



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

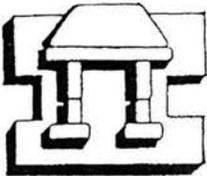
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

DETERMINACION DE AMIBAS DE VIDA LIBRE DEL  
GENERO *Acanthamoeba* EN LENTES DE CONTACTO Y  
SOLUCIONES PRESERVADORAS

**T E S I S**

PARA OBTENER EL GRADO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGIA  
P R E S E N T A :  
MARIA DE LA LUZ HERNANDEZ LEONEL

DIRECTOR DE TESIS: DRA. PATRICIA BONILLA LEMUS



LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX.

2002



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.



U.N.A.M. CAMPUS

**H. JURADO:**

**M. en C. Tzasna Hernández Delgado  
Dra. Patricia Bonilla Lemus  
Dra. Ma. del Rosario Sánchez Rodríguez  
Opt. Mary Carmen Bates Souza  
M. en C. Elizabeth Ramírez Flores**

**El presente trabajo se realizó en el Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) en el laboratorio de Microbiología Ambiental de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación (UIICSE).**

## DEDICATORIA

POR EL APOYO INCONDICIONAL QUE ME HAN BRINDADO DURANTE TODA MI VIDA, ESTE TRABAJO LO DEDICO CON MUCHO CARIÑO A MIS PADRES CARLOS Y LUCINA, QUIENES A TRAVÉS DE SUS CONSEJOS Y ENSEÑANZAS HAN HECHO POSIBLE LA CULMINACIÓN DE ESTE GRAN SUEÑO EN EL CUAL VEN REFLEJADAS LAS ESPERANZAS E ILUSIONES QUE HAN PUESTO EN MI, Y CON EL QUE QUIERO AGRADECERLES UN POCO..... LO MUCHO QUE ME HAN DADO.

A USTEDES; CLARITA, ANGELES Y MI PEQUEÑA GORETTI..... POR QUE SIN SU APOYO Y PRESENCIA NO HUBIERA TENIDO EL VALOR Y LA FUERZA PARA LLEGAR A ESTE MOMENTO.

## AGRADECIMIENTOS

En primer lugar a Dios, por haberme permitido tener una familia tan maravillosa.

A ti Papito, que aunque físicamente ya no estás conmigo, en mi corazón tu recuerdo esta presente.....Gracias por Todo.

A ti Mamita, por que eres mi mejor amiga y confidente, con quien cuento en todo momento. Gracias por tu valor, sabiduría, consejos, tu apoyo en todo momento y sobre todo por tu cariño.

A mis queridas hermanas Clarita y Gela.. quienes han sido mis amigas y han estado conmigo en todo momento apoyándome e incitándome a seguir adelante.

A mi preciosa Goretti.. por que sin tu presencia y cariño no tendría el valor para continuar éste camino.

A mi familia; Abuelos, Tíos, Tías, primos y primas; en particular a mi Tía Isabel y a mi Tío Justino, por su apoyo incondicional en las buenas y en las malas.

A mis amigas Liliana, Nora, Rocio, Paty y Natalia.. por su amistad y su ayuda.

A mis amigos Juan Carlos, Alejandro, Leobardo, Jahaciel, Antonio, Arturo, Eloy, Cuahutémoc, Jesús e Israel.

A mis compañeros de generación Ana, Verónica, Yareli, Manuel, Rolando, Tania, Victor, Natalia, Omar, Elizabeth, David y Gabriela.

A mis compañeros de proyecto CyMA, en particular a mi asesora la Dra. Patricia Bonilla Lemus y al Sr. Luis Fernando por su ayuda durante la realización de este trabajo.

Finalmente .... agradezco a la vida por lo hermosa y bondadosa que ha sido conmigo.

# CONTENIDO

IZT.

Pág.

Resumen.....	1
<b>1.- Introducción</b>	
1.1 Antecedentes .....	2
<b>2.-Generalidades sobre <i>Acanthamoeba</i> spp.</b>	
2.1 Ubicación Taxonómica de <i>Acanthamoeba</i> spp. ....	8
2.2 Morfología y Ciclo de Vida .....	11
2.3 Ecología y Distribución .....	14
<b>3.- Queratitis Amibiana.</b>	
3.1 Manifestaciones clínicas de la Queratitis .....	15
3.2 Patogenicidad de <i>Acanthamoeba</i> en la Queratitis .....	16
3.3 Diagnóstico .....	18
3.4 Tratamiento .....	20
3.5 Epidemiología .....	21
<b>4.- Justificación .....</b>	<b>23</b>
<b>5.- Objetivos .....</b>	<b>24</b>
<b>6.- Materiales y Métodos</b>	
6.1 Recolección de muestras clínicas .....	25
6.2 Aislamiento de las amibas .....	25
6.3 Identificación morfológica de las amibas .....	25
6.4 Prueba de Temperatura .....	26
6.5 Prueba de Patogenicidad .....	26
6.6 Sensibilidad a Fungicidas .....	26
6.7 Isoelectroenfoque .....	27
<b>7.- Resultados</b>	
7.1 Identificación morfológica .....	32
7.2 Prueba de temperatura .....	33
7.3 Prueba de patogenicidad .....	33
7.4 Sensibilidad a fármacos .....	37

7.5 Isoelectroenfoco .....	39
<b>8.- Discusión.</b> .....	41
<b>9.- Conclusiones</b> .....	46
<b>10.- Referencias citadas</b> .....	49
<b>11.- Anexos</b>	
Anexo I .....	54
Anexo II .....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ESQUEMAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación clínica, protozoológica y características clínicas de las enfermedades ocasionadas por amibas de vida libre del género <i>Naegleria</i> , <i>Acanthamoeba</i> y <i>Balamuthia</i> .....	4
<b>Figura 1.</b> Posición de <i>Acanthamoeba</i> en el esquema taxonómico.....	9
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de <i>Acanthamoeba</i> spp. De acuerdo a Page 1988.....	11
<b>Figura 2.</b> Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> sp.....	12
<b>Figura 3.</b> Quiste de <i>Acanthamoeba</i> sp. ....	13
<b>Figura 4.</b> Algunos factores involucrados en el desarrollo de la QA.....	18
<b>Esquema 1.</b> Diagrama de flujo de la metodología seguida.....	31
<b>Tabla 3.</b> Promedios obtenidos en las mediciones realizadas a trofozoítos y quistes de las cepas aisladas.....	32
<b>Tabla 4.</b> Prueba de tolerancia a la temperatura de las cepas aisladas de lentes de contacto blandos y soluciones salinas.....	33
<b>Tabla 5.</b> Prueba de patogenicidad (IN) de los 5 aislamientos .....	34
<b>Tabla 6.</b> Prueba de patogenicidad (IN) de la Cepa L3 .....	34
<b>Tabla 7.</b> Prueba de patogenicidad (IN) de la cepa LQ3 .....	35
<b>Tabla 8.</b> Prueba de patogenicidad (IN) en la cepa L10 .....	35
<b>Tabla 9.</b> Prueba de patogenicidad (IN) en la cepa LQ10 .....	36
<b>Tabla 10.</b> Prueba de patogenicidad (IN) en la cepa L7 .....	36
<b>Tabla 11.</b> Prueba de sensibilidad a Itraconazol y Fluconazol de las cepas aisladas .....	37
<b>Figura 5.</b> Isoelectroenfoque (PE) realizado a los cinco aislamientos .....	39

## RESUMEN

Las amibas de vida libre (AVL) son un grupo heterogéneo de organismos unicelulares, cosmopolitas, con adaptaciones para una existencia parásita o de vida libre. En este grupo se encuentran los géneros *Naegleria* y *Acanthamoeba* spp, siendo este último responsable de la Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG), que infecta a personas inmunocomprometidas y la Queratitis amibiana (QA); que infecta a individuos sanos en su mayoría usuarios de lentes de contacto (LC) con una higiene deficiente. A la fecha el diagnóstico y tratamiento de la QA es difícil, debido a diversos factores como: Incidencia relativamente baja de la infección, no se cuenta con métodos eficaces de identificación de AVL y no se toma en cuenta la QA como diagnóstico diferencial cuando se presenta una queratitis atípica.

Por estas razones se determinó la incidencia de AVL en LC, se identificaron los aislamientos obtenidos a través del diagnóstico morfológico, pruebas de patogenicidad, temperatura e Isoelectroenfoque (IE). También se evaluó *in vitro* la eficacia de algunos fármacos (Fluconazol e Itraconazol) en el tratamiento de la QA. Se recolectaron 50 LC y 45 soluciones preservadoras (SP), de donde se obtuvieron 5 aislamientos; de los cuales el 60% fueron invasivos y por lo tanto, potencialmente patógenas para el hombre, sin embargo, para que la infección se desarrolle influyen diversos factores, como: Lesiones causadas por LC, estado inmunitario del huésped y mecanismos de defensa naturales.

En la tolerancia a la temperatura, los 5 aislamientos presentaron una temperatura óptima a 22°C y una tolerancia a 30 y 37°C. En la evaluación de los fármacos, se observó que en general el Itraconazol y el Fluconazol presentan una dosis mínima eficaz de 1.0 mg y una dosis máxima de 2.0 mg a 24 hrs. de exposición, siendo más efectivo el Itraconazol. Finalmente el IE mostró que los cinco aislamientos pertenecen al mismo género (*Acanthamoeba*) y posiblemente a la especie *polyphaga*.

Tomando en cuenta que el muestreo se realizó al azar, es importante señalar que el 6% de los lentes de contacto y el 4.4 % de soluciones salinas fue positivo para *Acanthamoeba*, aunque esto aparentemente no representa una gran cantidad, la relevancia de encontrar estos organismos en LC y SP radica en el hecho de que en nuestro país la QA no es tomada en cuenta como un diagnóstico principal de queratitis, por lo que el paciente puede tener complicaciones serias, llegando incluso a la pérdida del ojo. Además, el hecho de encontrar estos organismos en LC indica que pueden estar presentes otros organismos como bacterias y hongos que podrían desarrollar diferentes tipos de infecciones; aunado a esta problemática, el hecho de no contar con una terapéutica farmacológica adecuada hace que el tratamiento sea aún más difícil, por lo que en este trabajo se propone la posibilidad de utilizar al Fluconazol como un fármaco de elección en el tratamiento de la QA; no sin antes realizar más investigaciones sobre su efecto *in vitro* e *in vivo*. Finalmente es importante utilizar la técnicas de mayor precisión (IE, Biología molecular) para confirmar el diagnóstico realizado por los métodos convencionales, para así caracterizar con mayor certeza la especie a la que nos referimos, y de ésta manera, establecer un tratamiento para la infección.

## 1. INTRODUCCIÓN

Los protozoos son organismos unicelulares, con formas sumamente variadas y pueden ser solitarios o coloniales. Estos organismos han explotado prácticamente todos los hábitats posibles y muchas especies presentan diversos grados de asociación con otros organismos (Kudo, 1969).

Un grupo importante dentro de los protozoos son, sin duda, el de las amibas, las cuales pueden ser de vida libre o parásitas (*Entamoeba histolytica* es un buen representante de éstas últimas).

Las amibas de vida libre (AVL), son un grupo heterogéneo de organismos unicelulares eucariontes, que poseen pseudópodos como carácter distintivo. Su cuerpo tiene forma irregular puede estar desnudo o protegido por conchas externas o internas, así como por esqueletos de varios tipos y de diferente composición química (Freeman, 1980).

Estos organismos pueden tener adaptaciones para una existencia parásita o de vida libre (Freeman, *op cit.*). Entre las últimas se encuentran las llamadas amibas anfitriónicas, en las cuales su citoplasma se encuentra dividido en una región externa más clara, el ectoplasma y una interna más opaca, el endoplasma. El núcleo es sencillo, la locomoción es por medio de flujo de partes del citoplasma que formarán los pseudópodos, éstos se forman debido a licuaciones temporales de la porción externa del endoplasma. Los alimentos sólidos son ingeridos por pseudópodos que se forman alrededor del alimento (algas pequeñas, bacterias, otros protozoos y en la córnea, se piensa que se alimentan de queratocitos) (Fulcher y Dart, 1998. *Pag. Web.*), la digestión se efectúa en las vacuolas alimenticias, también presenta la vacuola contráctil que excreta principalmente agua manteniendo una presión osmótica interna alta. Su reproducción es asexual por bipartición o fisión binaria. En ese grupo se encuentran algunos géneros importantes dentro de la clínica que pueden causar ciertas patologías graves en los seres humanos y animales. Estos géneros son: *Naegleria* responsable de Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MEAP), *Acanthamoeba* responsable de la Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG) y la Queratitis amibiana (QA). Recientemente se ha reportado al género *Balamuthia* como causante de la EAG (John, 1993; Martínez, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

Existen diferencias significativas entre las AVL de importancia médica, ya que *Naegleria fowleri* invade y causa daño a personas sanas, jóvenes, con antecedentes de natación, mientras el género *Acanthamoeba* lo hace en personas inmunocomprometidas incluyendo a pacientes con SIDA, con padecimientos crónicos, sin historia previa de natación, en quemaduras infectadas y rinitis (Rivera *et al.*, 1989), o bien en personas sanas en su mayoría usuarios de lentes de contacto con una higiene deficiente, cuando la invasión se presenta en tejido corneal (Gray *et al.*, 1994).

La patología que ocasiona *Acanthamoeba* se conoce como Acanthamoebosis, las principales diferencias se muestran en la tabla 1. En el caso de EAG no ha sido asociada con nadadores y usualmente ocurren en personas débiles, enfermas crónicamente y algunas pueden estar experimentando terapias inmunosupresivas. La infección es subaguda o crónica, el período de incubación no se conoce pero se cree que son necesarias varias semanas o meses para el establecimiento de la enfermedad y el curso clínico puede ser prolongado. El primer caso de esta enfermedad se reportó en los años 70's, siendo la posible ruta de invasión al Sistema Nervioso Central (SNC) la vía sanguínea, originada por un foco primario de infección en la piel, o tracto respiratorio (Martínez, 1993; John, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

Lo anterior se fundamenta en el hecho de que se han descrito casos de ulceraciones crónicas de la piel que contenían quistes y trofozoítos, en pacientes que murieron de EAG, en algunos de estos casos, la presencia de quistes y trofozoítos en la piel, parece ser un estado terminal de diseminación sanguínea a partir de focos primarios de infección en pulmón. Estas amibas también se han aislado de descargas purulentas de oído y mucosa bucal sin desarrollo de una EAG (Martínez, 1993).

*Acanthamoeba* puede llegar al tracto respiratorio por inhalación de aire, aerosoles o polvo conteniendo quistes o trofozoítos, la transmisión entre personas puede probablemente excluirse y no existe predilección por sexo o raza (John, 1993). Al inicio del curso clínico, aparecen signos neurológicos focales, hemiparesia y convulsiones, desprendimiento de la zona del cerebro afectada. Las alteraciones del estado mental como irritabilidad, confusión, alucinaciones, letargia, somnolencia y cambios en la personalidad son los síntomas más relevantes en estos pacientes. El dolor de cabeza es insidioso y se presenta en más del 40% de los casos, así como la fiebre que generalmente no alcanza altas temperaturas (Lares, 1990, Martínez y Visvesvara, 1997).

**Tabla 1. Comparación clínica, protozoológica y características clínicas de las enfermedades ocasionadas por amibas de vida libre del género *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* (Martínez y Visvesvara, 1997) .**

Características	Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG)	Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MEAP)	Queratitis Amibiana (QA)
<b>Agentes etiológicos</b>	<i>Acanthamoeba</i> spp. Trofozoítos: 15-35µm Quiestes: 12-28µm <i>Balamuthia mandrillaris</i> Trofozoito: 12-60µm Quieste: 6-30µm	<i>Naegleria fowleri</i> : Trofozoito: 10-20µm Quiestes: 8-15µm	<i>Acanthamoeba castellanii</i> , <i>culbertsoni</i> , <i>polyphaga</i> , <i>hatchetti</i> y <i>rhyssodes</i> .
<b>Factores predisponentes</b>	Inmunodeficiencia SIDA; Enfermedades crónicas.	Exposición a aguas contaminadas o polvo, individuos con historia previa de natación.	Individuos sanos, trauma corneal, lentes de contacto contaminados.
<b>Curso clínico</b>	Subaguda o crónica: Fatal 100%.	Aguda: Fulminante, muerte (4 a 6 días después de iniciar los síntomas), fatal 98%.	Subaguda o crónica: Si se da el tratamiento adecuado se elimina la infección.
<b>Signos y síntomas clínicos</b>	Cambios de la personalidad; somnolencia; irritabilidad; convulsiones; parálisis de nervios craneales; náusea; dolor de cabeza; mareos	Cefalea; náusea; vómito; rigidez de cuello; fiebre; coma.	Disconformidad ocular; severo dolor ocular; infiltrado anular en la córnea, fotofobia, visión borrosa.
<b>Diagnóstico diferencial</b>	meningitis aguda bacteriana.	Tumores cerebrales, abscesos, tuberculosis o meningitis fúngica, hematomas cerebrales.	Queratitis causada por hongos, bacterias o virus.
<b>Tratamiento</b>	Ketoconazol Itraconazol; Miconazol: sulfametazina; pentamidina	Anfotericina B.	Biguamida, isotionato de propamidina. Itraconazol (Omaña, 1997)

Otras manifestaciones clínicas son la náusea y el vómito que aparecen en forma temprana, parálisis de los nervios craneales (principalmente el 3<sup>ro</sup> y 6<sup>to</sup> par), ataxia cerebelosa y coma que es el evento final del curso clínico. La causa de la muerte suele ser la bronconeumonía, insuficiencia hepática o renal asociadas con septicemia (Lares, 1990).

Los cambios neuropatológicos consisten en una encefalitis granulomatosa crónica con células gigantes multinucleadas que van a los ganglios basales, luego a la base de los hemisferios cerebrales y al cerebelo. Aquí se ha encontrado tanto a los trofozoítos como a los quistes (Visvesvara, 1993). Los hemisferios cerebrales, cerebelo y bulbo raquídeo presentan áreas de ablandamiento asociadas a necrosis y hemorragias, hay aplastamiento de las circunvoluciones y estrechamiento de los surcos debido al edema cerebral (Lares, 1990; Martínez, 1993; Visvesvara, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

La otra enfermedad asociada al género *Acanthamoeba* es la conocida como queratitis amibiana (QA), la cual se define como la inflamación y ulceración de la córnea, es una infección de curso crónico en donde el estado quístico es muy importante, ya que es altamente resistente a la mayoría de los agentes antimicrobianos a las concentraciones que se alcanza en la córnea, por lo que el tratamiento es muy difícil (Kilvington *et al.*, 1990).

Son varias las especies del género *Acanthamoeba* que se han aislado de casos clínicos, siendo *A. polyphaga* y *A. castellanii* las especies más frecuentes (John, 1993).

Esta infección ha sido asociada al uso de lentes de contacto (LC) en particular blandos, estos LC se denominan de uso diario, continuado, desechables y terapéuticos, aunque el material de construcción de la lente sea el mismo (Fulcher y Dart, 1998. *Pag. Web*).

Los LC de uso más común son:

- 1) Los materiales rígidos permeables (RGP) a los gases (O<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>).
- 2) Los hidrogeles, usados en las lentes blandas hidrofílicas.

En el caso de las lentes RGP, éstos son polímeros de macromoléculas hidrófobas, en mallas tridimensionales que dependiendo de la distribución espacial de los segmentos moleculares y de su composición química, favorecen o impiden que el polímero sea más o menos compacto.

En el caso de los hidrogeles, son materiales ópticamente homogéneos, que están compuestos de una fase sólida (el polímero) dispersa en una fase acuosa, de tal forma que mientras los radicales hidrófilos contribuyen a la absorción del agua en el polímero, los puentes de enlace la limitan, la combinación de ambos determina la hidratación del hidrogel (Fulcher y Dart, *op cit.*)

## 1.1 Antecedentes

El estudio de las AVL como agentes patógenos comenzó en 1957, al observarse estos organismos como contaminantes de cultivos. Culbertson y sus colaboradores en 1958 describieron una encefalitis en ratón producida por una *Acanthamoeba* que contaminó un cultivo celular durante el desarrollo de la vacuna de la polio. El análisis histológico del cerebro de estos animales mostró células poco comunes. Posteriormente el análisis microscópico reveló amibas de vida libre, identificadas como *Acanthamoeba* spp. (Martínez y Visvesvara, 1997; Visvesvara, 1991; Lares, 1990), de esta manera Culbertson mostró la Neuropatogenicidad de estos organismos y propuso su posible papel como agentes causales no diagnosticados de enfermedades granulomatosas (Wilhelmus y Jones, 1991).

Después de todos estos descubrimientos, en 1965 en Australia se reportaron los cuatro primeros casos de meningoencefalitis producida por amibas de vida libre en humanos. Esta amiba de vida libre en 1961 causó la muerte a un niño y en 1965 a otros tres en el mismo distrito (Martínez y Visvesvara, 1997).

Posteriores a estos casos, en 1966 se acuñó el término Meningoencefalitis Amibiana Primaria (MEAP) al reportar el primer caso en Estados Unidos debido a *Naegleria fowleri*. A partir de estos reportes, las amibas de vida libre se han registrado con mayor frecuencia como patógenos importantes en individuos normales y en hospederos inmunosuprimidos (Martínez y Visvesvara, *op cit.*).

El primer caso de queratitis se reportó en 1973 en Texas, Estados Unidos, a un ranchero con una historia de trauma ocular y exposición a agua contaminada (González, 1994). De 1973 a 1981 solamente se reportaron cinco casos pero este número se ha ido incrementando.

En 1974 Nagington reportó dos casos en Gran Bretaña. La amiba produjo una ulceración crónica y progresiva en la córnea de uno de los pacientes afectados. En ambos casos se aislaron e identificaron *A. castellanii* y *A. polyphaga*. Desde ese momento a la fecha se han reportado aproximadamente 1000 casos. La mayoría de estos se asociaron con trauma corneal o bien a la exposición del ojo con agua contaminada (Visvesvara y Leitch, 1998).

En la actualidad, la Queratitis producida por *Acanthamoeba* es estudiada y ha adquirido una gran importancia debido al descubrimiento de su asociación con el uso de lentes de contacto, en particular blandos (González, 1994).

Así, en 1993 en México se reportaron los tres primeros casos de QA, (Omaña, 1997).

Recientemente en 1995, se aislaron diecinueve cepas del género *Acanthamoeba*, en 150 muestras constituidas por 65 lentes de contacto y 85 soluciones preservadoras. De las soluciones preservadoras se obtuvieron diez aislamientos de *Acanthamoeba*, solo se encontró una en los estuches de lentes de contacto: la mayor parte de los aislamientos fueron de *Acanthamoeba castellanii* patógena (Jiménez *et al.*, 1995).

## 2. Generalidades sobre *Acanthamoeba* spp

### 2.1 Ubicación taxonómica de *Acanthamoeba* spp.

Este género fue descrito en 1931 y actualmente existe una gran confusión acerca de su nomenclatura y estado taxonómico, sin embargo, durante los últimos años debido al desarrollo y perfeccionamiento de diversas técnicas en la microscopía electrónica, inmunología, biología celular y molecular; la nomenclatura y clasificación de estos organismos es cada vez más completa (Visvesvara, 1991).

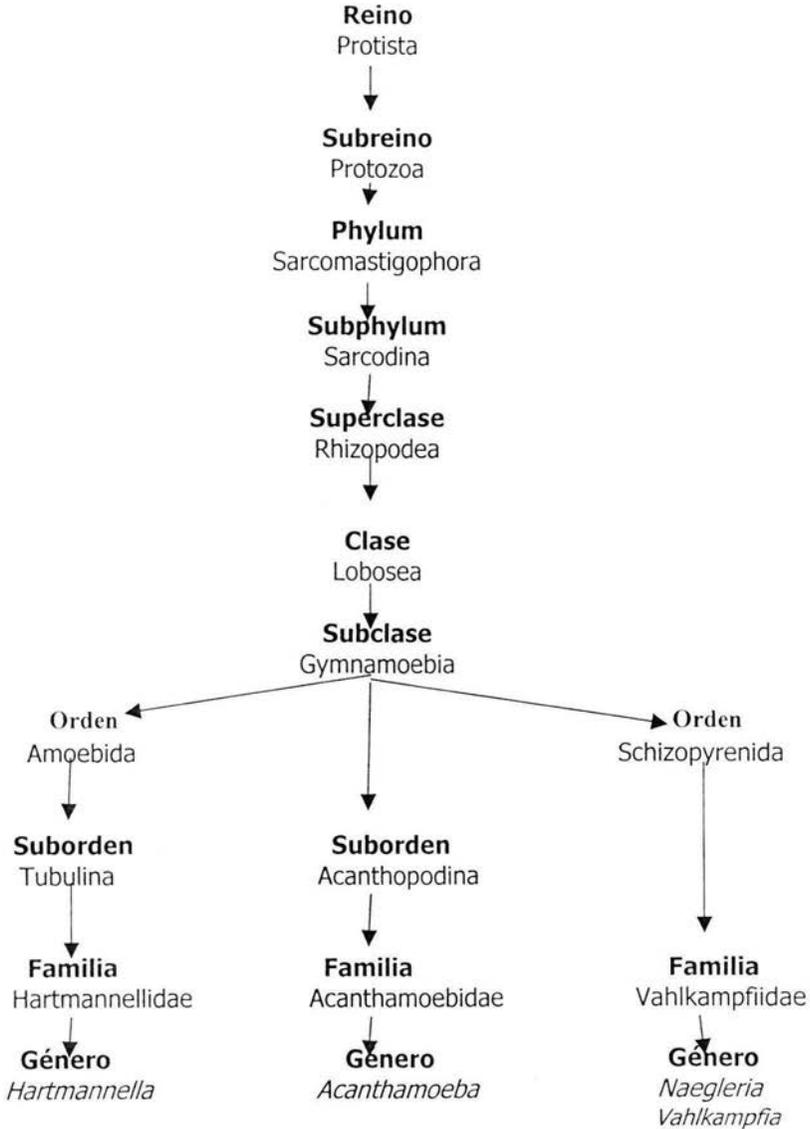
En un principio se colocó a miembros de este género como *Hartmannella*, después Volkonsky en 1931 citado por Visvesvara, (*op cit.*); creó el género *Acanthamoeba* para amibas caracterizadas por pequeñas estructuras como espinas, además de presentar un quiste con doble pared. Sin embargo, durante los siguientes años diversos autores consideraron que la apariencia del quiste, locomoción y forma no eran herramientas suficientes de valor para su clasificación.

Posteriormente, se concluye que las características antes mencionadas eran de gran importancia para su diferenciación, considerando que la presencia de acantópodos y la estructura del quiste eran características distintivas, así, separó *Acanthamoeba* y *Hartmannella* en un nivel ordinal para crear un nuevo orden: Acanthopodida (Visvesvara, *op cit.*). La posición de *Acanthamoeba* en el esquema taxonómico se muestra en la figura 1.

En los años subsecuentes se señalaron varias diferencias entre estos géneros, no solo a nivel del trofozoíto o quiste, sino también en los requerimientos nutricionales y respuestas serológicas. De esta forma, basado en las diferencias en talla y características morfológicas del quiste, en 1977 Pussard y Pons citados por Visvesvara (*op cit.*); reorganizaron 3 grupos dentro del género *Acanthamoeba* y establecieron 18 especies diferentes.

Desde entonces a la fecha han sido muchas las investigaciones basadas en Microscopía de luz transmitida, análisis de isoenzimas, análisis bioquímicos y fisiológicos que han contribuido a ampliar el conocimiento de estos organismos (Bonilla, 2000).

Figura 1. Posición de *Acanthamoeba* en el esquema taxonómico ( Visvesvara *et al.*, 1993, Visvesvara y Martínez, 1997).



Así, en 1988 De Jonckheere y Page 1988 apoyaron la clasificación para *Acanthamoeba* de Pussard y Pons con algunas modificaciones (Tabla 2), quedando como sigue:

a) **Grupo I.** Diámetro promedio del quiste  $\geq 18\mu\text{m}$ ; El endoquiste y el ectoquiste están separados y solo se unen en puntos llamados poros u opérculos que están a nivel del ectoquiste, el número de poros y brazos es el mismo. El endoquiste presenta una forma estrellada rodeada por el ectoquiste mas o menos redondeado. No tienen representantes patógenos, generalmente no crecen a  $37^{\circ}\text{C}$  y es difícil que se desarrollen en medios axénicos.

b) **Grupo II.** Formado por diez especies. El diámetro promedio del quiste es  $<18\mu\text{m}$ . Este grupo incluye las especies más comunes y ampliamente distribuidas. El endoquiste tiene una forma estrellada o poligonal, de tal manera que las dos paredes se unen en las esquinas y no en los brazos. El ectoquiste presenta una forma más o menos redondeada. En este grupo se encuentran las especies de importancia médica .

c) **Grupo III.** El diámetro promedio del quiste es usualmente menor a  $<18\mu\text{m}$ . Presentan un exoquiste muy delgado, el endoquiste es redondeado y no presenta extensiones o brazos, ya que las paredes están muy juntas entre sí.

**Tabla 2. Clasificación de *Acanthamoeba* spp. De acuerdo con Page (1988).**

GRUPO	ESPECIES
I	<i>Acanthamoeba astronyxis</i> <i>A. comandoni</i> <i>A. tubiashi</i>
II	<i>A. polyphaga</i> <i>A. castellanii</i> <i>A. rhyodes</i> <i>A. griffini</i> <i>A. mauritanensis</i> <i>A. lugdunensis</i> <i>A. quina</i> <i>A. divionensis</i> <i>A. triangularis</i> <i>A. hatchetti</i>
III	<i>A. palestinensis</i> <i>A. culbertsoni</i> <i>A. lenticulata</i> <i>A. royreba</i>

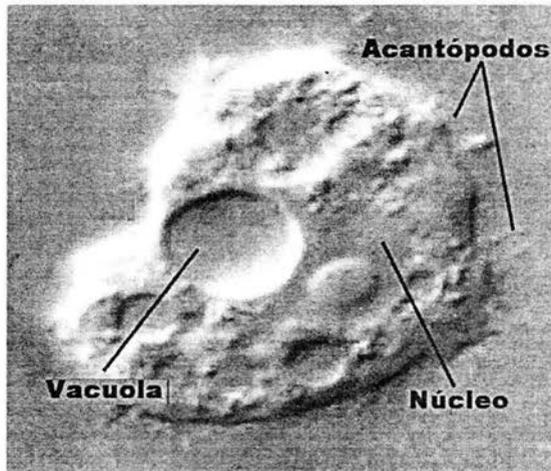
## 2.2 Morfología y ciclo de vida

El ciclo de vida de *Acanthamoeba* presenta dos estadios: Trofozoíto y Quiste.

**El trofozoíto** representa la fase vegetativa y proliferativa (Fig. 2), presenta un núcleo sencillo con un gran nucléolo localizado centralmente y su talla promedio es de 15-35 $\mu$ m, esta longitud varía en las diferentes especies (Pearl *et al.*, 1990), también presenta un abundante citoplasma con múltiples mitocondrias elongadas, lisosomas y vacuolas (contráctil y alimenticia) (Martínez y Visvesvara, 1997), este estadio se distingue por presentar dos tipos de pseudópodos: uno o dos pseudópodos amplios hialinos llamados lobópodos y a lo largo del perímetro celular, finas proyecciones llamadas acantópodos (*Acanthos*=espinas) (John, 1993) compuestos en su mayor parte por ectoplasma y consiste en un hialoplasma libre de organelos, conteniendo sólo gránulos de glucógeno, ribosomas, mechones de fibrillas y microvesículas (Lares, 1990).

*Acanthamoeba* es un organismo aerobio, y no existe en estado de trofozoíto en ambientes con baja concentración de oxígeno, sin embargo los quistes se han aislado de material anaerobio como heces fecales, y otros hábitats con poca concentración de oxígeno (Martínez y Visvesvara, 1997; Anonymous, 1997 *Pág. web*).

Su movilidad es por medio de lobópodos hialinos de gran tamaño con movimientos unidireccionales que constantemente se extienden y retraen, estos movimientos son lentos con respecto otros grupos.

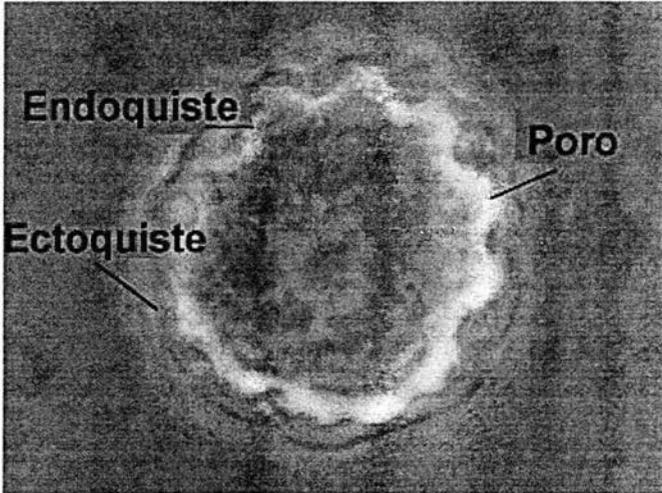


**Fig. 2. Trofozoíto de *Acanthamoeba* sp.**

**El quiste** de *Acanthamoeba* se desarrolla cuando las condiciones del medio ambiente no son favorables (Fig. 3), ya sea por falta de alimento, cambio de temperatura, escasez de nutrientes, disminución de la concentración de iones (Pearl *et al.*, 1990). En estas condiciones el trofozoíto comienza a redondearse, el retículo endoplásmico rugoso se alarga, su membrana envuelve al núcleo y las mitocondrias, así poco a poco se redondea más el contorno y se forma la pared del quiste (Lasman, 1982).

El tamaño promedio del quiste varía dependiendo de la especie. Este se conforma de una doble pared; la externa o ectoquiste y el endoquiste o pared interna. Las dos paredes están separadas entre sí y se unen solamente en algunos puntos denominados poros u opérculos, la forma de la pared es muy variada en cada una de las especies por lo que constituye una importante herramienta taxonómica (John, 1993; Lares, 1990; Visvesvara, 1991).

El citoplasma del quiste es muy denso por lo que se dificulta la descripción de su ultraestructura, contiene glóbulos de lípidos, lisosomas, mitocondrias generalmente esféricas y retículo endoplásmico rugoso dispuesto en forma circular y rodeando a mitocondrias, núcleo, vacuola alimenticia y otras inclusiones (Lares, 1990). Esta fase representa el estado de resistencia. Cuando las condiciones del entorno son favorables, el trofozoíto emerge a través de los opérculos, quedando vacíos (John, 1993).



**Fig. 3.** Quiste de *Acanthamoeba* sp.

La reproducción de *Acanthamoeba* es por fisión binaria simple en la cual la división nuclear es metamitótica y la membrana nuclear se desintegra durante la cariocinesis (Martínez y Visvesvara, 1997; John, 1993; Page, 1988).

### 2.3 Ecología y distribución de *Acanthamoeba* spp.

El género *Acanthamoeba* presenta una distribución mundial, es prácticamente ubicua debido a su tamaño, facilidad de transportación y formación de quistes. Todas estas características le permiten invadir otros medios diferentes al original (Bonilla, 2000), ya que se han aislado de cuerpos de agua dulce, potable, plantas de tratamiento, acuarios, suelo, aire, en personas sanas, agua mineral embotellada, tanques de agua, mares, sedimentos oceánicos, plantas nucleares, unidades de diálisis, unidades dentales, lavados gastrointestinales, hielo, cultivos bacterianos, fúngicos y de mamíferos, en secreciones bronquiales, en muestras de pacientes con diarrea, tinas de hidroterapia, soluciones de lentes de contacto, en vegetales, hongos, pescado, reptiles, aves y mamíferos (Lares, 1990; De Jonckheere, 1991; Martínez, 1993; Visvesvara, 1991, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

Estas AVL, pueden resistir diversos rangos de temperatura inclusive menor que 0°C y mayor de 45°C en forma de quiste (John, 1993).

En el caso de la queratitis por *Acanthamoeba*, se han realizado estudios en los que se ha concluido que existen especies de mamíferos que son más susceptibles a la infección que otros. Se ha reportado que solo las córneas de humanos, cerdos y de hamsters son susceptibles a la infección *in vitro* con *A. castellani* (Van *et al.*, 1993; Visvesvara y Sther-Green, 1990; Bonilla, 2000; De Jonckheere, 1991; Anonymous, 1997 *Pág. web*).

Considerando la distribución ubicua de este género y el hecho de que tan solo en Estados Unidos más de 24 000 000 personas usan lentes de contacto, uno podría esperar una incidencia más alta de Queratitis por *Acanthamoeba*, sin embargo, la ocurrencia de la enfermedad es baja (Martínez, 1993).

### 3. QUERATITIS AMIBIANA

#### 3.1 Manifestaciones clínicas de la Queratitis

En su forma habitual, la queratitis por *Acanthamoeba* se caracteriza por ser dolorosa e invalidante. Se puede presentar en individuos sanos, que no son usuarios de lentes de contacto o en individuos inmunocompetentes, por el contacto de la córnea con fluidos contaminados o por cuerpos extraños que produzcan un trauma. Recientemente se ha reportado que el uso de soluciones salinas caseras son un factor importante de riesgo, ya que pueden contaminarse con residuos de proteínas promoviendo así el crecimiento de bacterias y levaduras, volviéndose una fuente de alimento para la amiba (Visvesvara, 1993; Lares, 1990; Asbell, 1993; Thomas, *et al.*, 1989). Además de lo anterior, los lentes de contacto sobre la córnea representan un cuerpo extraño que puede producir alteraciones en la superficie corneal, lo que la hace más susceptible a la adhesión microbiana y por lo tanto a la infección (Kilvington, 2000).

El cuadro clínico de la QA varía según la duración de los síntomas previos a la primera consulta. La infección generalmente es unilateral, en sus inicios se caracteriza por una queratopatía punteada, pseudodendritas, infiltrados epiteliales, subepiteliales difusos o focales e infiltrados perineurales. Más adelante, se observan ulceración franca, infiltrados anulares y uveítis anterior (a menudo con hipopión). Algunos pacientes tienen placas endoteliales que causan edema corneal. Los infiltrados perineurales son poco frecuentes en las fases tardías de la enfermedad. La limbitis es común tanto en etapas tempranas como avanzadas (Fulcher y Dart, 1998. *Pág web*).

En el 10% de los casos se produce una infección bacteriana secundaria que puede explicar la presencia de úlceras focales y de un absceso anular que complica el cuadro clínico de las primeras etapas de la enfermedad. También debe sospecharse esta posibilidad si dicho cuadro se modifica durante el tratamiento. Las complicaciones tardías de la queratitis por *Acanthamoeba* son más graves y guardan relación con la duración de los síntomas antes de la primera consulta (Fulcher y Dart *op cit.*).

Una característica sintomática importante es el dolor ocular severo, que puede ir acompañado de enrojecimiento, irritación, sensación de cuerpo extraño y fotofobia (Lares, 1990; Martínez y Visvesvara, 1997), visión borrosa, congestión de la conjuntiva (Martínez y Visvesvara, 1997).

Cuando el proceso se agrava, pueden producirse abscesos, escleritis, glaucoma, catarata e infección microbiana secundaria con hipotonía. El proceso tiende a cronificarse en el centro de la córnea y en los estadios finales, el epitelio aparece íntegro, sobre un leucoma denso y vascularizado, a menudo con sinequias anteriores (Fulcher y Dart, 1998. *Pág. web*).

Otra característica importante es la erosión del epitelio corneal en forma recurrente y la formación de las pseudodendritas además de la formación de un infiltrado anular que puede ser parcial o completo, o aún doble y concéntrico, causado posiblemente por la interacción de leucocitos polimorfonucleares con organismos intactos, antígenos o productos de la infección, como la enfermedad es progresiva puede llegar a la pérdida del estroma corneal (Asbell, 1993).

### 3.2 Patogenicidad de *Acanthamoeba* en la Queratitis

Actualmente no se conocen con exactitud los mecanismos de patogenicidad, ya que se ha descubierto que intervienen diversos factores. Algunos autores han demostrado a través de estudios bioquímicos la presencia de factores como la adhesina y la producción de enzimas hidrolíticas las cuales están asociadas con la invasión y la fagocitosis. De la misma manera la concentración de sales y la flora normal del ojo también ha sido implicada en el desarrollo de la queratitis presumiblemente jugando un papel nutricional para la amiba o como endosimbiontes, ya que es bien conocido el papel de ciertas bacterias en otros protozoos, tales como la partícula de Kappa en *Paramecium aurelia*, Omicron en *Euplotes aediculatus*, y X-bacteria en *Amoeba proteus*. Los efectos de estos organismos en sus hospederos son variados (Fritsche *et al.*, 1993), y tales relaciones han sufrido una importante innovación evolutiva.

En 1991 se realizó un estudio en el que se observaron las relaciones entre la flora externa del ojo y la amiba, en el cual se utilizaron como sustratos alimenticios a *S. epidermidis*, *E. coli* y *Micrococcus* sp, aquí se observó *in vitro* que *S. epidermidis* es capaz al igual que *E. coli* de ser la fuente de alimento para la amiba, por lo que al ser común aislar de lentes de contacto bacterias, es posible que estas jueguen un papel importante como fuente de alimento para *Acanthamoeba* (Larkin y Easty, 1991) o como una barrera de defensa natural del ojo (Velasco y Bermúdez, 1996).

Por lo anterior, se han realizado algunos estudios de tipo comparativo para determinar la frecuencia en que estas bacterias aparecen en el ojo.

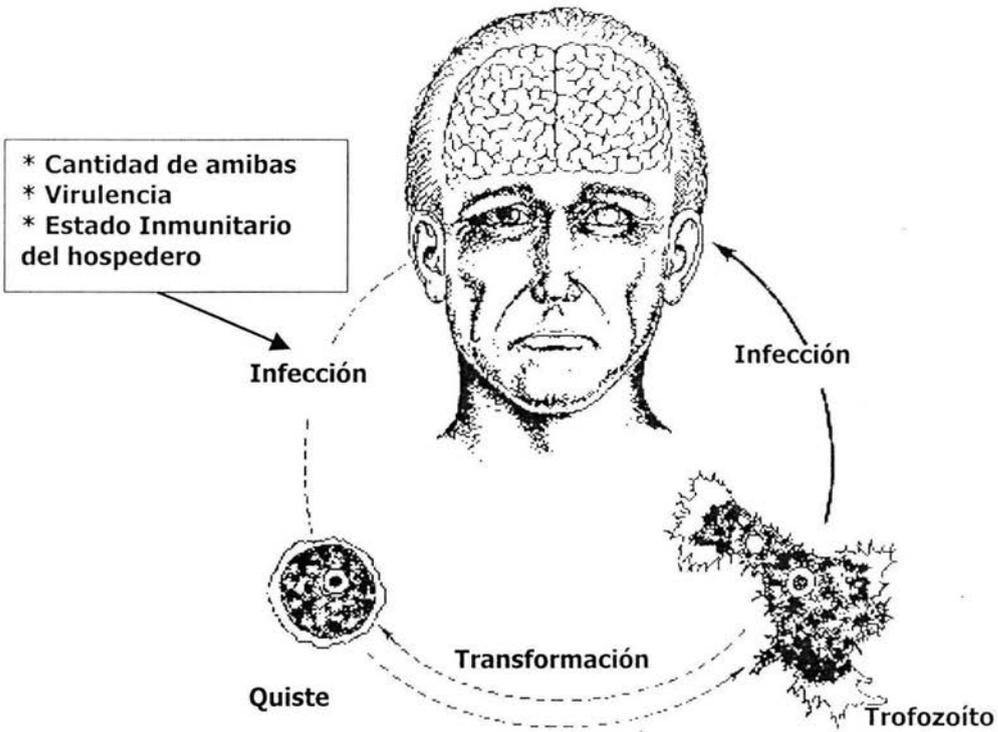
Así, en 1996 se realizó un estudio comparativo de la flora bacteriana de 225 lentes de contacto, 126 estuches y 252 líquidos de mantenimiento. En este estudio se observó un alto porcentaje de microorganismos en lentes de contacto, tales como *Staphylococcus aureus*, *S. viridans* y *P. aeruginosa*. Se concluyó que esta alta contaminación podría ser la causa de úlceras corneales y bacterianas en los portadores de lentes de contacto, sin embargo, *Acanthamoeba* no creció en estos medios contaminados con estas bacterias, por lo que esto podría funcionar como un mecanismo natural de defensa ocular (Velasco y Bermúdez, *op cit.*).

Todos estos descubrimientos sugieren algunos de los mecanismos de invasión, que de acuerdo con John (1989) son:

- a) Lentes de contacto con *Acanthamoeba* (trofozoíto y quiste)
- b) Adhesión de *Acanthamoeba* a los lentes de contacto
- c) Si hay un aseo inadecuado de los lentes hay persistencia de la amiba
- d) Diseminación de *Acanthamoeba* en córnea
- e) Hay invasión conjuntival, dispersión por lagrimeo y exquistamiento de las amibas.
- f) Se provoca una invasión corneal con ruptura del epitelio.

Es importante recalcar que aunque los seres humanos y animales estamos expuestos constantemente a estas AVL deben coincidir varios factores para que se desarrolle la enfermedad, algunos de los cuales se muestran en la figura 4.

Por otro lado también se ha encontrado que no es necesario ser usuario de lentes de contacto o tener alguna lesión en el ojo para desarrollar la enfermedad, ya que se ha reportado que *A. castellanii* puede atravesar el epitelio intacto de córneas humanas (Fulcher y Dart, 1998. *Pág. web*).



**Fig. 4. Algunos Factores involucrados en el desarrollo de la QA (modificado de John, 1993)**

### 3.3 Diagnóstico

El diagnóstico de la Queratitis por *Acanthamoeba* (QA) generalmente es equivocado o tarda mucho en diagnosticarse, debido a que la infección es poco común y no se llega al diagnóstico diferencial sino hasta después de semanas o meses en que el tratamiento para otros patógenos ha resultado inefectivo (Lares, 1990).

Para iniciar el diagnóstico, las observaciones biomicroscópicas son de gran utilidad, ya que, se observa la sintomatología y las lesiones presentes en el ojo, y de esta manera se comienzan a buscar quistes y trofozoítos de *Acanthamoeba*, los cuales pueden ser descubiertos haciendo raspados,

cortes de córnea o biopsias, por un lado parte de la biopsia o el material cortado debe ser procesado para cultivo, aislamiento e identificación.

Por otro lado se pueden realizar técnicas de tinción con Hematoxilina-Eosina, tinción de Gomori, Ácido peryódico de Schiff (PAS), Tricromo, Técnica de inmunofluorescencia o blanco de calcofluor y examinar las tinciones por microscopía (Martínez y Visvesvara, 1997). Si los pacientes usan lentes de contacto, los lentes y las soluciones limpiadoras deben ser colocadas en medios de cultivo específicos para AVL.

En la actualidad se pueden utilizar otras técnicas de diagnóstico e identificación como el diagnóstico a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la utilización de sueros anti-*Acanthamoeba*, sin embargo, aún no es posible realizarlas en cualquier hospital o laboratorio, ya que no se cuenta con la infraestructura y material adecuado, y muchas veces tampoco con el conocimiento mínimo necesario para identificarlas (Jiménez *et al*, 1995; Omaña, 1997)

Aunado a esta problemática, en muchos casos el diagnóstico se confunde debido a que algunas características clínicas de la queratitis causada por este género amibiano, son semejantes a los producidos por *Herpes simplex*, en esta infección se observa primero una conjuntivitis, aunque a veces puede ser asintomática, de la cual el individuo puede sanar, pero en cualquier momento que este inmunodeprimido este virus puede reactivarse y producir queratitis, también es muy común la formación de úlceras corneales dendritiformes de aspecto ramificado (John, 1993; Omaña, 1997; Bonilla, 2000).

Otras características clínicas que deben tomarse en cuenta son la evolución crónica y progresiva de la enfermedad a pesar del tratamiento, que generalmente es contra bacterias, virus y hongos, y prácticamente sin ningún efecto contra *Acanthamoeba* (Lares, 1990).

### 3.4 Tratamiento

Para el tratamiento de la queratitis amibiana es muy importante el pronóstico temprano de la enfermedad, ya que estas amibas se enquistan en los tejidos que infectan, constituyendo este hecho el principal problema que la terapéutica debe enfrentar (González, 1994), por lo que una terapéutica inicial inadecuada da lugar al enquistamiento de las amibas, lo cual da origen a una resistencia al tratamiento y ocasiona dificultad para erradicar la infección (Fulcher y Dart, 1998. *Pág. web*)

Los tratamientos farmacológicos que se han seguido incluyen diamidinas como: isotionato de propamidina, isotionato de pentamidina, dibromopropamidina, hexamidina. Las diamidinas actúan como inhibidores de la S-adenosilmetionato descarboxilasa en *Acanthamoeba*, o interactúan directamente con los ácidos nucleicos de la amiba. En general las diamidinas son bien toleradas por los tejidos oculares cuando es aplicado tópicamente, sin embargo tratamientos prolongados con propamidina produce queratopatía tóxica, la cual desaparece gradualmente después de la discontinuación de la droga (Lindquist, 1998).

Otros medicamentos usados en el tratamiento de esta enfermedad son los aminoglucósidos como la neomicina, en combinación con la propamidina, y la pentamidina tienen un efecto aditivo cuando se usan en combinación, este fármaco actúa perjudicando el plasmalema del organismo para facilitar la entrada de una droga efectiva tal como una diamidina aromática. El uso tópico de la neomicina es frecuentemente limitado en su duración, debido al desarrollo frecuente de una reacción tóxica o de hipersensibilidad (Lindquist, *op cit.*).

En el caso de los corticosteroides, estudios *in vitro* han demostrado que la dexametasona a concentraciones de 15  $\mu\text{g/ml}$  inhibe la morfogénesis (la conversión de quistes a trofozoítos o viceversa), estos resultados sugieren que los trofozoítos serían más susceptibles al tratamiento anti-amibiano, sin embargo, al realizar este estudio en conejos, los resultados obtenidos fueron contrarios a lo encontrado *in vitro*, ya que el número de infiltrados corneales y el grado de necrosis de colágeno en el estroma aumentó con el uso de los corticosteroides (Lindquist, *op cit.*).

Los Imidazoles como el miconazol, ketaconazol y el clotrimazol también se han utilizado para el tratamiento de la QA, éstos tienen un efecto amibostático más que amibicida, sin embargo, el miconazol es tóxico para el epitelio corneal, el clotrimazol tópico generalmente si es tolerado. El Ketoconazol parece ser el imidazol sintético más efectivo, el cual es dado sistémicamente pero requiere únicamente una dosis al día (Lindquist, *op cit.*).

El Itraconazol se propuso como fármaco de elección en el tratamiento de la Queratitis amibiana al observar su eficacia *in vivo* e *in vitro* (Omaña, 1997). Sin embargo en estudios realizados sobre la resistencia de *Acanthamoeba* a diversos medicamentos, se ha encontrado que fácilmente se desarrolla resistencia a los fármacos, por eso para el tratamiento de esta enfermedad se recomienda el uso de una terapia con diferentes fármacos (Byers, *Pág. web*).

Recientemente se propuso al Fluconazol como un agente tópico de elección para el tratamiento de la queratitis fúngica, ya que es de bajo peso molecular, de alta biohabilidad, soluble en agua, estable y de baja toxicidad, comparado con otras drogas como la anfotericina B (Yee *et al.*, 1997), y debido a que los tratamientos más eficientes probados hasta el momento incluyen agentes antimicóticos es importante conocer si éste puede ser un fármaco de elección contra la QA, ya que se cuenta con el antecedente en España en 1999 de un paciente que desarrolló una QA y fue tratado con propamidina y clorhexidina, y Fluconazol oral, obteniéndose la curación del proceso (Barrio *et al.*, 1999).

### 3.5 Epidemiología

Son varias las especies de *Acanthamoeba* que se han reportado como agentes causales de la EAG y QA. Aunque las infecciones por *Acanthamoeba* son relativamente poco frecuentes, han sido reportadas en EE.UU., Canadá, Honduras, Colombia, Venezuela, Perú, Brasil, Italia, Japón, Corea, Zambia, Nigeria, India, Holanda, Inglaterra, Bélgica, Alemania y México (Lares, 1990; Visvesvara, 1993; Visvesvara y Martínez, 1997).

La mayoría de los reportes provienen de países desarrollados más que de países subdesarrollados y esto es probablemente debido a que el conocimiento de la enfermedad es mayor en estos países y no necesariamente a una mayor incidencia, aunado a que cuentan con la tecnología más adecuada y avanzada para el diagnóstico de la infección.

El primer caso de la QA se reportó en 1973, este ocurrió en un ranchero del sur de Texas que presentó trauma ocular y exposición a agua contaminada.

Hasta 1981 solo 5 casos más fueron diagnosticados, pero en los años posteriores el número de casos fue incrementándose y en 1988 ya estaban registrados más de 1000 casos en todo el mundo (Visvesvara y Leitch, 1998).

En México, como ya se mencionó en los antecedentes se reportaron los tres primeros casos de queratitis en 1993; estos correspondieron a una mujer de 31 años, residente de Mexicali, Baja California, la cual acudió por presentar enrojecimiento en la conjuntiva y sensación de cuerpo extraño, se le trató con varios fármacos sin éxito alguno, hasta que se le realizó un raspado corneal y se observaron trofozoítos y quistes, posteriormente se trató con Itraconazol y Trobamicina hasta que se obtuvo la curación de la infección (Omaña, 1997).

El segundo caso de QA se presentó en un hombre de 26 años, residente del D.F., usuario de lentes de contacto blandos, con poco cuidado y aseo periódico. Se tomó un frotis de la córnea del ojo afectado y se procesó encontrándose crecimiento amibiano, por lo que se inició el tratamiento con Itraconazol y Trobamicina hasta obtener una mejoría, sin embargo el caso se complicó debido a la irregularidad de visitas al hospital por parte del paciente, así que se tuvo que realizar un trasplante (Omaña, *op cit.*).

El último caso correspondió a un hombre de 35 años, residente del D.F, usuario de lentes de contacto blandos, al realizar el procedimiento común de diagnóstico se encontró crecimiento amibiano por lo que se le trató al igual que los otros casos con Trobamicina e Itraconazol hasta obtener la curación total de la enfermedad (Omaña, *op cit.*).

#### 4. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

De acuerdo con lo expuesto anteriormente podemos decir que el estudio de las AVL es muy importante, en particular la QA, ya que como se mencionó si no es diagnosticada y tratada a tiempo las complicaciones que resultan de ello pueden ser graves llegando inclusive a la pérdida del órgano.

Por tal motivo, y debido a la poca información con que cuentan los hospitales e instituciones dedicadas al estudio Oftalmológico sobre amibas de vida libre en particular del género *Acanthamoeba* causante de la QA, es necesario realizar un estudio preliminar sobre la presencia de éstas en lentes de contacto y en soluciones salinas para determinar la presencia de estas amibas y poder tomar medidas preventivas o correctivas según el caso.

Con este trabajo también se pretende evaluar la eficacia de algunos fármacos que podrían ser utilizados, siendo esto de vital importancia, ya que como se planteó anteriormente el tratamiento de esta infección es muy difícil debido a que no se cuenta con un cuadro terapéutico adecuado para todos los casos. Sin embargo, no se pretende estandarizar un tratamiento, sino el ampliar el campo de posibilidades en el uso de fármacos que podrían colaborar en la curación de la infección.

## **5. OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de amibas de vida libre del género *Acanthamoeba* en muestras de lentes de contacto y soluciones preservadoras.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

Identificar morfológicamente las amibas aisladas de las muestras obtenidas

Realizar pruebas de tolerancia a la temperatura, patogenicidad e isoenzimas a las amibas aisladas para su identificación.

Realizar pruebas de sensibilidad *in vitro* a Fluconazol e Itraconazol de las cepas que resulten positivas

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Recolección de muestras clínicas

Las muestras de soluciones preservadoras y lentes de contacto se recolectaron en el Hospital para evitar la Ceguera en México "Dr. Luis Sánchez Bulnes", esta recolección se realizó al azar, es decir, se utilizaron lentes de contacto de pacientes que asisten a consulta externa debido a diversos padecimientos.

### 6.2 Aislamiento y cultivo de las amebas

**Cultivo monoxénico.** Los lentes se colocaron directamente sobre la superficie del medio NNE (Anexo I) y el líquido de las soluciones preservadoras (SP) se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos para posteriormente sembrarse en el medio NNE. Es importante recalcar que la cantidad de SP fue variable, sin embargo, se ajustó a un volumen constante 1 ml. Después las cajas se guardaron en bolsas de plástico y se incubaron a 30°C de forma invertida, después de 24 horas, se observaron en un microscopio invertido (Zeiss, Mod. D, con oculares 10× y 20×) y en los casos en donde se encontró crecimiento amibiano se cortó un cuadro del cultivo y se recultivaron en medio monoxénico nuevo hasta tener únicamente crecimiento de amibas (Page, 1988; Kilvington *et al*, 1990; Lares, 1990; John, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

**Cultivo axénico.** Una vez que se tuvo purificada la amiba, se cortaron varios cuadros de cultivo de NNE y se colocaron en los diferentes medios axénicos (Chang y Bactocasitona) y se incubaron a 30°C (Page, 1988; Kilvington *et al*, 1990; Lares, 1990; John, 1993; Martínez y Visvesvara, 1997).

### 6.3 Identificación morfológica de las amibas

Se realizaron preparaciones en fresco para observar al microscopio de contraste de fases a 40×, se midieron 50 trofozoítos y 50 quistes, para posteriormente identificarlos de acuerdo al criterio taxonómico de Page (1988).

#### 6.4 Prueba de tolerancia a la temperatura

Se realizó colocando simultáneamente las cepas aisladas a diferentes temperaturas (22, 30, 37 y 42° C) por triplicado cada una, durante 5 días en cajas de vidrio con NNE y *E. aerogenes*, con la finalidad de conocer las temperaturas óptimas de crecimiento y su tolerancia a ellas.

#### 6.5 Prueba de patogenicidad

Se realizó con cultivos axénicos de las amibas. Se inocularon intranasalmente (IN) 0.2 ml de medio de cultivo de la cepa a probar conteniendo especímenes del orden de  $10^3$  a  $10^6$  en ratones blancos machos (Cepa CD-1) de 3 semanas de edad, se colocaron en un lote de cinco ratones (por cada aislamiento amibiano) los cuales se observaron durante 21 días.

Los ratones inoculados que no murieron en el periodo de 21 días se sacrificaron y al igual que a los ratones que murieron durante la prueba, se les extrajo el cerebro, pulmón, hígado y riñón para sembrarse en cajas con agar NNE para recuperar la amiba.

#### 6.6 Prueba de sensibilidad a fungicidas (modificado de Kilvington, 1991)

Las cepas en estudio se hicieron crecer masivamente en tubos conteniendo medios axénicos (medio Chang y Bactocasitona al 2%) enriquecidos con suero neonato de bovino. Se dejaron incubando a una temperatura de 30°C. Se observaron diariamente bajo el invertoscopio (Zeiss, Mod. D, con oculares 10× y 20×) hasta obtener crecimiento del 90% del tubo y la población de trofozoítos de aprox. 80% y un 20% de la población quística.

Una vez crecidas, las amibas se concentraron en un solo tubo de ensaye y se contaron con la ayuda de un hematocitómetro para asegurar una población promedio de 29, 000 a 30,000 cel/ml.

La transferencia a placas de Elisa, se llevó a cabo con una micropipeta de 50-200 $\mu$ l, para depositar en los pozos respectivamente etiquetados, un volumen final de 300 $\mu$ l, conteniendo una cantidad aproximada de 9000 amibas (80% trofozoítos, 20% quistes) (Omaña, 1997).

Se dejaron las placas a temperatura ambiente durante una hora para permitir que las amibas se adhirieran al fondo de éstas. Al finalizar este tiempo se decantó el líquido excedente. Con el invertoscopio a 10× y un hematocitómetro se contaron los trofozoítos adheridos al fondo de los pozos y se adicionaron los antimicóticos Itraconazol y Fluconazol (Anexo I). En las siguientes concentraciones 2.0, 1.0 y 0.5 mg/ml para ambos fármacos por triplicado cada una.

Se manejaron estas concentraciones de Itraconazol de acuerdo a las utilizadas en casos clínicos previos (Omaña, *op cit.*). En cuanto a las dosis de Fluconazol estas corresponden a las que se manejan en casos de infecciones por hongos en el Hospital para evitar la ceguera en México.

Se dejaron incubando por 24 hrs. a 30°C en una cámara húmeda, posteriormente se decantaron las soluciones y se realizaron tres lavados sucesivos con agua estéril para eliminar el residuo del medicamento, se observaron a través del invertoscopio para hacer un registro de las condiciones de los organismos, así también se hizo el conteo de organismos con alteraciones morfológicas. Posteriormente se les colocó medio Chang o Bactocasitona según el caso para restablecer las condiciones ideales para el organismo.

Se incubaron por 24 hrs. y nuevamente se observaron las placas en el invertoscopio para determinar las condiciones de viabilidad.

## **6.7 Isoelectroenfoque (Omaña, 1997; Bonilla, 2000)**

Esta prueba es utilizada para verificar o corregir el diagnóstico realizado a través de los métodos convencionales. Consiste en la formación de un gradiente de pH, este gradiente se establece entre dos electrodos y es estabilizado por anfolitos acarreadores. De tal forma, que las proteínas migran hasta que se alinean por sí mismas en su punto isoeléctrico (pI), en dicho punto una proteína no tendrá carga neta total y por lo tanto se concentrará en este punto y la migración cesará.

### **1) Preparación de muestras**

Se cultivaron las amibas en botellas para cultivo de tejido de 25 cm<sup>3</sup> con 15 ml del medio Chang por tres días a 30 °C o hasta observar una monocapa de trofozoítos, la cual representó alrededor de 10<sup>6</sup> cel/ml.

Se cosecharon las amibas poniendo las botellas durante tres minutos a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  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 amibianas se concentraron por centrifugación a 2500 rpm 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 concentraron nuevamente pero a 3500 g por 10 minutos, se tiró con cuidado el sobrenadante, cuidando que la pastilla quedara intacta.

Se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de Tritón X-100 y la muestra se congeló y descongeló dos veces a  $-20^{\circ}\text{C}$  para lisar las células y liberar su contenido. Cuando este concentrado no se utilizó inmediatamente se guardó hasta 1 mes a  $-75^{\circ}\text{C}$  o en Nitrógeno líquido. Para utilizar los concentrados en isoelectroenfoque, se descongelaron las muestras a  $37^{\circ}\text{C}$ .

## **2) Uso del gel de agarosa.**

El isoelectroenfoque con geles de agarosa IEF (Anexo II) se llevó a cabo vaciando la agarosa IEF (Pharmacia LKB) sobre hojas hidrofílicas de poliéster (gel Bond), se obtuvieron muchos beneficios utilizando los geles de ese modo: fueron fáciles de manejar y no flotaron durante el proceso de fijación y tinción, fueron ópticamente claros para ser observados bajo luz visible, y los geles resultantes fueron almacenados de forma adecuada.

## **3) Preparación del molde.**

Se utilizó una tabla de nivelación perfectamente horizontal, se vaciaron 2 ml de agua destilada a 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 y 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 formaron bajo el gel. Se secó la película y las 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  $75^{\circ}\text{C}$ , se agregó el anfolito (1.9 ml), se mezcló suavemente evitando formar

burbujas y se vació rápidamente de manera uniforme dentro del molde, dejando gelificar la solución por 10-15 minutos.

Se retiró el marco acrílico de la tabla niveladora teniendo cuidado de no dañar el gel y se dejó que la agarosa gelificará completamente por una hora a 4°C.

Se agregaron 2ml 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 bajo éste gel, se quitó el exceso de agua con toallas de papel absorbente.

Se sumergieron los electrodos en las solución del ánodo y cátodo respectivamente. Se secaron los electrodos colocándoles 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 1mm de los extremos. Posteriormente se adicionaron las muestras utilizando los papeles aplicadores de muestra (25 µl).

Se colocó la tapa del equipo de electroforesis y se revisó que existiera un buen contacto entre los electrodos de la tapa y los electrodos colocados sobre el gel, se ajustó la fuente del poder a 15W y 1500V de corriente ilimitada. Se quitaron los aplicadores de muestra después de 45 minutos.

Se dejaron pasar 45 minutos más, se apagó el equipo y se quitaron los electrodos del gel, posteriormente se revelaron los geles en las soluciones correspondientes.

#### 4) Revelado de enzimas.

IZT.

Se colocó el gel en el revelado (Anexo II) de enzima Propionil esterasa (PE), por un periodo de 30 a 60 minutos, 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.



## 5) Revelado de proteínas totales

Se fijó el gel en una solución fijadora ácido sulfosalicílico al 5% y ácido tricloroacético al 10% por 30 minutos, se lavó el gel dos veces (25 minutos cada vez) en una solución desteñidora (Metanol: ácido acético: agua destilada 3:1:6) el gel se secó colocando tres capas de papel filtro sobre su superficie seguida de una placa de cristal y un peso alrededor de 1 Kg, después de 15 minutos se removió todo y el gel se secó con una secadora de pelo.

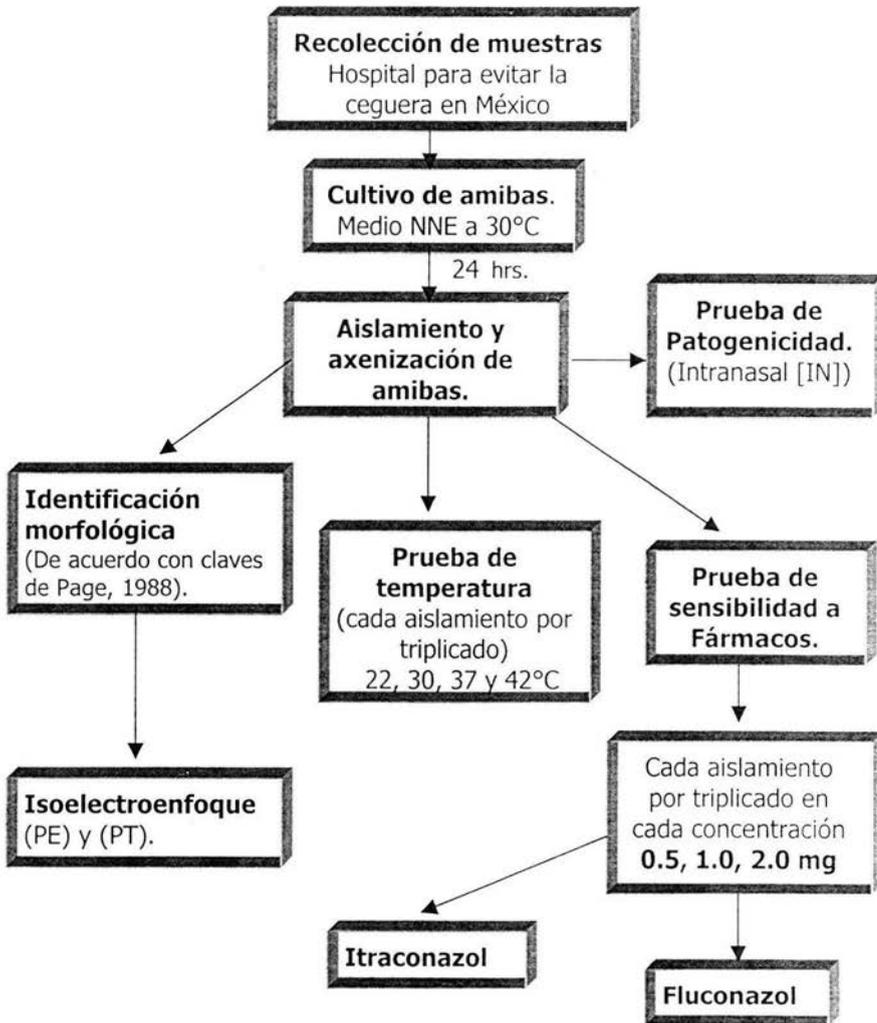
Una vez secado el gel se colocó en una solución de azul de Coomassie al 0.2% por 15 minutos, se desteñó con solución desteñidora hasta que el fondo del gel se vio claro y finalmente se secó la película con una secadora de pelo.

## 6) Análisis de resultados obtenidos del IEF

Para realizar el análisis del Isoelectroenfoque se utilizaron las siguientes cepas de referencia obtenidas de la American Type Culture Collection (ATCC), Culture Collection of Algae and Protozoa (CCAP) y del Catálogo de Colección del Proyecto de Conservación y Mejoramiento del Ambiente (CyMA) de la FES-Iztacala- UNAM.

CEPA	CLAVE DE REFERENCIA
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	AC
<i>A. castellanii</i>	Neff
<i>A. divionensis</i>	AA-1
<i>A. hatchetti</i>	BH2
<i>A. lugdunensis</i>	García
<i>A. lugdunensis</i>	SH-565
<i>A. palestinensis</i>	2802
<i>A. polyphaga</i>	Poly
<i>A. polyphaga</i>	P23
<i>A. quina</i>	L1-a
<i>A. lugdunensis</i>	1AM
<i>A. lenticulata</i>	PD2
<i>A. lugdunensis</i>	EF <sub>2</sub>

Se compararon las bandas obtenidas en los zimogramas y se consideró que si el 80% de bandas estuvieron colocadas en la misma posición eran organismos que podrían pertenecer a la misma especie.



Esquema 1. Diagrama de flujo de la metodología seguida.

## 7. RESULTADOS

Se procesaron 50 muestras de lentes de contacto y 45 soluciones preservadoras, de las cuales se encontraron positivas 3 lentes de contacto de tipo blando (6%) y 2 soluciones preservadoras (4.4%), todas con amibas del género *Acanthamoeba*.

Las amibas aisladas se nombraron como cepas **L** si pertenecían al lente de contacto, después se les colocó el número de muestra, por ejemplo: L3. En el caso de las soluciones preservadoras la nomenclatura fue **LQ** y al igual que con los lentes se le agregó el número de muestra (LQ3).

### 7.1 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

La identificación morfológica se realizó utilizando las claves de Page (1988). Los resultados promedio de las medidas se observan en la tabla 3.

**Tabla 3. Promedios obtenidos en las mediciones realizadas a trofozoítos y quistes de las cepas aisladas.**

CEPA	TROFOZOÍTO (μm)		QUISTE (μm)	DIAGNÓSTICO MORFOLÓGICO
	Ancho	Largo	Diámetro	Género/ especie
L3	14.10	27.33	14.60	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
LQ3	14.41	29.39	14.67	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
L10	15.37	30.73	14.24	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
LQ10	15.34	30.70	15.42	<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
L7	14.20	27.30	15.40	<i>Acanthamoeba castellanii</i>

## 7.2 PRUEBA DE TOLERANCIA A LA TEMPERATURA

La interpretación de los resultados se refiere al porcentaje de amibas crecidas en la superficie de la caja, tomando como un 100% de crecimiento cuando la superficie de la caja estaba totalmente cubierta de organismos. Los resultados obtenidos de las pruebas de tolerancia a la temperatura se muestran en la tabla 4.

**Tabla 4. Prueba de tolerancia a la temperatura de las cepas aisladas de lentes de contacto blandos y soluciones salinas.**

TEMPERATURA	22 ° C	30 °C	37°C	42°
CEPA L3	> 90%	60-80%	50%	0%
CEPA LQ3	> 90%	> 90%	50%	0%
CEPA L10	> 90%	60-80%	20%	0%
CEPA LQ10	> 90%	> 90%	50%	0%
CEPA L7	> 90%	60-80%	60-80%	0%

\* Se evaluó el % de crecimiento con respecto a la superficie de la caja de Petri.

Estos resultados muestran que la temperatura óptima de crecimiento para las cinco cepas aisladas es a temperatura ambiente (22 °C). Sin embargo, los cinco aislamientos presentan tolerancia a 30 y 37 °C, y ninguna crece a 42 °C .

## 7.3 PRUEBA DE PATOGENICIDAD

Las pruebas de patogenicidad se realizaron intranasalmente (IN), los resultados de las pruebas de patogenicidad se observan en las siguientes tablas (5, 6, 7, 8, 9 y 10), donde se muestra el día en que fallecieron los ratones, las amibas recuperadas y el órgano de donde se recuperaron.

Los resultados mostrados en la tabla 5 muestran el comportamiento de las cinco cepas aisladas, en donde se recuperaron las amibas de los cuatro órganos analizados, siendo el pulmón y el cerebro el lugar en donde mayor cantidad de amibas había.

Tabla 5. Prueba de patogenicidad (IN) de los 5 aislamientos

CEPA	ÓRGANOS				RATONES MUERTOS
	Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón	
L3	++++	++++	+++	+++	2/5
LQ3	+++	++++	+++	+++	3/5
L10	+++	+++	+++	++	0/5
LQ10	++++	++++	+++	+	0/5
L7	++++	++++	+++	++	2/5

Gran cantidad de amibas (++++). Cantidad media de amibas (+++)

Poca cantidad de amibas (++) Ninguna amiba (-)

Con estos resultados se puede decir que las cinco cepas son invasivas y potencialmente patógenas y de acuerdo con el criterio de **Jonckheere (1980)**, la cepa LQ3 es invasiva y claramente patógena, ya que mató a 3 de 5 ratones, las cepas L7, LQ3, L10 y LQ10 son invasivas y por lo tanto potencialmente patógenas para el hombre.

En las siguientes tablas se desglosan los resultados obtenidos en cada aislamiento. En la tabla 6 se observa que en la cepa **L3** solo dos ratones fallecieron durante los primeros días de la prueba, de los cuales al procesar sus órganos se recuperaron las amibas inoculadas. Los otros tres ratones fueron sacrificados al término de la prueba (21 días), y al igual que los primeros ratones, se procesaron sus órganos y solo de uno de ellos se recuperaron las amibas.

Tabla 6. Prueba de patogenicidad (IN) de la Cepa L3

Núm. de Ratón	Día de fallecimiento	Órganos			
		Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	7	++++	++++	+++	+++
2	9	++++	++++	+++	+++
3	21*	+++	+++	+++	++
4	21*	---	---	---	---
5	21*	---	---	---	---

\* Se sacrificó al término de la prueba (21 días)

De acuerdo con estos resultados podemos decir que la cepa L3 es invasiva y potencialmente patógena.

En el caso de la cepa **LQ3**, los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7, en esta podemos observar que durante la prueba fallecieron tres ratones, de los cuales se recuperaron las amibas en los cuatro órganos, los últimos dos ratones permanecieron con vida durante toda la prueba por lo que tuvieron que ser sacrificados al término de ésta. En estos últimos ratones no se recuperó ninguna amiba de ningún órgano.

**Tabla 7. Prueba de patogenicidad (IN) de la cepa LQ3**

Núm. de Ratón	Día de fallecimiento	Órganos			
		Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	9	+++	+++	+++	+++
2	12	+++	+++	+++	+++
3	14	++++	+++	+++	++
4	21*	---	----	---	---
5	21*	---	---	---	---

\*Sacrificio a los 21 días

Según los datos obtenidos, podríamos decir que esta cepa es invasiva puesto que se pudieron recuperar las amibas de los órganos analizados y es patógena de acuerdo con el criterio de Jonckheere (1980).

En la tabla 8 se encuentran los resultados de la cepa **L10**, en esta cepa se encontró que ningún ratón falleció en el transcurso de la prueba, por lo que los cinco ratones se sacrificaron a los 21 días, es decir al término de la prueba.

**Tabla 8. Prueba de patogenicidad (IN) en la cepa L10**

Núm. de Ratón	Día de fallecimiento	Órganos			
		Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	21*	---	---	---	---
2	21*	+++	+++	+++	+++
3	21*	++++	++++	+++	++
4	21*	+++	+++	++	++
5	21*	+++	+++	+++	+++

En cuatro de los cinco ratones sacrificados se recuperaron las amibas en los cuatro órganos, en un ratón no se recuperó ninguna amiba en ninguno de los órganos. De acuerdo con los resultados se puede decir que

esta amiba es invasiva ya que se recuperó de mas del 50% de los organismos en estudio.

Durante la prueba de patogenicidad de la cepa **LQ10** se obtuvieron los resultados mostrados en la tabla 9. En el caso de esta cepa, ninguno de los ratones murió dentro de los 21 días que duró la prueba. Los cinco ratones fueron sacrificados al término de la prueba.

**Tabla 9. Prueba de patogenicidad (IN) en la cepa LQ10**

Núm. de Ratón	Día de fallecimiento	Órganos			
		Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	21*	---	---	---	---
2	21*	+++	+++	++	++
3	21*	++++	++++	+++	++
4	21*	+++	+++	++	++
5	21*	---	---	---	---

De dos ratones no se recuperó la amiba de algún órgano; de los tres restantes si se recuperó en los cuatro órganos, encontrándose en menor cantidad en el riñón. Teniendo en cuenta estos datos, se observa que esta amiba es invasiva por lo que es potencialmente patógena.

Por último, en el caso de la cepa **L7** (tabla 10) se observa un comportamiento similar a las cepas L3 y LQ3, en donde solo dos ratones murieron a causa de la infección producida por las amibas inoculadas, los otros tres ratones fueron sacrificados al término del ensayo y de cuatro de estos animales se recuperaron las amibas en los cuatro órganos, encontrándose un crecimiento mayor en el cerebro en comparación con los otros tres órganos.

**Tabla 10. Prueba de patogenicidad (IN) en la cepa L7**

Núm. de Ratón	Día de fallecimiento	Órganos			
		Cerebro	Pulmón	Hígado	Riñón
1	7	++++	++++	+++	+++
2	9	++++	++++	+++	++
3	21*	+++	+++	++	---
4	21*	+++	+++	++	++
5	21*	---	---	---	---

Por tal motivo y de acuerdo con los datos mostrados esta ameba es invasiva ya que se recuperó en más del 50% de los individuos en estudio y potencialmente patógena.

#### 7.4 SENSIBILIDAD A FÁRMACOS

La eficacia de los medicamentos fue evaluada después de 24 hrs. de que se aplicó el fármaco y posteriormente se observó la viabilidad presente si se establecían nuevamente las condiciones óptimas de crecimiento. Los porcentajes mostrados en la tabla 11, hacen referencia al total de organismos inhibidos en su crecimiento.

**Tabla 11. Prueba de sensibilidad a Itraconazol y Fluconazol de las cepas aisladas.**

CEPA	Itraconazol (mg)			Fluconazol (mg)		
	0.5	1.0	2.0	0.5	1.0	2.0
L3	< 50%	> 90%	> 90%	10%	> 50%	> 90%
LQ3	< 50%	> 50%	> 90%	10%	< 50%	> 50%
L10	< 50%	> 90%	> 90%	10%	< 50%	> 50%
LQ10	< 50%	> 90%	> 90%	< 50%	> 50%	> 90%
L7	10%	< 50%	> 90%	10%	> 50%	> 90%

##### a) Itraconazol

En el caso del Itraconazol se inhibió el 90% de la población amibiana en todas las cepas a una dosis máxima de 2.0 mg. En cuanto a los resultados obtenidos en la cepa **L3**, **L10** y **LQ10** se observó que a 1.0 mg también se inhibió el crecimiento del 90% de los organismos, sin embargo en la dosis mínima (0.5 mg) se observó una reducción del crecimiento, pero esta fue menor al 50%.

En la cepa **LQ3** al agregar Itraconazol a una dosis de 1.0 mg la población disminuyó en aproximadamente el 50% de los organismos, y a 0.5 mg (dosis mínima) en menos del 50%.

Por último en la cepa **L7** la dosis mínima de Itraconazol (0.5 mg) no inhibió la presencia de los organismos y a una dosis de 1.0 mg solo se redujo en menos del 50%.

## b) Fluconazol

En el caso de la cepa **L3**, a una dosis de 2.0 mg se inhibió casi en su totalidad la población amibiana, a 1.0 mg el crecimiento disminuyó en más del 50% de los organismos y a una dosis mínima de 0.5 mg no se inhibió la población, por lo que hubo una supervivencia de más del 90%.

En las cepa **LQ3** y **L10**, la dosis máxima de 2.0 mg provocó una disminución poblacional en más del 50% de los organismos, a 1.0 mg en menos del 50% y nuevamente al igual que la cepa anterior a una dosis de 0.5 mg no hubo inhibición alguna.

Por último en las cepas **LQ10** y **L7**, a una dosis de 1.0 mg se presentó una disminución en la población de más del 50% y en el caso de la cepa LQ10 a una dosis de 0.5 mg se presentó una inhibición poblacional en menos del 50% de los organismos, en contraste con la cepa L7 en la cual no existió inhibición alguna, es decir más del 90% de los organismos sobrevivieron. En cuanto a la dosis de 2.0 mg en ambas cepas se inhibió la población en más del 90%.

Es importante mencionar que los cinco aislamientos presentaron comportamientos diferentes, ya que cuatro de ellos crecieron en medio axénico Chang (**L3**, **LQ3**, **LQ10**, **L7**)y uno solamente en medio Bactocasitona (**L10**). Además de que presentaron diferencias en la velocidad de crecimiento y en la respuesta a la prueba de sensibilidad a fármacos.

## 7.5 ISOELECTROENFOQUE

### 7.5.1 Propionil esterasa (pH 3-10)

De acuerdo con los resultados obtenidos con el corrimiento de la Propionil Esterasa (PE) (Fig 5), las 5 cepas aisladas pertenecen al mismo género y especie. Al realizar la comparación de las bandas obtenidas en los cinco aislamientos y las cepas de referencia, y tomando en cuenta que el IEF tiene un 80% de confiabilidad podemos inferir que los 5 aislamientos pertenecen a *A. polyphaga* (Cepa P23).

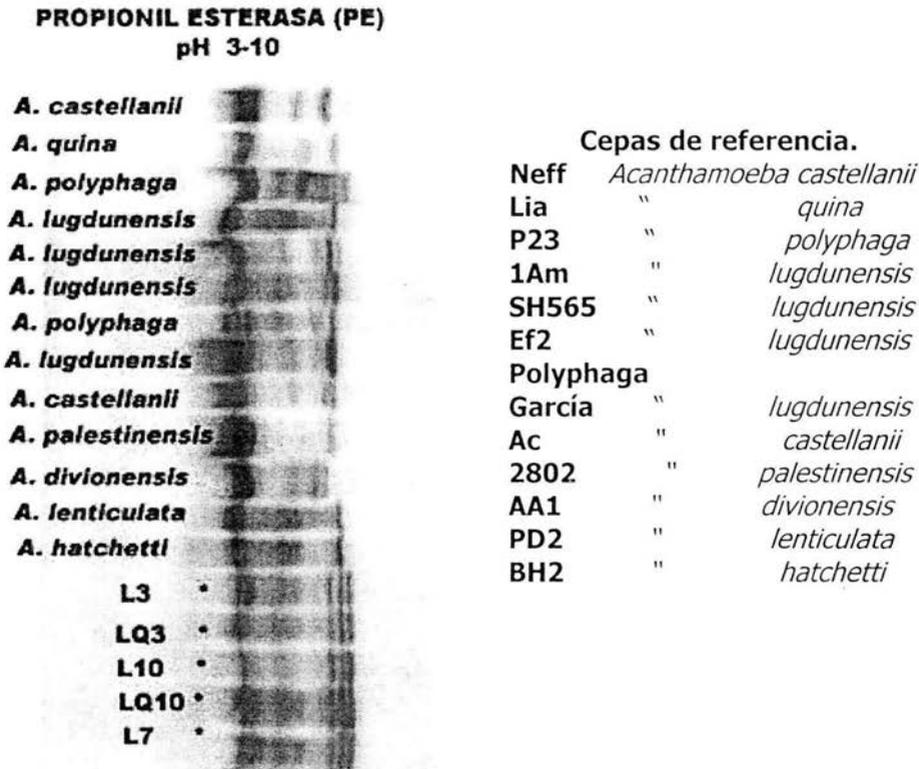


Figura 5. Isoelectroenfoque (PE) realizado a los cinco aislamientos (\*).

### 7.5.2 Proteínas totales (pH 3-10)

Los resultados obtenidos por la técnica de IEF de proteínas totales no fueron de utilidad, debido a que el rango de pH utilizado (3-10) es muy amplio y la saturación de proteínas en el zimograma es demasiada, de tal manera que, no pudieron observarse con claridad las bandas obtenidas, y desgraciadamente no fue posible repetir la prueba por motivos económicos del laboratorio.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la técnica de IEF con la enzima Propionil Esterasa y comparando los resultados obtenidos con la identificación morfológica realizada, se puede observar que hubo algunas diferencias en cuanto a las especies identificadas.

Por último la técnica de IEF demostró que los cinco aislamientos pertenecen al mismo género y especie, y como se observó en los resultados del isoelectroenfoque y el diagnóstico morfológico se sugiere que los cinco aislamientos podrían ser *Acanthamoeba polyphaga* (Cepa P23). Sin embargo, para caracterizar con mayor certeza estos aislamientos es necesario realizar otros corrimientos con diferentes enzimas y en el caso de proteínas totales utilizar un rango de pH menos amplio (5-8).

## 8.- DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 3), y siguiendo los criterios de las claves de Page (1988), todas las cepas aisladas correspondieron al género *Acanthamoeba*, tres de ellas a la especie *polyphaga*, los otros dos a *A. castellanii*, sin embargo, la determinación de *Acanthamoeba* a nivel de especie basándose únicamente en características morfológicas no es suficiente, ni confiable, ya que depende de las observaciones y criterios de la persona que la realice, por tal motivo, es necesario tomar en cuenta los diferentes criterios con los que se cuente: características morfológicas, fisiológicas, de patogenicidad, bioquímicas y si es posible utilizar técnicas más sofisticadas y de mayor precisión (Biología molecular) para caracterizar con mayor certeza la especie problema.

Es importante recalcar que se observaron diferencias fisiológicas entre los cinco aislamientos, por ejemplo, una de las cepas solamente creció en medio axénico Bactocasitona al 2%, mientras las otras cuatro cepas crecieron en medio Chang. Con los datos observados se sigue confirmando que aunque sean organismos del mismo género y especie, sus comportamientos y características no son siempre las mismas y que cada aislamiento responde de manera diferente a los estímulos a los que sea sometido, por lo que no se puede establecer un modelo único fisiológico para las Amibas de Vida Libre (AVL).

En la prueba de tolerancia a la temperatura se encontró que la temperatura óptima de crecimiento para los 5 aislamientos es a 22°C, mientras que a 30 y 37°C se consideraron tolerantes. Es lógico obtener estos resultados, ya que estas AVL al no ser parásitas estrictas, crecen a temperatura ambiente. Sin embargo, en general las AVL patógenas son termófilas (42°-45°C) por lo que se esperaba que las cepas que resultaron patógenas resistieran altas temperaturas, y a pesar de que ninguna cepa toleró más de 37°C, tres (**L3, LQ3, L7**) mostraron ser patógenas además de invasivas, esto es importante ya que significa que son potencialmente patógenas para el hombre.

En la prueba de patogenicidad en general, se recuperaron las amibas de los cuatro órganos, en mayor cantidad en el pulmón y cerebro, lo cual era de esperarse debido a que la vía de entrada de la amiba fue por el tracto respiratorio (intranasalmente). Una de las amibas aisladas mostró ser claramente patógena (**LQ3**), ya que de acuerdo con el criterio de Jonckheere (1980) la amiba inoculada mató a 3 de los 5 ratones durante la

prueba, otras dos cepas la **L3** y **L7** mataron a 2 de 5 ratones y finalmente en las cepas **L10** y **LQ10** no hubo ningún ratón muerto a causa de la amiba inoculada, sin embargo, en todos los casos en uno o más ratones, las amibas inoculadas fueron capaces de sobrevivir y de desarrollarse en varios órganos, por lo que se puede decir que son invasivas y potencialmente patógenas.

Esta prueba se repitió dos veces, y los resultados que se tomaron en cuenta fueron los primeros ya que los obtenidos en la segunda vez presentaban una disminución en la virulencia, es decir, las cepas que la primera vez fueron patógenas en la segunda solo eran invasivas, por lo que se optó por los primeros resultados, ya que estos se obtuvieron inmediatamente después de que se aisló y axenizó la amiba, así que el tiempo que había pasado de su permanencia en lentes de contacto y el cultivo en los medios específicos era relativamente corto, siendo así más factible que la virulencia fuera la misma o similar a la que tendría en su medio natural. Esto coincide con las observaciones hechas anteriormente, en el sentido de que las amibas pierden su virulencia, conforme más tiempo pasen en cultivo axénico (De Jonckheere, 1980). Lo que sugiere que para realizar este tipo de pruebas es importante asegurarse de que la virulencia sea la misma que cuando estas cepas fueron aisladas.

Es necesario aclarar que los resultados de este modelo de patogenicidad se refieren a la capacidad de las AVL de desarrollar una Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG). Esta evaluación de patogenicidad podría ser comparable con la que sería capaz de desarrollar la amiba en el ojo (QA); aunque para esta evaluación la mejor alternativa debió ser la realización de un modelo de QA en conejos, esto no fue posible debido a la dificultad para llevar a cabo esta técnica, además del gasto económico que esto implica.

Por estas razones, los resultados de las pruebas de patogenicidad realizadas indicarían que 3 de los 5 aislamientos serían capaces de desarrollar una QA, Sin embargo, se han realizado aislamientos de amibas en pacientes asintomáticos lo cual puede deberse a diversos factores que influyen en el desarrollo de la infección (Kilvington, 200), tales como:

**Factores predisponentes en el desarrollo de la QA.**

- a) Microlesiones causadas por lentes de contacto
- b) Estado inmunitario del huésped

### **Factores inhibidores en el desarrollo de la QA.**

a) Mecanismos de defensa naturales:

- \*Lisozima
- \*Lactoferrina
- \*Anticuerpo IgA

Por lo que el hecho de encontrar amibas en lentes de contacto o soluciones preservadoras no quiere decir que la enfermedad tenga que desarrollarse.

Desgraciadamente no se pudieron obtener datos de los usuarios de estos LC, ya que eran individuos que acudían por primera vez al hospital y no contaban con un registro o expediente previo, aunado a esta problemática estos pacientes no regresaron a las consultas subsecuentes por lo que su rastreo fue imposible, inmunidad innata en el huésped o que el epitelio corneal ofrece una barrera frente a la penetración de las amibas en el estroma y la consiguiente queratitis (Fulcher y Dart, 1998 *Pág. web*).

Por otro lado, pese a que se han reportado numerosos trabajos demostrando la efectividad de fármacos como el isotionato de propamidina, entre otros, en el tratamiento de la QA, es importante buscar y encontrar fármacos que puedan ser utilizados como una elección alternativa en el tratamiento de la QA, ya que la venta de estos medicamentos se encuentra limitado al Reino Unido. Además de esta problemática, la queratitis por *Acanthamoeba* spp. es de difícil diagnóstico y tratamiento, debido a que el quiste presenta una cubierta parecida a la de los hongos, la cual esta constituida por celulosa (Linder *et al.*, 2001). Por lo que, el conocimiento y la sospecha clínica, junto con la estrecha colaboración con el microbiólogo, es fundamental para la detección precoz de esta enfermedad, ya que el pronóstico esta en función de la rapidez con que se instaura el tratamiento adecuado (López, *et al.*, 2000).

En el caso del tratamiento de la QA, en este trabajo se observó la eficacia de algunos fármacos, sin embargo, es necesario tener en cuenta que hay que modificar la técnica de sensibilidad a fármacos, dependiendo del ensayo que se realice, ya que esta técnica no esta estandarizada y es necesario hacer algunas pruebas con el medicamento solo, combinado con el medio de cultivo y sin medicamento, para tener estos resultados como controles del experimento.

En el caso del Itraconazol, éste mostró ser sumamente efectivo a una dosis de 2.0 mg en todas las cepas aisladas, a 1.0 mg es efectivo en tres de las cinco cepas aisladas y en la dosis mínima de 0.5 mg las cinco cepas presentaron resistencia. Estos indican que una dosis alta sería la más efectiva para combatir la infección, sin embargo, la dosificación y la duración del tratamiento dependería de que tan avanzada esté la infección y la respuesta del individuo al tratamiento. Estos resultados, corroboran los reportados por Omaña (1997), y teniendo en cuenta que este fármaco ya fue utilizado con relativo éxito en los tres casos de QA en México, podría este ser utilizado como un fármaco de elección en el tratamiento de dicha enfermedad.

En el caso del Fluconazol, los resultados que se obtuvieron fueron variados, y se observó que a una dosis máxima de 2.0 mg su efectividad *in vitro* es alta en tres de las cinco cepas aisladas, a una dosis de 1.0 mg su efectividad disminuyó hasta en un 50% y a una dosis de 0.5 mg no se mostró efectividad alguna. Estos resultados indican que este medicamento es efectivo a dosis de 2.0 mg y en algunos casos a 1.0 mg, sin embargo, se requiere realizar estas pruebas *in vivo* para determinar si podría o no ser utilizado como una alternativa en la terapéutica de la QA, ya que este medicamento tiene propiedades farmacológicas especiales, tales como; bajo peso molecular, altamente soluble, buena absorción intestinal y excreción urinaria, es poco tóxico para la córnea, y se cuenta con el antecedente de haber sido utilizado en el tratamiento de la QA en un joven diagnosticado con una queratitis epitelial, la cual a pesar de ser tratada con antibióticos no respondió favorablemente, evolucionando hacia una úlcera corneal. Por lo que se instauró un tratamiento tópico con antibióticos, Clorhexidina, y Fluconazol oral obteniéndose la curación del proceso (Barrio *et al.*, 1999).

Por tal motivo, este fármaco podría ser utilizado como una alternativa, ya que ha sido demostrada su efectividad en el tratamiento de las Queratitis fúngicas (Yee *et al.*, 1997), y tomando en cuenta que a la fecha los fármacos que han tenido éxito en el tratamiento de la QA son anti-micóticos, podría ser el Fluconazol un buen fármaco de elección.

Aunque en la actualidad no se han realizado estudios a fondo sobre la acción de estos fármacos en amibas de vida libre, en el caso de los hongos, ambos (Fluconazol e Itraconazol) actúan alterando la permeabilidad de la membrana celular inhibiendo la síntesis del ergosterol, que es el principal esterol en la membrana (Yee *et al.*, 1993). Por lo que se podría pensar que el mecanismo de estos medicamentos en las amibas es similar.

Finalmente, es importante utilizar técnicas de mayor precisión que se tengan a la mano; como el Isoelectroenfoque (IEF) para confirmar el diagnóstico realizado por los métodos convencionales, y en caso de que no concuerden revisar nuevamente las características morfométricas de los organismos y establecer la posición taxonómica que les corresponda.

En ésta técnica se parte de que cada proteína tiene un punto Isoeléctrico diferente y esto genera una serie de bandas que serán observadas en un zimograma. De acuerdo con los resultados el IE de PE y PT, los 5 aislamientos pertenecen al mismo género y especie. Sin embargo, al comparar las bandas obtenidas de los cinco aislamientos con las cepas de referencia se observaron algunas diferencias, estas variantes se observaron a pesar de haber tenido todos los cultivos bajo las mismas condiciones; Esta variación puede deberse a la heterogeneidad genética presente en el género *Acanthamoeba* en particular la especie *polyphaga* (Jacobson y Neal, 1987). Esta diversidad puede estar determinada por el carácter de ubicuidad presente en las amibas de vida libre, lo que les ha permitido sobrevivir en casi todos los medios ambientes existentes ( Martínez y Visvesvara, 1997).

Aunado a estas características, las cepas de referencia han estado en medios de cultivo específicos desde hace ya varios años, por lo que las condiciones de cultivo, edad, y manipulación de los microorganismos influyen en que una misma especie puede generar o carecer de ciertas bandas, debido a que los organismos pueden alterar su fisiología y formar proteínas que bajo ciertas condiciones sus patrones pueden ser algo diferentes (Pharmacia Fine Chemicals, 1982; De Jonckheere, 1983).

Además de la condición antes mencionada, es importante recordar que existen datos documentados sobre la presencia de algunas bacterias como endosimbiontes de algunos protozoos, tales como, AVL (Fritsche *et al.*, 1993; Abu, 2001; Michel *et al.*, 2001; Todd *et al.*, 2001). Aunque no se han realizado estudios al respecto, es posible que esta característica pueda influir de alguna manera en los resultados que se obtengan en el IEF.

Tomando en cuenta que el muestreo se realizó al azar, es decir, se utilizaron lentes de contacto (LC) y soluciones preservadoras (SP) de pacientes que tenían diversos padecimientos oculares, es importante señalar que el 6% de los LC y el 4.4 % de SP fue positivo para *Acanthamoeba*, lo cual significa que el factor de riesgo podría no ser tan bajo como se piensa. En nuestro país por ejemplo, se tiene conocimiento de 3 casos de QA (Omaña, 1997), esto sugiere que prácticamente pasan desapercibidas.

## 9.- CONCLUSIONES

La incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* observada en este trabajo fue baja. Esto está relacionado con el poco conocimiento del género *Acanthamoeba* como agente causante de QA, por lo que generalmente en el diagnóstico clínico no se buscan estos organismos, y como consecuencia los casos de QA prácticamente pasan desapercibidos.

Para evitar este problema, es importante contar con métodos de identificación más precisos y sobre todo que estén al alcance de cualquier hospital o laboratorio clínico, ya que no se cuenta con un modelo fisiológico y bioquímico de comportamiento de AVL.

Para realizar esta identificación en LC y SP, se deben tomar en cuenta las características fisiológicas que presenten; esto es de vital importancia, por que generalmente en los laboratorios y hospitales dedicados al estudio oftalmológico, no se cuenta con los medios adecuados (infraestructura, personal capacitado y solvencia económica) para utilizar técnicas de mayor precisión, por lo que las pruebas de tolerancia a la temperatura y de patogenicidad se convierten en herramientas básicas para la identificación de estos organismos. Esto debe realizarse tomando en cuenta que cada organismo presenta un comportamiento fisiológico diferente dependiendo de las condiciones de stress a las que este sometido, de esta manera un organismo puede responder de diferentes formas.

Por otro lado, es necesario tomar en cuenta al género *Acanthamoeba* para los diagnósticos diferenciales en las infecciones de queratitis, ya que no sirve de nada el tener conocimiento de estos protozoos, si no se les toma en cuenta al principio del diagnóstico o bien se niega la existencia de estas aunque estén presentes.

También es importante contar con un tratamiento adecuado para la infección, de tal manera que es necesario realizar más investigaciones sobre la utilización del Fluconazol como agente tópico de elección para la QA, ya que como se mencionó en la discusión, los fármacos que han mostrado un mejor resultado en el tratamiento de esta infección no están a la venta en nuestro país, por lo que importante encontrar fármacos alternativos para el tratamiento de esta infección. En el caso del Itraconazol los resultados refuerzan los observados por Omaña (1997). Es importante tener en cuenta que en los casos de QA tratados con Fluconazol e Itraconazol, su utilización ha sido en combinación con otros medicamentos, por lo que hace falta

investigar más sobre los efectos individuales o combinados que se establecen entre ellos.

Es de vital importancia tener presente que existen diversos factores que intervienen en el desarrollo de la enfermedad por lo que la infección tendrá un curso diferente en cada individuo, por tanto su tratamiento dependerá de la respuesta de éste a la terapéutica propuesta.

Finalmente el tratamiento exitoso de la QA depende de varios factores como: el diagnóstico temprano de la enfermedad, éste se logrará solamente si se cuenta con la capacitación del personal médico y de laboratorio sobre la observación de estos protozoos, una vez superado este punto es necesario contar con las herramientas de diagnóstico de las AVL adecuadas para su identificación, tales como: Pruebas de tolerancia a la temperatura, patogenicidad y si se puede técnicas bioquímicas y de biología molecular. Todas estas herramientas son necesarias si se pretende llegar a la identificación más precisa posible de la especie con la que se trabaja, sin embargo, no debe olvidarse que los patrones que presente cada especie pueden ser un poco diferentes de los ya establecidos (De Jonckheere, 1983).

Una vez terminada la identificación se puede establecer un cuadro terapéutico adecuado para el tratamiento de la infección, sin olvidar tomar en cuenta los signos y síntomas que presente el paciente, además del seguimiento y evolución que se observe.

## RECOMENDACIONES

- 1.- Implementar métodos de detección e identificación de AVL en hospitales y/o clínicas oftalmológicas.
- 2.- Se debe tener en cuenta que no existe un patrón de comportamiento fisiológico y bioquímico establecido para estos organismos, por lo que la identificación de AVL debe realizarse utilizando diversos métodos.
- 2.- Aumentar la difusión del conocimiento en la población médica sobre la Queratitis amibiana (QA), sus causas, factores de riesgo, signos y síntomas.
- 3.- Informar a los usuarios de Lentes de contacto sobre las medidas mínimas de higiene que deben tener para evitar el desarrollo de la infección.
- 4.- Realizar mas estudios *in vitro* e *in vivo* sobre los efectos del Fluconazol en el tratamiento de la QA, para determinar si este puede ser utilizado como un fármaco de elección alternativo.
- 5.- Probar la eficacia del Fluconazol en combinación con otros fungicidas o con algunos antibióticos utilizados en el tratamiento de la QA.

IZT.



## 10. REFERENCIAS CITADAS

Anonymous. 1997. Drinking water inspectorate fact sheet *Acanthamoeba*. March. *Fact sheet* 11(1) [pág. Web] <http://www.awwarf.com/newprojects/pathegeons/ACANTHAM.html>

Asbell, P. 1993. *Acanthamoeba* keratitis: There and Back again. *J. Medicine* 60(4):279-382.

Barrio, B., Perena, M<sup>ª</sup>F., Mínguez, E., Bescós, J. y Romano, P. 1999. Ortoqueratología y queratitis por *Acanthamoeba*. *Rev. Esp. Contac.* 4(1).

Bonilla, P. 2000. Heterogeneidad de las amibas de vida libre con potencial patógeno aisladas de la atmósfera de la ciudad de México. Tesis de Doctorado. *Facultad de Ciencias, UNAM*. México.

Byers, T. Laboratory research interest: *Acanthamoeba*. [pág. web] <http://www.biosci.ohio-state.edu/~tbyers/byers.htm>.

De Jonckheere, J. F. 1980. Growth characteristics, cytopathic effect in cell culture, and virulence in mice of 36 type strains belonging to 19 different *Acanthamoeba* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 :681-685.

De Jonckheere, J. 1991. Ecology of *Acanthamoeba*. *Rev. Inf. Dis.*13(5):385-387.

Freeman, A. B. 1980. Microbiología de Burrows. 22<sup>a</sup> edición *Interamericana Mc.Graw Hill*. México, D.F. 1072-1073pp.

Fritsche, T., Gautom, R., Seyedirashtl., Bergeron, D. y Lindquist, T. 1993. Occurrence of bacterial Endosymbionts in *Acanthamoeba* spp. Isolated from Corneal and Enviromental specimens and Contact lenses. *Jour. Clinic. Microb.* 31(5): 1122-1126.

Fulcher, T. y Dart, K. 1998. Queratitis por *Acanthamoeba*. [pág. web]. <http://www.ofthalmored.com/lentes/cap3.htm> (accesado Marzo del 2001).

González, D. 1994. Estudio Biomédico de Queratitis producida por *Acanthamoeba* sp. *Tesis Licenciatura Biología*. UNAM, México. FES Iztacala.

Gray, T.B., Gross, K.A., Cursons, R.T. y Shewan, J.F. 1994. *Acanthamoeba* queratitis: a sobering case and a promising new treatment. *J. Oftamol.* 22(1):73-6.

Jiménez, E. y Vega, M. 1995. La reacción en cadena de la polimerasa para *Acanthamoeba*. *Bioquímica* 2. XX.(79): 294-297.

Jiménez, E., Wong, H y Rentería, H. 1995. Aislamiento de *Acanthamoeba* en lentes de contacto, estuches y soluciones preservadoras de usuarios del departamento de lentes de contacto del Hospital Oftalmológico de Nuestra señora de la Luz. *Rev. Méx. Oftalmol*, Enero- febrero 69(1): 17-19.

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

John, D.T. 1993. Opportunistically Pathogenic Free-living Amebae, In: "Parasitic Protozoa". Julius P. Kreier and John R. Baker. *Academic Press, Inc.* San Diego California U.S.A. 2(3): 143-246.

Kilvington, S. 2000. Through a glass darkly-contact lenses and personal hygiene. *Microbiol. Today.* Mayo(27):66-68.

Kilvington, S., Larking, D., White, D. and Beeching, J. 1990. Laboratory investigations of *Acanthamoeba* Keratitis. *J. Clin. Microbiol.* 28(12):2722-2725.

Kudo, R. 1969. Protozoología, Ed. Continental. Méx, D.F. 905 pp.

Kwait, Y. 2001. Invasión and exploitation of amoebae by *Legionella pneumophila*. IX<sup>th</sup> International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings. Paris, Francia. 339 p.

Lares, F. 1990. Biología y aspectos de patogenicidad de *Acanthamoeba*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 32:71-88.

Larkin, D. and Easty, D. 1991. The relationship of *Acanthamoeba* to external eye-Flora. *Rev. Infec. Dis.*13(5):394-395.

Lasman, M. 1982. The fine structure of *Acanthamoeba astronyxis* with special emphasis on encystment. *J. Protozool.* 29(3):458-464.

Linder, M., Krusnell, J. y Linder Ewert. 2001. Identification of *Acanthamoeba* in clinical and environmental samples using cellulose-binding domains of cellulase as inmunocytochemical marker for cyst wall cellulose. *IX<sup>th</sup> International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings*. Paris, Francia. 339 p.

Lindquist, T. 1998. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea* 17(1):11-16.

López, L., De Fernando, S., Vilar, B., Pérez, J. y Barrón, J. 2000. Queratitis por *Acanthamoeba* spp.: presentación de diez casos. *Mic. Clinic*. Mayo 18(5):229-233.

Martínez, J. A. 1993. Free living Amebas: Infection of the Central Nervous System. *J. of Med.* 60(4): 271-277.

Martínez, J. and Visvesvara, G. 1997. Free-living amphizoic and opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7: 583-598.

Meisler, D. *Acanthamoeba* keratitis. *III Clinical management*. 685-693.

Mergeryan, H. 1991. The prevalence of *Acanthamoeba* in the human environment. *Rev. Inf. Dis.* 13(5):S390-S391.

Michel, R., Hoffmann, R., Schmid, E. y Müller, K. 2001. Isolation of free-living amoebae harbouring eucaryotic microorganisms as endocytobionts. *IX<sup>th</sup> International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings*. Paris, Francia. 339 p.

Omaña, M. M. 1997. Estudio comparativo de tres cepas del género *Acanthamoeba* responsables de los primeros casos detectados de Queratitis amebiana en México. *Tesis de Maestría en Ciencias. UNAM-FES Cuautitlán*. México.166 pp.

Page, F. C. 1988. A new key to Freshwater and soil Gimnamoebidae with instructions for culture. *Culture collection of Algae and Protozoa. England* . 122 pp.

Pearl, M., Visvesvara, G., Martínez, J., Theodore, H., Daggett, P. and Sawyer, K. 1990. *Naegleria* and *Acanthamoeba* infections. *Rev. Inf. Dis.*12 (3): 490-508.

Pharmacia Fine Sweden. 1982. Isoelectric focusing: principles and methods. *Ljungforetagen AB*. Orebo, Sweden. 163 pp.

Rivera, F., Lares, F., Ramírez, E., Bonilla, P., Calderón, A., Rodríguez, S., Ramírez, J., Xóchihua, L. y Guzmán, H. 1989. *Acanthamoeba* spp. en quemaduras infectadas y rinitis. *Rev. Lat-Amér-Microbiol.* 31:137-140.

Thomas, J., Desai, D. and Sahm, D. 1989. Adherence of *Acanthamoeba castellanii* cysts and trophozoites to unworn soft contact lenses. *Amer. J. Oftal.* 108:658-664.

Tood, Melissa., Robinson, Bret. y Saint, Christopher. 2001. Molecular characterisation of bacterial endosymbionts of *Acanthamoeba* sp. *IX<sup>th</sup> International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings*. Paris, Francia. 339 p.

Van, K., Alizadeh, H., Mellon, J., Silvany, R., McCulley, J. and Niederkon J. 1993. The role of contact lenses, trauma, and Langerhans cell in chinese hamster model of *Acanthamoeba* Queratitis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34(6):1937-44.

Velasco, J. y Bermúdez, J. 1996. Estudio comparativo de la flora microbiana en lentes de contacto, en estuches porta lentes y en líquidos de mantenimiento. *ICLC*. Marzo-abril (23):55-58.

Visvesvara, G.S. 1991. Clasification of *Acanthamoeba*. *Rev. Infec. Dis.*13(5):369-372.

Visvesvara, G. 1993. Epidemiology of Infections with Free-Living Amebas and Laboratory Diagnosis of Microsporidiosis. *J. of Med.* 60(4): 283-288.

Visvesvara, G. and Leitch, G. 1998. Can *Acanthamoeba* serve as vector of microsporidia, the causal agents of corneal and disseminated microsporidiosis of humans?. *Proceedings Eighth International Conference On The Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae*. Lennessee, U.S.A. 46 p.

Visvesvara, G., Schuster, F. and Martínez, J. 1993. *Balamuthia mandrillaris*, N.G., N. sp., agent of amebic Meningoencephalitis in humans and other animals. *J. Euk. Microbiol* 40 (4): 504-514.

Visvesvara, G.S. and Stehr-Green, J. 1990. Epidemiology of free-living ameba infections. *J. Protozool.* 37(4):255S-33S.

Wilhelmus, K. and Jones, D. 1991. Introduction: The Increasing importance of *Acanthamoeba*. *Rev. Inf. Dis.*13(5):367-368.

Yee, P., Boone, D. y Rinaldi, M. 1993. Antifungal agents. *III Clinical management.* 249-266.

Yee, R., Cheng, C., Meenakshi, S., Ludden, T., Wallace, J., and Rinaldi M. 1997. Ocular penetration and Pharmacokinetics of topical fluconazole. *Cornea* 16(1):64-71.

## 11. ANEXO

### Anexo I

#### PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

##### \*Medios Monoxénicos.

**Agar no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* (NNE).** Se compone de: 0.12g de NaCl; 0.004g de MgSO<sub>4</sub> :0.004g de CaCl<sub>2</sub> ; 0.142g de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>; 0.136g de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>; 15g de agar bacteriológico; todo aforado a 1 litro de agua destilada. Posteriormente el medio se calienta hasta que comience a hervir agitando frecuentemente. Se colocan aproximadamente 18ml de medio en cajas Petri de vidrio estériles, una vez gelificado el medio se le adicionan 6 gotas de un concentrado de *E. aerogenes* (inactivada por calor\*) y se dejan absorber.

\* Se coloca un inóculo de *E. aerogenes* en cajas Petri con agar nutritivo y se incuban a 37°C durante 24-48 hrs, una vez transcurrido este tiempo se realiza un concentrado de todas las cajas, utilizando agua estéril y una espátula de vidrio. Posteriormente se esterilizaron los concentrados a 15 lb de presión durante 20 minutos.

##### \*Medios axénicos.

**Medio Bactocasitona.** 2 g de Bactocasitona Difco en 100 ml de agua destilada. Se colocan 2.7 ml de medio en tubos de tapón de rosca, antes de utilizarse se agregan 0.3 ml de suero neonato de bovino a cada tubo en condiciones estériles. Se guardan a 4°C hasta su uso.

**Medio PBSGN (Chang modificado).** Sus componentes son: 16.6g de peptona biotriptasa; 2,7g de dextrosa; 0.9g de KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub>; 1.5 de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub>; todo se afora a 1 litro de agua destilada. Se colocan 2.7 ml de medio en tubos de tapón de rosca y se les agrega 0.3 ml de suero neonato de bovino a cada tubo en condiciones estériles y se guardan a 4° C hasta su uso.

### **PREPARACIÓN DEL MATERIAL.**

Todo el material a utilizar se esteriliza incluyendo los medios de cultivo en una autoclave a 121°C y 15 lb de presión durante 20 minutos.

### **PREPARACIÓN DE FÁRMACOS.**

#### **Itraconazol**

Una cápsula de 100mg se disuelve en 10 ml de agua destilada estéril. De ahí se toman los siguientes volúmenes:

Para obtener una concentración de 2mg se tomaron **200**  $\mu$ l

Para obtener una concentración de 1mg se tomaron **100**  $\mu$ l

Para obtener una concentración de 0.5mg se tomaron **50**  $\mu$ l

#### **Fluconazol**

Una cápsula de 100mg se disuelve en 10 ml de agua destilada estéril. De ahí se toma un volumen adecuado para obtener una concentración de 0.5, 1.0 y 2.0 mg.

**200**  $\mu$ l = 2.0 mg

**100**  $\mu$ l = 1.0 mg

**50**  $\mu$ l = 0.5 mg

**Anexo II****ISOELECTROENFOQUE****A) Preparación del gel de agarosa**

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

**B) Revelado de las enzimas****Propionil Esterasa (PE)**

Sal RR de azul rápido.....	100 mg
Amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 5.7*.....	100 ml
$\alpha$ -naftilpropionato al 1% (en acetona al 50%).....	2 ml

\* Amortiguador de fosfatos 0.1 pH 5.7

**Solución 1**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .....	6.875g
Agua destilada.....	250 ml

**Solución 2**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....	2.83 g
Agua destilada.....	100 ml

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