos de patogenicidad de las amibas (9).

Una combinación de enzimas líticas permite a los trofozoítos invadir la matriz extracelular del estroma, para acceder al tejido estromal, e inducir el infiltrado anular visto en la infección clínica. En estudios *in vitro* se ha sugerido la participación de: serin proteasas, cistein proteasas (10), metaloproteasas y elastasas (11), las cuales se relacionan con la inducción de citólisis sobre las células del epitelio corneal (12).

Los trofozoítos pueden causar una respuesta citolítica y apoptótica en las neuronas de la córnea, tras una respuesta quimiotáctica haciendo que el signo clínico de neuritis radial aparezca. En la mayoría de los casos, esta es la etapa final de la inflamación en el entorno clínico. *In vivo* no se ha encontrado que los trofozoítos invadan el endotelio corneal y la cámara anterior a pesar del efecto citolítico y apoptótico reportado *in vitro*, por lo que los casos de endoftalmitis por queratitis amibiana son raros (9).

1.2.3 Diagnóstico de QA

En vista de las posibles consecuencias para la salud por la infección con estas amibas, el diagnóstico rápido es fundamental para un tratamiento temprano.

El cultivo de muestras de biopsia y raspados corneales, así como la microscopía confocal se han utilizado para identificar con éxito amibas en el tejido corneal (13).

La sospecha clínica es el primer paso y más importante para detener la infección por amibas. Una historia clínica detallada suele revelar factores de riesgo, ya sea el uso de lentes de contacto o exposición con aguas contaminadas (6).

Es común que la QA sea diagnosticada inicialmente como una queratitis por virus del herpes simple (VHS) o queratitis micótica, e incluso que el primer tratamiento sea para estas dos afecciones, la falta de respuesta rápida a la terapia antiviral o antimicótica siempre debe plantear la sospecha de AVL en el tejido corneal (9).

1.2.4 Tratamiento de QA

Se han implementado tratamientos tanto sistémicos como tópicos combinando antimicrobianos y azoles. Aunque los resultados han mostrado ser heterogéneos. Los mejores resultados se han reportado utilizando clotrimazol, miconazol, ketoconazol, fluconazol, itraconazol, isocianato de pentamidina isetionato, 5-fluorocitosina, trimetoprima sulfametoxazol (cotrimoxazol), sulfadiazina, claritromicina, chlorhexidina gluconato y polihexametileno biguanida, en combinación con isocianato de propamidina, isetionato, hexamidina o neomicina. El uso de combinaciones es recomendado para evitar patrones de resistencia (14).

1.3 AVL como agentes causales de infecciones corneales

Durante los últimos años, no sólo *Acanthamoeba* ha provocado infección ocular, sino que también se han reportado infecciones mixtas o individuales, por otras AVL incluyendo *Vahlkampfia* y *Vermamoeba* (antes *Hartmannella*) (15).

Estudios en otros países han informado que *Vahlkampfia* y *Vermamoeba* son capaces de tener un efecto citopático sobre los queratocitos humanos tal como lo hace *Acanthamoeba castellanii* (7).

Las amibas del género *Vermamoeba* son limax, es decir el trofozoíto es similar a un gusano, y los quistes son redondos y de doble pared. Aunque *Vermamoeba* se clasificó como parásito humano en 1997, la patogenicidad de este género en los seres humanos y los animales aún es discutible, como es el caso de la queratitis (3).

En los casos reportados de infección corneal por *Vermamoeba*, las manifestaciones clínicas fueron dolor ocular, enrojecimiento, visión borrosa y fotofobia (3).

Las amibas del género *Vahlkampfia* pertenecen a la misma familia donde se ubica el género *Naegleria* (16), habitan también en el agua y el suelo y se han aislado de muestras tomadas de lentes de contacto y han sido asociadas con infecciones mixtas en conjunto con *Vermamoeba* y *Acanthamoeba*.

2. JUSTIFICACIÓN

Las amibas del género *Acanthamoeba* son agentes causales de queratitis amibiana, en la que los lentes de contacto son un factor de riesgo para esta infección. Estas amibas usualmente contaminan los lentes de contacto y los estuches donde se guardan éstos.

Hasta la fecha, casi el total de los casos de queratitis amibiana reportados han sido causados por amibas del género *Acanthamoeba*. No obstante, especies amibianas pertenecientes a otros géneros pueden también alcanzar diversos hábitats, lo que conlleva a posibles riesgos para la salud.

En México en los círculos oftalmológicos, todavía no se reconoce totalmente a las AVL como agentes etiológicos de queratitis y, los pocos casos de QA reportados han sido asociados con amibas del género *Acanthamoeba*. En el Hospital Asociación para evitar la ceguera en México I. A. P. “Dr. Luis Sánchez Bulnes”, desde hace más de dos décadas se considera a estas AVL dentro de los diagnósticos iniciales y es precisamente de este hospital de donde se han reportado estos casos. Así, en los últimos años se han presentado algunos casos de QA que han mostrado un cuadro clínico distinto al reportado para la queratitis por *Acanthamoeba*, observándose además en los aislados del laboratorio clínico formas amibianas que no corresponden a las del género *Acanthamoeba*. En el presente trabajo se hace la descripción biológica de las amibas aisladas del primer caso en México de queratitis amibiana bilateral de infección mixta, causada por amibas de vida libre diferentes al género *Acanthamoeba*.

3. OBJETIVO GENERAL

Describir biológicamente amibas de vida libre diferentes al género *Acanthamoeba* aisladas de un caso clínico de Queratitis Amibiana bilateral.

3.1 OBJETIVOS PARTICULARES

- Describir el caso clínico.
- Describir morfológicamente las amibas aisladas de la infección corneal.
- Identificar morfológicamente a las amibas.
- Axenizar las amibas en estudio.
- Determinar la temperatura óptima de crecimiento.
- Evaluar el efecto citopático y determinar la patogenicidad de las cepas en estudio en cultivos celulares (MDCK).

4. MATERIAL Y MÉTODOS

El presente trabajo se llevó a cabo en colaboración con el Hospital Asociación para evitar la Ceguera en México I. A. P. "Dr. Luis Sánchez Bulnes". La FESI y en particular el laboratorio de la UIICSE, ha colaborado activamente con el Hospital desde el inicio de la década de los 90's en donde se ha participado en la identificación de las amibas de vida libre asociadas a casos de QA.

De manera breve mencionaré las acciones que se llevan a cabo en el momento en el que personal del Laboratorio de Microbiología a cargo de la QFB. Virginia Vanzzini Rosano nos hace saber que tienen un caso con diagnóstico presuntivo de infección corneal por amibas de vida libre, de manera que acudimos al hospital para recabar los datos clínicos de cada caso para llevar un registro. Las muestras son recibidas en cajas de Petri con medio monoxénico, el cual es un medio de cultivo solido que facilita el transporte de las amibas de vida libre, que se recibe sellado dentro de una bolsa de plástico y no requiere de condiciones especiales para su traslado, ya que en un par de horas posteriores a su entrega, llega al laboratorio en donde se comienzan los estudios que a continuación se detallarán.

4.1 DESCRIPCIÓN DEL CASO CLÍNICO

Los datos que a continuación se describen se obtuvieron de manera indirecta, es decir a través de la información obtenida de la Historia Clínica del paciente así como de los registros del laboratorio de microbiología del Hospital.

Paciente Femenino de 16 años de edad, habitante de la Ciudad de México, asistió al Hospital Asociación para Evitar la Ceguera en México I. A. P. " Dr. Luis Sánchez Bulnes" refiriendo dolor ocular agudo en el ojo izquierdo, fue atendida por un oftalmólogo quien administró tópicos oculares; moxifloxacino 0.5 %, netilmicina 0.3% y lágrimas artificiales, sin especificaciones de dosificación, la paciente relató el uso lentes de contacto cosméticos días previos al inicio de los síntomas. Cinco días después de que fue atendida en el Hospital, regresó refiriendo dolor ocular ahora en el ojo derecho, lagrimeo, y una pequeña mancha blanca en el centro de la córnea. Bajo la lámpara de hendidura se observó un defecto epitelial corneal central,

razón por la cual a la paciente se le pidió que acudiera al laboratorio de microbiología del hospital para tomar muestras de las corneas y los lentes de contacto.

De manera general la forma de tomar las muestras por parte del laboratorio, es la siguiente: se toma directamente de las lesiones corneales con hisopos estériles, haciendo un pequeño toque en la lesión con el propósito de aislar bacterias, hongos, levaduras y amibas, posteriormente se hace un raspado de la secreción la cual se toma del fondo de saco conjuntival igualmente con hisopos estériles. Se hacen también frotis (sobre portaobjetos) tinción de Gram, Pas y Giemsa. Las muestras recolectadas son depositadas en los diferentes medios de cultivo en condiciones de esterilidad: agar sangre, agar chocolate, Saburand-Emmons y medio no nutritivo (NNE) enriquecido con *Enterobacter aerogenes* inactivada con calor.

Las muestras de los lentes de contacto se obtienen depositando directamente los lentes de contacto de ambos ojos en los medios de cultivo bacterianos, micóticos y amibianos mencionados con anterioridad. Todas las muestras se incubaron a 30°C. El reporte del laboratorio para este caso se dio cinco días posteriores a su siembra, reportando crecimiento positivo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Chryseobacterium meningosepticum*, *Klebsiella oxytoca*, así como abundantes trofozoítos y quistes amibianos.

El mismo esquema terapéutico se mantuvo por 3 días más con la paciente y en la última consulta solo se observó un defecto epitelial paracentral de 1mm. La paciente ya no refirió dolor.

Los cultivos amibianos se transportaron al laboratorio de la FES Iztacala, donde se sembraron, con el propósito de llevar a cabo su caracterización biológica.

4.2 CULTIVOS AMIBIANOS

4.2.1 Medio monoxénico (medio NNE)

El primo aislamiento de las amibas en estudio, como ya se mencionó, se llevó a cabo en medio monoxénico NNE, el cual está constituido por una base de agar no nutritivo enriquecido con bacteria (anexo 1), que sirve como fuente de alimento para las amibas en cultivo. El medio se preparó en cajas de Petri estériles con agar no nutritivo el cual se enriqueció con *Enterobacter aerogenes* inactivada con calor (anexo 2).

Los cultivos amibianos se monitorearon observándolos en el microscopio invertido NIKON Eclipse T5100, posteriormente se hicieron resiembras. Cuando los trofozoítos migraron a la periferia de las cajas de cultivo, se marcó con un plumón la zona de mayor crecimiento amibiano, posteriormente se cortó con ayuda de un bisturí y se transfirió a otra caja con bacteria, depositando el trozo de agar en la parte central de ésta.

Las resiembras se incubaron en estufa de cultivo a 30°C, 37° C y temperatura ambiente, para determinar la temperatura que favorecía un mejor crecimiento amibiano.

4.2.2 Medios axénicos

La axenización se realizó una vez que se tuvieron los cultivos monoxénicos con trofozoítos en crecimiento óptimo. Se probaron los Medios Bactocasitona al 2% y medio PBSGM (Chang modificado) (anexo 3), enriquecidos con suero fetal bovino al 10% (fuente de alimento para las amibas por sus propiedades nutrimentales), y el medio 712, para determinar el medio idóneo de crecimiento; a los medios de cultivo se les adicionó 3µl de antibiótico (Penicilina G sal sódica y estreptomicina) para evitar contaminación.

Los medios de cultivo NNE con amibas se observaron en el microscopio invertido para seleccionar las zonas con buen crecimiento amibiano que se transfirieron a los tubos de borosilicato que contenían los medios axénicos. Con ayuda de un bisturí

se cortó y se depositó el trozo de agar en los medios Bactocasitona al 2% Chang y 712 (Anexo 4).

4.3 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA DE LAS CEPAS AMIBIANAS

Con el propósito de realizar la identificación morfológica de las amibas en estudio, se utilizaron cultivos monoxénicos con trofozoítos y quistes maduros, a partir de los cuales se hicieron preparaciones en fresco diluidos en solución salina. El diagnóstico se llevó a cabo a través de la observación de las cepas en el microscopio de contraste de fases (Zeiss, Germany). Se midieron 100 trofozoítos y 100 quistes para determinar el tamaño promedio de las cepas en estudio, y se observaron las estructuras amibianas de importancia taxonómica, de acuerdo al criterio morfológico establecido por Page (1988) claves taxonómicas para la identificación morfológica de las especies de amibas de vida libre.

4.4 DETERMINACIÓN DE LA TEMPERATURA ÓPTIMA DE CRECIMIENTO

La temperatura óptima amibiana, se determina a través de cultivos axénicos, haciendo crecer las amibas en tubos de borosilicato (Pirex) con un volumen final de 3 ml en el medio. Se colocan 5×10^4 trofozoítos en cada tubo. Se incuban a 30° C, 37° C y temperatura ambiente. Las pruebas se hacen por triplicado.

Se hace el conteo de amibas contenidas en cada tubo durante 7 días (cámara de Neubauer), se hace un promedio de los conteos obtenidos por cada tiempo y se gráfica.

La viabilidad de las amibas en estudio se determina a través de la prueba de exclusión de azul tripano al 0.4%.

4.5 PRUEBAS DE PATOGENICIDAD

La determinación del efecto citopático que producen las amibas de vida libre sobre cultivos celulares se utiliza como método alternativo para determinar la patogenicidad de estas amibas. La interacción *in vitro* de las AVL con células MDCK se llevó a cabo de la siguiente manera:

Primero se hicieron crecer las células MDCK en botellas de cultivo con medio Dulbecco modificado, enriquecido con suero bovino al 10% y una mezcla de kanamicina/ penicilina. Se mantuvieron a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5% por 48h. Posteriormente 5×10^5 células se transfirieron a placas de cultivo celular de 96 pozos con medio y se incubaron hasta alcanzar confluencia. Las células MDCK se interaccionaron en una relación 1:1 con trofozoítos amibianos durante 1h y 3 h; se procesaron pozos con células MDCK bajo las mismas condiciones como control. Se determinó previamente que las condiciones óptimas de la interacción se obtenía utilizando 75% del medio de las amibas y 25% del medio de las células MDCK en un volumen final de 200 μ l.

La interacción se realizó por triplicado. Al finalizar cada tiempo, se agregaron 5 μ l de solución de azul tripano al 0.2% para verificar la viabilidad de las células, finalmente se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en amortiguador de cacodilato de sodio 0.1 M y se observaron a través del microscopio de luz.

5. RESULTADOS

A través del trabajo en colaboración con el Hospital, solo se habían identificado amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* como responsables de los casos positivos de QA, Sin embargo, esta es la primera ocasión que se aíslan e identifican amibas de géneros diferentes asociadas a casos clínicos. Los resultados se detallan a continuación.

5.1 Medio NNE

Como ya se mencionó, las cepas se recibieron en medio NNE en cajas de Petri. Este medio sólido permitió el aislamiento, transporte y mantenimiento de las amibas.

El primer aislamiento de la cepa en estudio se obtuvo de muestras corneales de ambos ojos de la paciente, las cuales se depositaron en medio NNE con bacteria viva, posteriormente se aislaron de los lentes de contacto cosméticos colocándolos igualmente en cajas de Petri con medio NNE. En estas primeras muestras que se recibieron del hospital se observaron formas quísticas y tróficas que no pertenecían al género *Acanthamoeba*. En muestras posteriores recibidas del hospital se observaron quistes y trofozoítos aparentemente de *Acanthamoeba*.

En el laboratorio se tuvieron que realizar varias resiembras ya que las amibas coexistían con varias bacterias lo que dificultó contar con cultivos limpios, e incluso se adicionaron 3µl de antibiótico (penicilina con estreptomina 10000 u/µg/ml en solución salina NaCl al 0.85%) a las cajas antes de depositar los inóculos de agar con amibas para evitar que siguieran creciendo estas bacterias. Después de varias transferencias se obtuvieron cultivos aparentemente limpios, en el que solo se observaron trofozoítos.

5,2 Axenización

A partir de los cultivos monoxénicos en óptimo crecimiento, se hicieron varias transferencias a los medios de cultivo axénicos indicados en el método, sin embargo, no se obtuvo crecimiento amibiano de un par de amibas, las cuales más tarde se identificaron como amibas de los géneros *Vahlkampfia* y *Vermamoeba*. Además de que estas amibas no se adaptaron al crecimiento en estos medios,

después de varios días empezaban a crecer bacterias en los medios de cultivo lo cual limitaba aún más el crecimiento de las amibas por lo tanto estas amibas se mantuvieron en el medio NNE. *Acanthamoeba* si creció en el medio axénico de bactocasitona al 2%.

5.3 Identificación morfológica de las cepas en estudio

Las características morfológicas de los quistes y trofozoítos analizados se describen en las tablas 1 y 2, de acuerdo a las claves morfológicas de Page (1988).

	<i>Valhkampfia ustiana</i>	<i>Valhkampfia Inornata</i>	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
Formas del ectoquiste (pared externa) y endoquiste (pared interna).	Circular, oval, reniforme piriforme, Con una capa pegajosa.	Circular u oval, reniforme, puede tener capa gelatinosa.	Esférico, ligeramente ovoide, ectoquiste ligeramente separado de la pared interna.	Las dos paredes se conectan con pequeños brazos cónicos, el ectoquiste es muy grueso y plegado.
Núcleo	formas irregulares de 5 a 6.5 μ	El núcleo mide en promedio 3.4 a 4.5 μ		Uninucleado y central
Medida promedio	14.34 μ	10.9 μ	7 μ	15.67 μ

Tabla 1. Características morfológicas de los quistes de las especies aisladas

	<i>Valhkampfia ustiana</i>	<i>Valhkampfia inornata</i>	<i>Vermamoeba vermiformis</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
Vacuola contráctil	Presente	presente	presente	presente
Emisión de lobópodo y movimiento	Emite lobópodo en cualquier dirección es muy activo	Lobópodo en una sola dirección, con un pequeño uroide filamentoso	Emite lobópodo en una sola dirección	Lobópodo en una dirección y muy activo
Medidas	35.85-9.6 μ	18.5-36.5 μ	12-37 μ	15-35 μ

Tabla 2. Características morfológicas de los trofozoítos aislados

Con base en la observación en el microscopio de contraste de fases de las preparaciones en fresco de los cultivos monoxénicos, el análisis morfológico de las amibas aisladas dio los siguientes resultados de amibas diferentes al género *Acanthamoeba*: *Vahlkampfia ustiana* (Figura 1 y 2) *Vahlkampfia inornata*, *Vermamoeba vermiformis* (Figura 3 y 4), además de *Acanthamoeba castellanii* (Figura 5).



Figura 1. Microscopía de luz. Contraste de fases 40x. Trofozoíto de *Valhkampfia ustiana*. Se observa el núcleo, nucléolo, algunas vacuolas digestivas y el citoplasma granular.

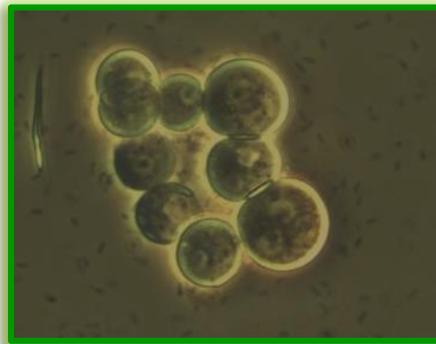


Figura 2. Microscopía de luz. Contraste de fases 40x. Quistes de *Valhkampfia ustiana*. Se observa la doble pared, circular y de contorno liso y pegajoso, en promedio miden 12 μ m.



Figura 3. Microscopía de luz. Contraste de fases 40x. Quiste de *Vermamoeba vermiformis* esférico, liso con diámetro promedio 7 μ m.



Figura 4. Microscopía de contraste de fases 40x. Trofozoíto de *Vermamoeba vermiformis* de forma limax, se observa su lobópodo anterior con el cual se moviliza.

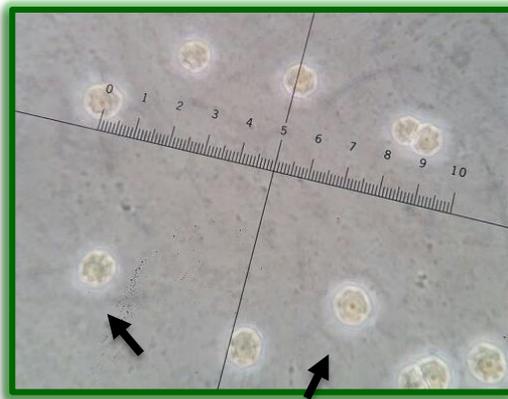


Figura 5. Microscopia de luz 10x. Quistes de *Acanthamoeba castellanii* en medio NNE (flechas).

5.4 Temperatura óptima de crecimiento sobre el medio NNE

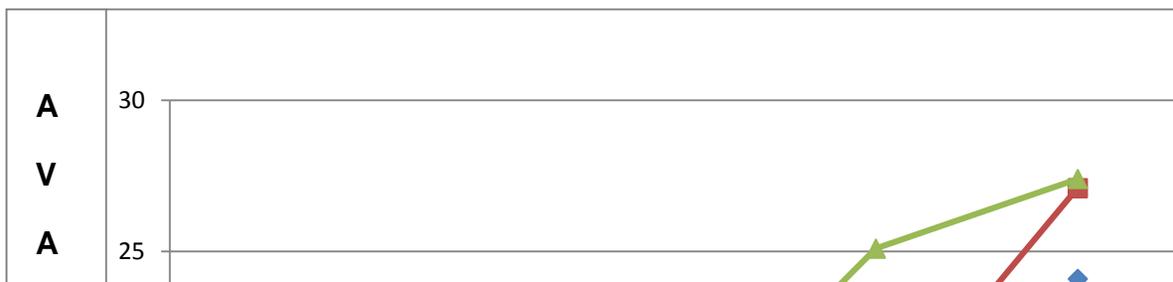
La dificultad para axenizar la mayoría de las amibas aisladas, hizo que las pruebas para evaluar la temperatura óptima de crecimiento se determinara a través de los cultivos monoxénicos NNE, registrándose diariamente el crecimiento y avance amibiano en milímetros con la ayuda de un vernier, midiendo el avance desde la zona del inóculo hasta donde llegaban los trofozoítos diariamente. Se determinó que a 30° C es la temperatura óptima de crecimiento donde todas las cepas muestran un buen avance y viabilidad, es decir que se pueden mantener en estado

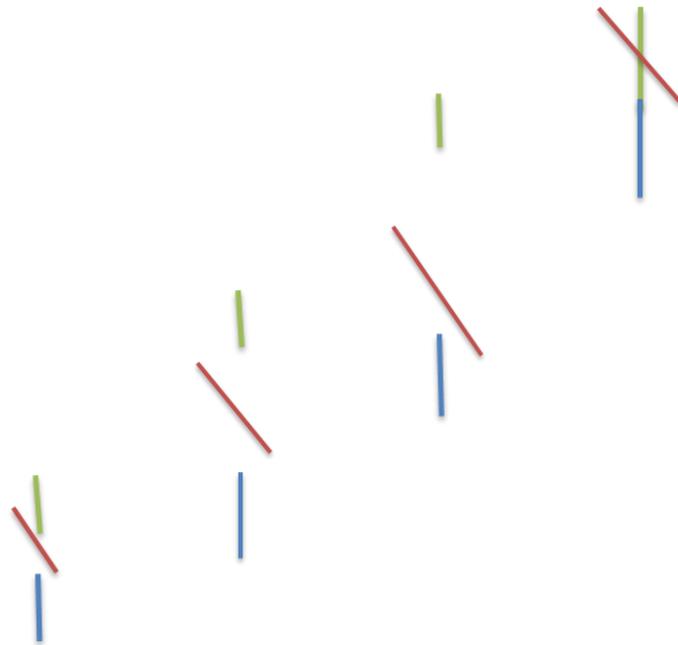
trófico para realizar otras pruebas biológicas como la evaluación de la patogenicidad.

Las cepas de *Vahlkampfia inornata*, *Vahlkampfia ustiana* y *Vermamoeba vermiformis* se encontraron mezcladas y en mayor proporción en el ojo derecho, Al realizar las pruebas de temperatura se buscó que solo hubiera una cepa en cada caja de cultivo, sin embargo, fue difícil hacer la separación de estas, así que se trató de dejar en mayor proporción una cepa en cada caja. Con respecto a *Vermamoeba vermiformis* y *Vahlkampfia inornata* la prueba se hizo en las mismas cajas ya que no se pudieron separar más, sin embargo, el registro se llevó por separado ya que el avance de *Vermamoeba vermiformis* fue más lento en comparación con *Vahlkampfia inornata*. Se registraron los mm de avance por día de cada cepa y se graficaron.

***Vahlkampfia inornata*.**

Esta cepa mostró un gran avance los primeros días ya que los trofozítos colonizaron rápidamente las cajas del medio NNE, sin embargo, en las cajas que se incubaron a 37° C se favoreció el crecimiento bacteriano, y las amibas no se mantenían en estado trófico hasta el final de la prueba, deteniendo su avance. Las cajas que se mantuvieron a temperatura ambiente mostraron igualmente un buen avance, el cual se frenaba al tercer día, observando formas quísticas. Al final del tiempo establecido (5 días), toda la caja estaba ocupada por quistes. Lo que sugiere que la temperatura ambiente no es ideal para mantener a los trofozoítos de esta cepa. En las cajas que se mantuvieron a 30° C los trofozoítos no fueron abundantes pero sí tuvieron un avance rápido y siguieron viables hasta el final de la prueba y unos días después. La temperatura óptima de crecimiento para *Vahlkampfia inornata* se determinó en 30° C. La gráfica 1 muestra los resultados obtenidos.





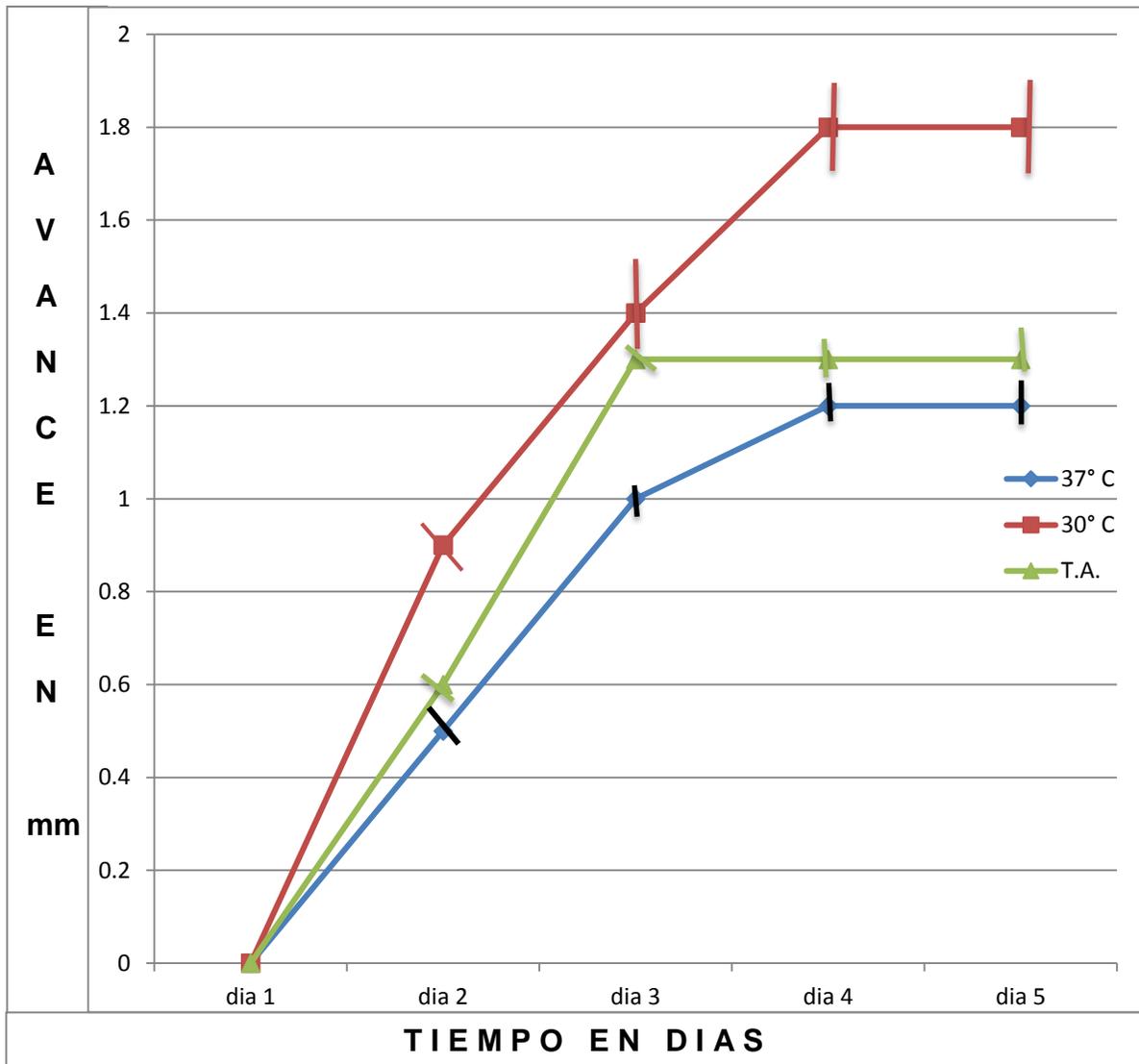
TIEMPO EN DÍAS

Gráfica 1. Crecimiento de *Vahlkampfia inornata* en medio NNE

Vermamoeba vermiformis

Como se mencionó, *Vermamoeba vermiformis* y *Vahlkampfia inornata* crecieron en un cultivo mixto, sin embargo, *Vermamoeba* mostró un crecimiento muy lento en comparación con *Vahlkampfia*. Al incubarlas a 37° C su crecimiento se vio afectado por la bacteria que impidió su avance, los trofozoítos de *Vermamoeba* eran más abundantes que los de *Vahlkampfia*, al alcanzar su máximo avance los trofozoítos se fueron enquistando. La temperatura ambiente no fue ideal para el crecimiento de *Vermamoeba* ya que al tercer día dejaron de avanzar y los trofozoítos se fueron enquistando desde el primer día. Al incubarse a 30° C no avanzaron más de 1.8 mm después del inóculo, la cantidad de trofozoítos era abundante, pero como he

mencionado se encontraban en un cultivo mixto y esta cepa es de menor tamaño por lo cual *Vahlkampfia* limitó su avance, en esta temperatura la cepa se mantuvo en estado trófico hasta el final de la prueba, por lo cual se determinó que la temperatura a la cual *Vermamoeba* se desarrolla mejor es a 30° C como se muestra en la gráfica 2.



Gráfica 2. Crecimiento de *Vermamoeba vermiformis* en medio NNE

Vahlkampfia ustiana

Al incubarse a 37° C tubo un avance muy lento y se detuvo en los días posteriores al inicio de la prueba por lo que determinamos que esta cepa amibiana no tolera el crecimiento a temperaturas altas además de que se empezó a observar el crecimiento de bacteria y los trofozoítos no eran abundantes al finalizar se observaron pocos quistes. A temperatura ambiente el avance amibiano también fue lento y se detuvo días después, los trofozoítos se fueron enquistando durante su avance y al final de la prueba solo quedaron quistes en las cajas. Al incubarse a 30° C se hizo evidente su crecimiento ya que esta cepa es más móvil y de mayor tamaño y colonizó toda la superficie del agar, los trofozoítos fueron abundantes, casi en toda la prueba la cepa se mantuvo en estado trófico, al finalizar se observaron quistes alrededor del inóculo y posteriormente se llenaron las cajas de quistes. La temperatura ideal para el desarrollo de esta cepa se determinó igualmente a 30° C ya que los trofozoítos siguieron viables en el transcurso de la prueba (gráfica 3).



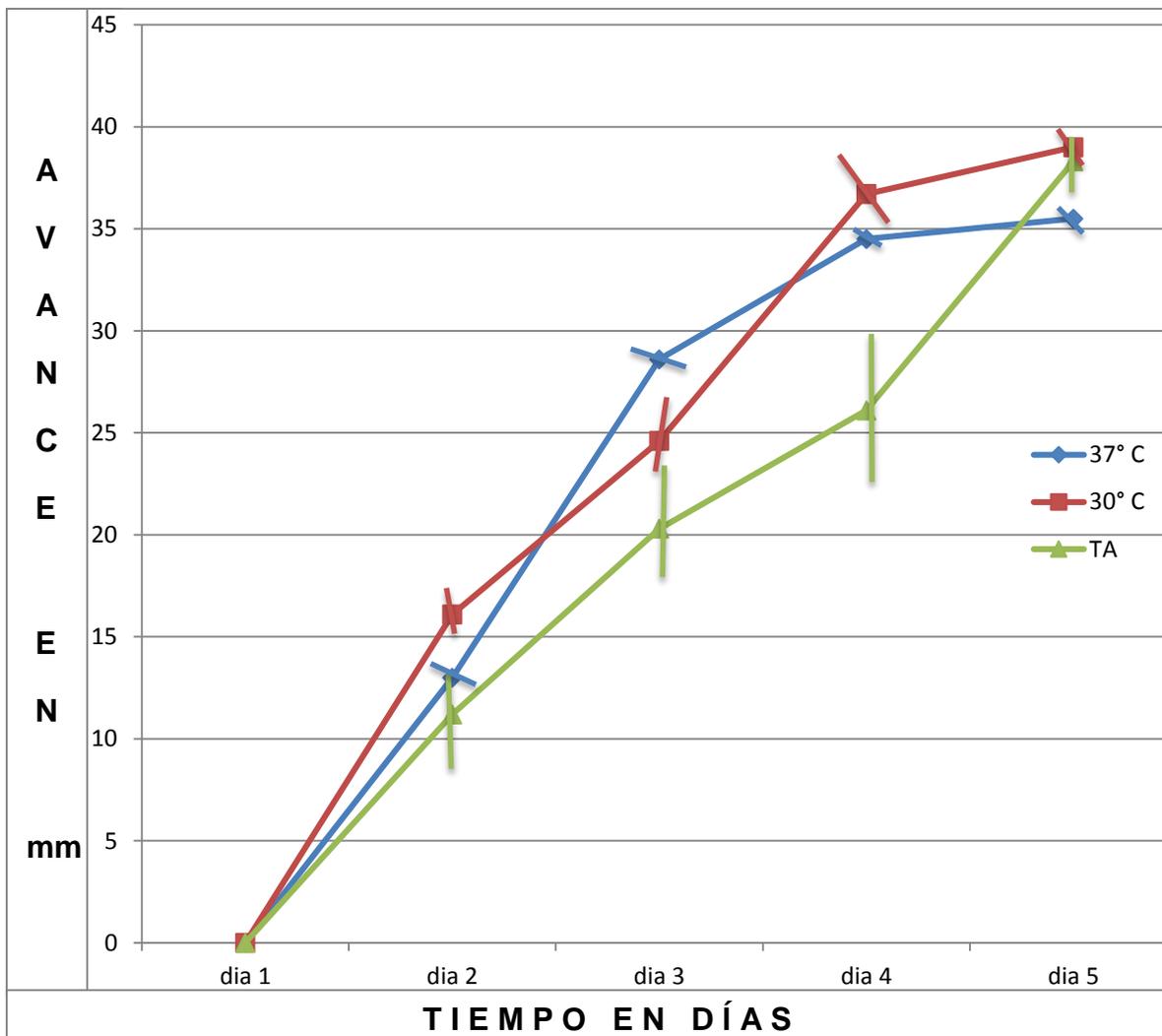
TIEMPO EN DIAS

Gráfica 3. Crecimiento de *Vahlkampfia ustiana* en medio NNE

Acanthamoeba castellanii

La cepa de *Acanthamoeba* se recibió separada por parte del hospital esta se encontraba en el ojo izquierdo y así se trabajó. El avance de *Acanthamoeba* fue muy rápido, en las tres temperaturas los trofozoítos colonizaron toda la superficie del agar, sin embargo los que se mantenían a 37° C no toleraron esta temperatura y se fueron enquistando deteniendo su avance los últimos días de la prueba, en este caso no hubo crecimiento de bacteria que impidiera su crecimiento. Los trofozoítos que se mantenían a temperatura ambiente siguieron avanzando hasta colonizar toda la caja, sin embargo durante el avance se iban enquistando y no eran tan abundantes como en las otras temperaturas. Los trofozoítos que se incubaron a 30° C fueron abundantes y llenaron la superficie de las cajas donde se encontraban,

estos trofozoítos fueron viables varios días después, el avance mostrado al finalizar ya no fue tan evidente como al principio ya que llegaron al límite de la caja (gráfica 4).



Gráfica 4. Crecimiento de *Acanthamoeba castellanii* en medio NNE

5.5 Interacción con células MDCK

Todas las amibas en estudio fueron capaces de adherirse y migrar hacia las uniones celulares desde la primera hora de interacción. Los trofozoítos se observaron emitiendo sus pseudópodos de manera activa entre las uniones celulares de la monocapa de células MDCK (Figura 6), en especial las amibas pertenecientes a *Acanthamoeba castellanii* las cuales se ubicaron más cerca de las uniones celulares provocando áreas líticas.

Después de tres horas de interacción las amibas continuaban activas mostrando el mismo patrón de comportamiento.

En las muestras control se observó una morfología normal y el cultivo se conservó confluyente (Figura 7).

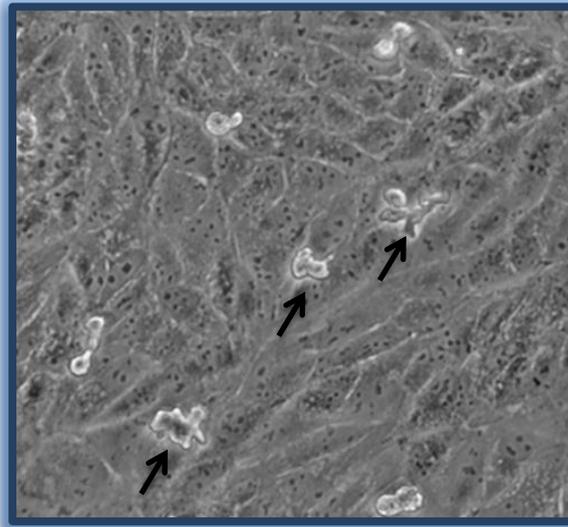


Figura 6. Microscopia de luz. Interacción de trofozoítos de *Vahlkampfia* spp. con células MDCK. Se observan amibas que emiten sus pseudópodos de manera activa entre las uniones celulares de la monocapa de células MDCK (flechas).

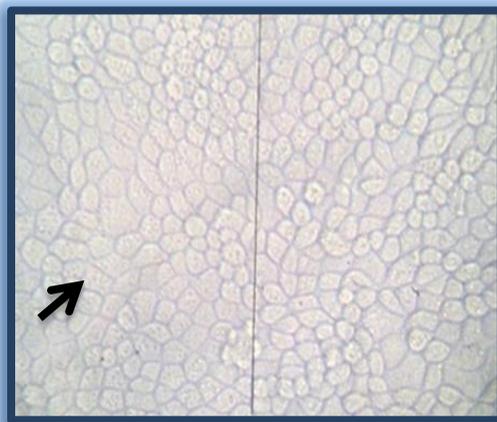


Figura 7. Microscopía de luz 10x. Células MDCK control, se observa una morfología normal y el cultivo se conserva confluyente (flecha).

6. DISCUSIÓN

Las amibas de vida libre son un grupo de protozoos cosmopolitas que juegan un papel importante en la naturaleza controlando las poblaciones de bacterias, favoreciendo con ello la mineralización de los suelos. Se ha reportado que en ocasiones algunos géneros (*Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Balamuthia*, *Sappinia*) se comportan como parásitos para diversas especies incluyendo al ser humano, en donde provocan infecciones en sistema nervioso central, piel, y resaltando las infecciones en ojo donde provocan QA, la cual es descrita como un proceso inflamatorio crónico activo producido en su mayoría por AVL del género *Acanthamoeba*, las cuales afectan a la córnea, en ocasiones a la conjuntiva y otras estructuras oculares, limitándose a un solo ojo, y ocurre con mayor frecuencia en portadores de lentes de contacto, por una mala higiene de estos y los estuches que los contienen. La falta de higiene propicia condiciones ideales para el desarrollo de infecciones de la córnea por organismos oportunistas como son las amibas de vida libre (3). Diversos estudios han demostrado que las soluciones limpiadoras de lentes de contacto son eficaces para eliminar bacterias y hongos, los cuales son también agentes causales de queratitis, sin embargo, estas mismas soluciones mostraron ser incapaces de eliminar los quistes de *Acanthamoeba* (17), que como sabemos son altamente resistentes a condiciones adversas y pueden permanecer viables hasta por 24 años.

En nuestro país existen pocos casos reportados de queratitis amibiana por *Acanthamoeba*, esto tal vez se deba a la falta de información que aún existe acerca de este grupo de especies patógenas, lo que trae consigo un mal diagnóstico y en consecuencia un tratamiento inadecuado que puede llevar al paciente a complicaciones de la infección; siendo necesario incluso un trasplante de córnea o en casos extremos la enucleación del globo ocular.

Es importante incluir esta infección en los diagnósticos presuntivos de pacientes que presentan úlceras corneales y que además sean usuarios de lentes de contacto que no responden a tratamientos antimicrobianos convencionales, y además tener

en cuenta la presencia de cualquier tipo amibas de vida libre en el área clínica, ya que en los últimos años se han reportado algunos casos de QA que han mostrado un cuadro clínico distinto al reportado para las queratitis por *Acanthamoeba* spp., ya que recientemente ha sido reportada la presencia de amibas diferentes al género *Acanthamoeba* aisladas de casos de infección corneal.

Las especies amibianas identificadas en este caso de queratitis bilateral mixta pertenecen a los géneros *Vahlkampfia* y *Vermamoeba* (amibas ampliamente distribuidas en la naturaleza) además de *Acanthamoeba*, las cuales se aislaron de las corneas y los lentes de contacto de una paciente usuaria de lentes de contacto cosméticos.

Si bien, la capacidad de que otros géneros de amibas distintos a *Acanthamoeba* spp. puedan producir infección corneal es aun controvertida (3), algunos autores han probado su capacidad de provocar un efecto citopático en cultivos celulares. En nuestro estudio demostramos la capacidad de estas amibas de adherirse y migrar hacia las uniones celulares y provocar un efecto citopático moderado.

Conjuntamente se aislaron otro tipo de microorganismos, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxitoca* y *Chryseobacterium meningosepticum*, de las cuales *Pseudomonas aeruginosa* y *Chryseobacterium meningosepticum* (20) se han reportado como agentes causales de infecciones corneales. Desafortunadamente no contamos con más datos clínicos que permitan diferenciar y señalar los signos relacionados con *Pseudomonas* y/o *Acanthamoeba*. Considero que además el hecho de que la infección se diagnosticó en un periodo agudo y no crónico favoreció el tratamiento oportuno. Por otra parte debemos considerar que las especies involucradas en la infección del paciente aunque son patógenas, no eran muy virulentas, porque como sabemos *Pseudomonas* es capaz de duplicar sus lesiones en periodos cortos de 24 horas y en este caso las lesiones observadas no evolucionaron de tal manera. Debemos considerar también el estado de salud de la paciente ya que los mecanismos de defensa como la lágrima son capaces de impedir la adherencia de los microorganismos a la córnea.

Discernir cuál de todos los organismos presentes en este caso clínico fue el principal agente de la infección corneal no es fácil, sin embargo, se ha visto que la acción conjunta de varios agentes patógenos puede conducir a una participación sinérgica que exagera el daño, en este caso particular es posible que el diagnóstico oportuno no permitiera que estos microorganismos invadieran zonas más profundas de la córnea, haciendo más grande la lesión.

Por lo anterior, es importante tener presentes a las AVL como parte de los diagnósticos iniciales, ya que esto favorece la implementación de un tratamiento temprano, además de tener en cuenta que las AVL también son consideradas como vehículo de dispersión de otros agentes etiológicos de infecciones corneales.

Si bien la participación de *Acanthamoeba* en casos de QA ha sido plenamente justificada, la presencia y aislamiento de otros géneros de amibas de vida libre en caso de infección en seres humanos, ha sido controversial, no obstante se ha probado *in vitro*, que tanto amibas del género *Vermamoeba* como del género *Vahlkampfia* son capaces de provocar un efecto citopático similar al que inducen las amibas del género *Acanthamoeba* (18).

Por otra parte, la queratitis amibiana por lo general se limita a un ojo, aunque ya se han reportado en otros países casos de QA afectando los dos ojos en particular en usuarios de lentes de contacto cosméticos (19), ya que su uso es indiscriminado y el usuario puede confundir fácilmente el lente de contacto del ojo derecho con el lente de contacto del ojo izquierdo diseminando así a las amibas en ambos ojos, además el material del que están hechos los lentes favorece este tipo de infecciones ya que es un material hidrofílico, el cual permite la adherencia de un sin número de microorganismos, de igual modo, el color que presentan los lentes de contacto cosméticos también facilita la adherencia de dichos organismos, y no solo de amibas, sino como en este caso que se aislaron también diferentes bacterias.

En este estudio no se contó con mayor información que permitiera hacer una mejor descripción clínica del caso sin embargo, este estudio es el primero en nuestro País en reportar una queratitis amibiana mixta bilateral, la cual correspondió a una

infección de curso agudo, en donde la paciente acudió oportunamente al hospital y afortunadamente todos los microorganismos aislados fueron sensibles a los fármacos prescritos; netilmicina y moxifloxacino, por lo cual la infección se resolvió rápidamente. La netilmicina es un tratamiento novedoso que funciona como bacteriostático, y que ha sido probado en otros casos de QA por lo que sería conveniente probar estos fármacos con otras AVL para poder sugerirlo como posible fármaco de elección.

La descripción de las características biológicas de las amibas de vida libre aisladas en este estudio nos permitió determinar que crecen bien a temperatura ambiente, que su fuente de alimento son las bacterias y mostraron un efecto citopático sobre células MDCK, los cuales son factores que favorecen su desarrollo y permanencia tanto en los lentes de contacto y posterior sobrevivencia e invasión en la córnea de la paciente.

La patogenicidad de las amibas en estudio se evaluó a través del análisis del efecto citopático sobre monocapas de células MDCK, en tiempos cortos de interacción, en donde se observó la migración de las amibas hacia las uniones celulares, principalmente de *Acanthamoeba*. Con respecto a las amibas del género *Vahlkampfia* y *Vermamoeba* el comportamiento sobre las células MDCK que tuvieron, es semejante a la migración que se observa cuando amibas del género *Acanthamoeba* se interaccionan de igual manera (7). Sin embargo, no se observaron zonas líticas de estas amibas, es decir, que el daño que provocan es muy limitado y se puede equiparar al cuadro clínico agudo que presentó la paciente.

7. CONCLUSIÓN

Es importante difundir el caso de queratitis bilateral mixta provocado por amibas de vida libre de los géneros *Vermamoeba*, *Valhkampfia* y *Acanthamoeba*, asociado con una infección bacteriana. Es necesario resaltar la presencia de diversos géneros amibianos aislados tanto de ambas córneas como de los lentes de contacto

cosméticos los cuales fueron la fuente de contaminación y acción sinérgica en el caso de invasión de la córnea y otros tejidos.

La actividad conjunta entre el hospital y el laboratorio debe ser más estrecha que permita una retroalimentación, ya que teniendo en cuenta que la descripción del caso clínico se dio de forma indirecta a través del análisis de la historia clínica del paciente, no se cuentan con más datos para dar una descripción más detallada del caso clínico, a pesar de ello, las características clínicas de la infección por *Vermamoeba* y *Valhkampfia* podemos decir que son más leves con respecto a las que provocan las especies de *Acanthamoeba*, sin embargo, se les deben considerar como agentes infecciosos emergentes tanto patógenos primarios como oportunistas, dado que en el laboratorio la evidencia de la migración y ubicación de las amibas en las uniones celulares y su penetración al tejido corneal puede verse favorecida en caso de infecciones mixtas como lo fue este caso.

Las especies amibianas aisladas del caso clínico muestran algunas características biológicas semejantes a las amibas del género *Acanthamoeba* asociadas a casos de queratitis amibiana.

Está claro que el uso de lentes de contacto favorece las infecciones en la córnea, por cualquier microorganismo ya que son fácilmente contaminables y si no hay una buena higiene este medio propiciará las condiciones ideales para el desarrollo de patógenos, como en este caso que se desarrollaron AVL de las especies *Vahlkampfia*, *Vermamoeba* y *Acanthamoeba* así como diferentes tipos de bacterias, y todas en conjunto se favorecieron para provocar la infección en la paciente.

Por otra parte, la venta y distribución de lentes de contacto cosméticos no está regulada por lo cual el acceso a ellos por personas jóvenes es ilimitado, además de que los lentes de contacto cosméticos favorecen las infecciones bilaterales por cualquier microorganismo.

Las amibas de vida libre aisladas en este caso crecen bien a temperatura ambiente, su fuente de alimento son las bacterias y mostraron un efecto citopático sobre

células MDCK, lo que refuerza su presencia tanto en los lentes de contacto y posterior sobrevivencia e invasión en la córnea de la paciente.

Es importante tener en cuenta a las AVL dentro de los diagnósticos iniciales en cualquier tipo de infección corneal, ya que las queratitis no se limitan a un grupo de patógenos como lo son las bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*), hongos y virus, e incluso no se limitan solo a *Acanthamoeba* spp. que es el principal agente causal de QA, sino, como se mostró en el caso, donde se aislaron cuatro tipos diferentes de AVL dos especies de *Vahlkampfia* (*inornata* y *ustiana*), *Vermamoeba vermiformis* y *Acanthamoeba castellanii*, las cuales, repito, al estar en contacto con las células MDCK mostraron un comportamiento activo sobre estas, lo cual indica que podrían tener un efecto similar al estar en contacto con las células corneales y provocar este tipo de infección, además de verse favorecidas por la presencia de bacterias que también son agentes causales de queratitis. Siempre es importante considerar la posibilidad de una coinfección de bacterias y amibas, ya que estando todas en contacto con la córnea, se ven favorecidas unas a otras provocando este tipo de infecciones corneales que pueden ir desde leves como lo fue con la paciente, hasta severas si no hay un diagnóstico y tratamiento tempranos, en este caso si la paciente no hubiese acudido rápidamente a consulta hubiera tenido graves consecuencias ya que *Acanthamoeba castellanii* y *Pseudomonas aeruginosa* son los agentes causales de queratitis más dañinos y comunes en portadores de lentes de contacto.

8. ANEXOS

Anexo 1

Medio monoxenico NNE

El medio NNE es un medio monoxénico constituido por un agar no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* inactivada con calor. Este medio permite el aislamiento, transporte y mantenimiento de las amibas. Se prepara en placas de Petri utilizando los siguientes reactivos para preparar un litro de medio NNE:

Cloruro de sodio (NaCl) 0.12g

Sulfato de magnesio (MgSo₄-7H₂O) 0.004g

Cloruro de calcio (CaCl₂-2H₂O) 0.004g

Fosfato de sodio dibásico anhidro (NaHPO₄) 0.142g

Fosfato de potasio monobásico (KH₂PO₄) 0.136g

Agar bacteriológico 15g

1000 ml de Agua destilada

Los reactivos se mezclan y calientan para homogenizar las sales en un matraz Erlenmeyer, para después esterilizar en una olla de presión a 15 lb y a 121°C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo de esterilización se trabaja en el cuarto de cultivo en la campana de flujo laminar previamente limpia y estéril, se vacía el medio en las cajas de Petri y se dejan gelificar. Cuando se gelifican se les agrega bacteria y se esparce sobre toda la caja, así con este medio preparado se hacen las resiembras de las amibas en el medio NNE.

Anexo 2

Preparación de *Enterobacter aerogenes*

La bacteria se utiliza para enriquecer el medio NNE. Se prepara agar nutritivo diluido en agua destilada. Se esteriliza el medio a 15 lb y a 121°C durante 20 minutos. Se vacía en cajas de Petri y se deja reposar hasta que gelifican.

Una vez gelificado el medio, con ayuda de un hisopo, se coloca y distribuye en toda la superficie un poco de bacteria, asegurándose que la bacteria cubra toda la superficie del agar, posteriormente se incuban a 37°C por 24 horas.

Para cosechar la bacteria después de las 24 horas, se agrega agua destilada a las cajas y con la varilla de vidrio se barre la superficie del agar y se concentra la bacteria para recolectarla posteriormente con pipetas Pasteur.

La bacteria cosechada se deposita en tubos de ensaye estériles con tapa.

Para inactivar a la bacteria viva se colocan los tubos en la olla de presión a 121° C por 5 minutos. Una vez inactivada, la bacteria se guarda en el refrigerador hasta su uso.

Anexo 3

Medio axénico PBSGM (Chang modificado)

El medio PBSGM (Fosfato, Biotriptasa, Suero, Medio de Glucosa) se emplea para mantener las cepas de amibas de vida libre aisladas. Se usan los siguientes reactivos:

Biotriptasa 16.6 g

Dextrosa 2.7 g

Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4) 1.5 g

Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0.9 g

Suero Fetal Bovino SFB 0.3 ml

1,000 ml de agua destilada

Se prepara disolviendo la biotriptasa, la dextrosa, Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 en el agua destilada, posteriormente se envasan 0.3 ml del medio en tubos de rosca para esterilizarlos a $121^\circ \text{C} \times 1.5$ lbs de presión durante 15 minutos. Dejar enfriar y una vez frío, agregar 0.3 ml de SFB y antibiótico (Penicilina y Kanamicina $200 \mu\text{g/ml}$). Se conserva en refrigeración hasta antes de su utilización.

Anexo 4

Medio axénico (Medio Bactocasitona)

Para la preparación del medio Bactocasitona al 2% se necesita 200 ml de Agua destilada y 2 gr de Bactocasitona los cuales se mezclan y calientan para homogenizar el medio.

Se vacían 2.7ml del medio en tubos de ensaye con tapa, colocándolos en gradillas metálicas, para después llevarlos a esterilizar en la olla de presión a 121° C a 15 lb de presión durante 15 minutos.

Posteriormente se suplementará cada tubo con 300µl de suero fetal bovino y 5µl de antibiótico (penicilina con estreptomina 10000 u/µg/ml en solución salina NaCl al 0.85%). El suero fetal bovino (SFB) se obtiene del procesamiento de sangre fetal recolectada higiénicamente durante el proceso de sacrificio del feto, mediante punción cardíaca. Una vez coagulada la sangre, se procede, mediante centrifugación, a separar el suero de la fracción celular. El suero es decantado y mezclado con producto del mismo origen y calidad, finalmente es congelado y enviado a laboratorios especializados dónde se procesa, estandariza y clasifica.

9. REFERENCIAS

- 1.- Bonilla LP, Ramírez FE, Ortiz OR y Eslava C. La Ecología de las Amibas Patógenas de Vida Libre en Ambientes Acuáticos. INE-SEMARNAT. 2004; 67-81.
- 2.- Oddó BD. Infecciones por amibas de vida libre: Comentarios históricos, taxonomía y nomenclatura, protozoología y cuadros anátomo-clínicos. Rev. Chil. Infect. 2006; 23 (3): 200-214.
3. - Abedkhozasteh H , Niyiyati M, Rahimi F, Heidari M, Farnia S y Rezaeian M. First report of Hartmannella keratitis in a cosmetic soft contact lens wearer in Iran. Irán, J. Parasitol. 2013; 8(3): 481-485.
- 4.- Galarza C, Gutiérrez E, Uribe M, Ramos W, Ortega A, Ávila J, Hanco J, Espinoza Y, Espinoza M, Ñavimcopa M, Gámez D. Amibas de vida libre en lesiones cutáneas. Dermatol. Per. 2006; 16(1):36-40.
- 5.- Uribarren BT. *Naegleria, Acanthamoeba, Balamuthia*. Depto. Microbiol. Parasitol. Fac. Med, UNAM.
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/amibas-vida-libre.html>
- 6.- Pérez IJ, Martínez I, Isasa P, Barrón J. Queratitis por *Acanthamoeba*. Enf. Inf. Microbiol. Clín. 2006; 24(1): 1-9.
- 7.- Omaña MM, Navarro GF, González RA, Serrano LJ de J, Campos RR, Martínez PA, Tsutsumi V, Shibayama M. Induction of morphological and electrophysiological changes in hámster cornea alter in vitro interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. Infect. Immun. 2004; 72(32): 45-51.
- 8.- Khan NA, Mortazavi P, Alsam S, Sissons J, Kim K S, Jaroll EL y Goldsworthy G. *Acanthamoeba* and blood-brain barrier: the breakthrough. Memories XIII International Meeting of Free living amoebae, Puerto de la Cruz Tenerife Spain, 2009.

- 9.- Clarke B, Sinha A, Parmar DN, Sykakis E. Advances in the Diagnosis and Treatment of *Acanthamoeba* Keratitis. J. Ophthalmol. vol. 2012, Article ID 484892, pages 6, 2012.
- 10.- Serrano LJ, Cervantes SI, Calderon J, Navarro GF, Tsutsumi V, Shibayama M. Protease activities of *Acanthamoeba polyphaga* and *Acanthamoeba castellanii*. Microbiol 2005; 52: 16-23.
- 11.- Clarke DW, Niederkorn JY .The immunobiology of *Acanthamoeba* keratitis. Microb. Infect. 2006; 8(5): 1400-1405.
- 12.- Salinas ME. Estudio morfológico de los mecanismos de patogenicidad de *Acanthamoeba castellanii* en la córnea humana, Tesis de Licenciatura FES Iztacala 2010: 39- 43.
13. - Rocha AB, Herbert B, Tanowitz HB, Marciano CF. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. IPID 2009; 62-75.
- 14.- Peralta RML, Ayala OJ de J. Amibas de vida libre en seres humanos. Rev. Salud Uninorte, Barranquilla. 2009; 25(2): 280-292.
15. -Smirnov AV, Chao E, Nasonova ES, Cavalier-Smith T.A Revised Classification of Naked Lobose Amoebae (Amoebozoa: Lobosa).Protist 2011; 162(4): 545–570,
- 16.- Alexandrakis G, Miller D y Huang AJW. Amebic keratitis due to *Vahlkampfia* infection following corneal trauma. Arch Ophthalmol 1998; 116 (7):950-951.
- 17.- Siddiqui R, Lakhundi S, Khan NA. Status of the effectiveness of contact lens solutions against keratitis causing pathogens. Cont Lens Anterior Eye.2014 Sep 30.pii: S1367-0484(14)00107-6.
- 18.- Kinnear FB. Cytopathogenicity of *Acanthamoeba*, *Vahlkampfia* and *Hartmannella*: quantative & qualitative in vitro studies on keratocytes. J Infect. 2003; 46(4):228-37.

19.- Kirk R. Wilhelmus, Dan B. Jones, Alice Y. Matoba, M. Bowes Hamill, Stephen C. Pflugfelder, and Mitchell P. Weikert. Bilateral *Acanthamoeba* Keratitis. *Journal of infection*, 2003 (46): 228-237

20.- Ray M, Lim DK. A rare polymicrobial keratitis involving *Chryseobacterium meningosepticum* and *Delftia acidovorans* in a cosmetic contact lens wearer. *Eye contact lens*. 2013, 39(29): 192-3