



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
CARRERA DE OPTOMETRÍA**

**Descripción Biológica de *Acanthamoeba griffini*,
Agente Causal de Queratitis Amibiana en México.**

TESIS PARA OBTENER LA LICENCIATURA EN OPTOMETRÍA
QUE PRESENTA A

Sandra Andrea Gabriela Villa Ramírez

Directora de Tesis: M en M. María Dolores Hernández Martínez.

Asesora principal: Dra. Maritza A. Omaña Molina.

Los Reyes, Iztacala, 2016
Estado de México



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.



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.

“No eres una gota en el océano, sino un océano contenido en una gota”

Anónimo.

“El éxito es la capacidad de ir de fracaso en fracaso sin perder el entusiasmo”

Sir. Winston Churchill

“Los seres humanos estamos tan acostumbrados a lo conocido que no nos damos cuenta que nos falta mucho por conocer”

Anónimo.

“Sin laboratorios los hombres de ciencia son como soldados sin armas”

Louis Pasteur

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como la oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”.

Albert Einstein.

“This is not the end. It is not even the beginning of the end. But it is, perhaps, the end of the beginning...”

Sir. Winston Churchill

“No os dejéis corromper por un escepticismo estéril y deprimente; no os desalentéis ante la tristeza de ciertas horas que pasan sobre las naciones. Vivid en la serena paz de los laboratorios y las bibliotecas. Preguntaos primero: ¿Qué he hecho por instruirme? y, después, al ir progresando. ¿Qué he hecho por mi patria? Hasta que llegue el día en que podáis sentir la íntima satisfacción de pensar en que de alguna manera habéis contribuido al progreso y bienestar de la humanidad”.

Louis Pasteur.

Agradecimientos

A las mujeres más importantes en mi vida mi mamá y mi hermana gracias por alentarme a seguir, por creer en mí, soportar mi estrés y desesperación, sobretodo por ayudarme a perseguir mis sueños

A mi papá Luis por todo tu apoyo y creer en mi

A mi papá Jorge estés donde estés gracias por todo.

A mi hermano Victor y a Rodolfo gracias

A mi tío Ale, Miros y mis primos.

A Israel gracias por apoyarme, soportar un poco mi estrés y estar a mi lado, Aheri.

A Elizabeth y Betty gracias por ser incondicionales y por esa gran amistad.

A David gracias por tu apoyo dentro y fuera del laboratorio.

A mi directora de Tesis la M. en M. María Dolores y mi asesora principal la Dra. en C. Maritza Omaña gracias por su paciencia y sus enseñanzas.

Al Tec. Luis Fernando González Sánchez, al M. en C. Arturo Calderón, a la Dra. en C. Elvia Gallegos y a la M. en C. Elizabeth Ramírez Flores por su apoyo en el laboratorio

A las técnicas académicas Miriam Romero Grijalva y Ana Chávez Sánchez gracias por su ayuda.

A las profesoras Bertha Hashimoto, Concepción Salgado y al Dr. Fernando Zavaleta por sus comentarios para este trabajo.

Gracias a todos por formar parte de mi vida y estar a mi lado.

ÍNDICE

1. Antecedentes	1
1.1 Amibas de vida Libre	1
1.1.1. <i>Acanthamoeba</i> spp.	1
1.1.1.1. Ciclo de vida	2
1.1.1.2. Trofozoíto	2
1.1.1.3. Quiste	3
1.1.1.4. Taxonomía del género <i>Acanthamoeba</i>	4
1.1.1.5. Ecología	6
1.1.1.6. Importancia médica	6
1.2. Queratitis amibiana	7
1.2.1. Cuadro clínico de la QA	7
1.2.2. Fisiopatología de la QA	8
1.2.2.1 Adhesión epitelial y descamación	8
1.2.2.2 Invasión estromal	8
1.2.2.3 Neuritis	8
1.2.3. Diagnóstico	9
1.2.4. Tratamiento	9
1.2.5. Epidemiología	10
2. Justificación	11
3. Objetivos	13
3.1. Objetivo general	13
3.2. Objetivos particulares	13
4. Material y métodos	14
4.1 Cultivo amibiano	14
4.2 Temperatura óptima de crecimiento	14
4.3 Descripción morfológica de la amiba en estudio	14
4.4 Prueba de patogenicidad en ratones	14
4.5 Determinación del efecto citopático sobre células MDCK	15
5. Resultados.	16
5.1 Cultivo amibiano	16

5.2 Temperatura óptima de crecimiento	18
5.3 Descripción morfológica de la amiba en estudio	19
5.4 Prueba de patogenicidad en ratones	20
5.5 Determinación del efecto citopático sobre células MDCK	22
6. Discusión	24
7. Conclusión	28
8. Referencias	29
9. Anexos	36

Descripción biológica de *Acanthamoeba griffini*, agente causal de queratitis amibiana en México

1. ANTECEDENTES

1.1 Amibas de vida libre

Las Amibas de vida libre (AVL) son un amplio grupo de protozoos cosmopolitas. Dentro de todas las especies descritas hasta el momento, solo algunas llegan a actuar como parásitos para el ser humano y animales, a éstas se les denomina amibas anfitriónicas; en donde la fase exoica corresponde a la de vida libre, participando como depredadores que controlan las poblaciones bacterianas en el suelo (Rodríguez-Zaragoza, 1994), la fase endoica se presenta cuando actúan como parásitos tanto para el ser humano o animales.

A principios del siglo XX se pensaba que las AVL se encontraban solamente en el suelo; posteriormente a través de diferentes estudios se demostró que estos microorganismos se encontraban también en el agua y podían dispersarse a través de ésta y del aire.

Los géneros de AVL con importancia médica son: *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia* y *Acanthamoeba*.

En este trabajo nos avocaremos al género *Acanthamoeba*, agente causal de la queratitis amibiana (QA).

1.1.1 *Acanthamoeba*

El género *Acanthamoeba* debe su nombre a los finos pseudópodos en forma de espinas que emite el trofozoíto a lo largo de su cuerpo, denominados acantópodos (acanthos = espinas).

1.1.1.1 Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp.

Las amibas del género *Acanthamoeba* tienen dos estadios en su ciclo de vida, uno trófico activo que se reproduce por fisión binaria y uno quístico que se mantiene inactivo con un metabolismo bajo pero viable incluso por años (Khan, 2009). Ambas fases pueden observarse en la naturaleza y en tejidos infectados (Fig.1).

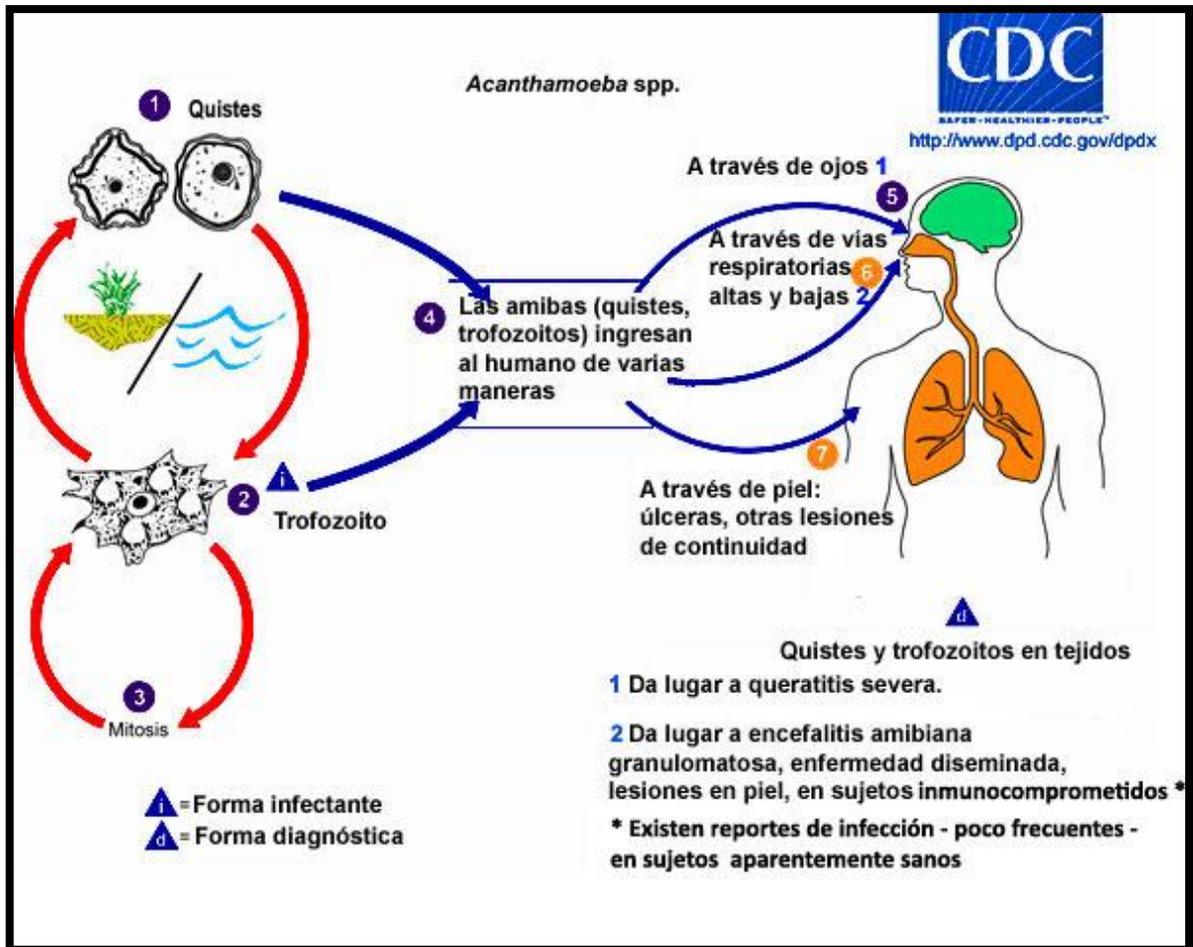


Fig.1. Ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. (CDC. Traducidos al español).

1.1.1.2 Trofozoíto

Los trofozoítos son pleomórficos, tienen un tamaño que comprende entre 15-50 μm , se caracterizan por presentar proyecciones a lo largo de su cuerpo llamados acantópodos, necesarios para desplazarse y adherirse. Es distintiva la presencia de vacuolas contráctiles (Fig. 2). El estadio de trofozoíto requiere de condiciones

óptimas para su desarrollo: abundante comida, pH neutro, temperatura y humedad apropiada (Visvesvara *et al.*, 2007).

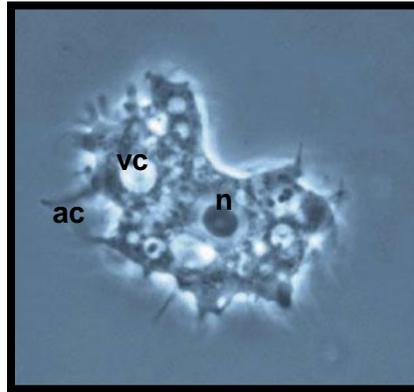


Fig. 2. Trofozoíto de *Acanthamoeba* sp. (vc) vacuola contráctil, (ac) acantópodos y (n) núcleo (Fundación Bioquímica Argentina).

1.1.1.3 Quiste

Cuando el ambiente es adverso o deficiente de alimento se induce la transformación de trofozoíto a quiste (Neff y Neff, 1969; Band y Mohrlök, 1973). El quiste tiene una doble pared conformada por un ectoquiste y un endoquiste, que mide entre 13-20 μm y varía de especie a especie (Bowers y Korn, 1969) (Fig.3); las condiciones ambientales adversas que promueven el enquistamiento son: escasez de alimento, desecación, cambios de temperatura y pH (Bowers y Korn, 1969; Chagla y Griffiths, 1974; Byers *et al.*, 1980). Los quistes son resistentes a biocidas, cloración y antibióticos (De Jonckheere y Van de Voorde, 1976; Khunkitti *et al.*, 1998; Turner *et al.*, 2000; Lloyd *et al.*, 2001) y pueden sobrevivir a bajas temperaturas (0 a 2°C) (Brown y Cursons, 1977). Cuando las condiciones del entorno son favorables, el trofozoíto emerge a través de los opérculos y los quistes quedan vacíos (Page, 1967).

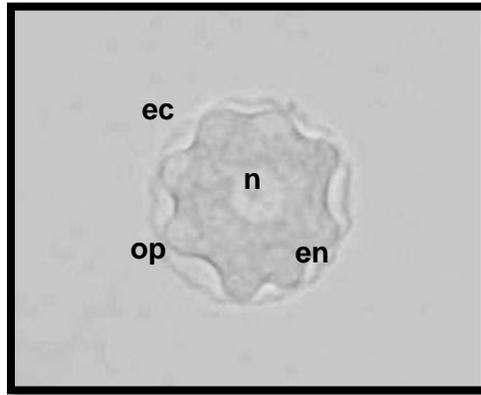


Fig. 3. Quiste de *Acanthamoeba* sp. (ec) ectoquiste, (en) endoquiste, (n) núcleo y (op) opérculo (Pérez-Pomata *et al.*,2005).

1.1.1.4 Taxonomía del género *Acanthamoeba*

A lo largo de los años la clasificación de *Acanthamoeba* ha cambiado, siendo hasta 1977 cuando Pussard y Pons organizaron las especies del género en 3 grupos con base en la morfología del quiste; posteriormente Page, en 1988 utiliza también este criterio de clasificación en sus claves taxonómicas. A continuación se describen las características generales de estos grupos:

Grupo I. Las especies ubicadas en éste no son relevantes en el área médica ya que carece de representantes patógenos y no crecen a 37 °C. Dificilmente crecen en medios axénicos, la forma del endoquiste es en estrella y el ectoquiste es más o menos redondeado; estas amibas tienen un quiste entre 16 a 30 µm (Fig.4). Las especies que forman este grupo son: *A. astronyxis*, *A.comandoni*, *A. echinulata* y *A. tubiashi*

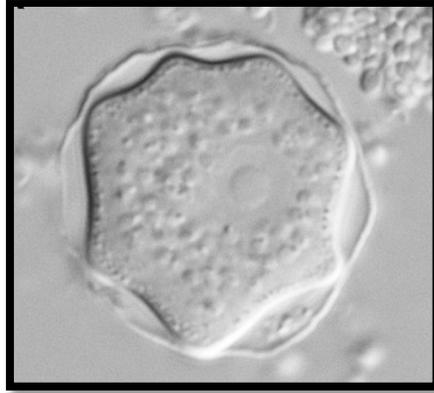


Fig.4. Quiste de *Acanthamoeba* perteneciente al grupo I (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Grupo II. A este grupo pertenecen la mayoría de las especies de *Acanthamoeba* de importancia médica; el endoquiste presenta una forma poligonal o estrellada, el quiste mide 18 μm o menos (Fig.5). Las especies que conforman este grupo son: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. rhyodes*, *A. griffini*, *A. mauritaniensis*, *A. lugdunensis*, *A. quina*, *A. divionensis*, *A. hatchetti* y *A. triangularis*.

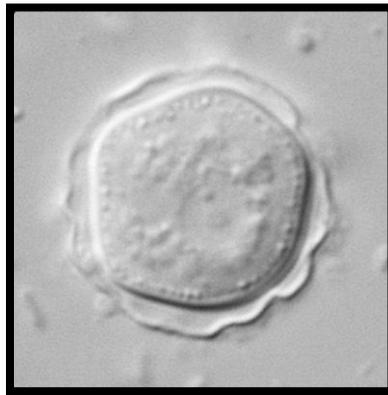


Fig.5. Quiste de *Acanthamoeba* perteneciente al grupo II (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Grupo III. El ectoquiste de estas especies es muy delgado, el endoquiste es más o menos redondeado, no presenta brazos, y las paredes están muy juntas entre sí

(Fig.6). Los quistes miden 18 μm o menos (Visvesvara *et al.*, 2007). Las especies que forman este grupo son: *A. palestinensis*, *A. culbertsoni*, *A. lenticulata*, *A. royreba* y *A. postulosa*.

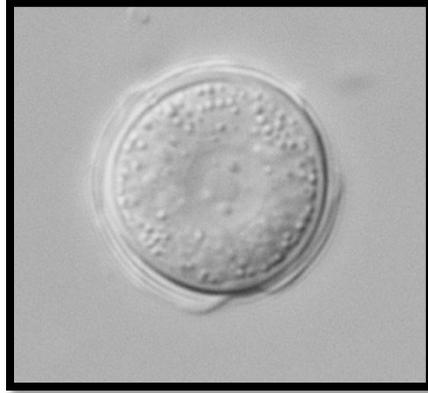


Fig.6. Quiste de *Acanthamoeba* perteneciente al grupo III (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Actualmente este género se clasifica genotípicamente por medio de la secuenciación nuclear de la región DF3 18S rRNA. Basándose en esta secuencia se han reconocido 20 grupos (T1 a T20) (Corsaro *et al.*, 2015). Cabe resaltar que la mayoría de los aislados patógenos pertenecen al grupo T4.

1.1.1.4 Ecología

Acanthamoeba spp., viven en un amplio rango de ambientes, y actúan como pequeños depredadores controlando poblaciones bacterianas.

Es un género frecuentemente aislado del suelo (Rodríguez-Zaragoza, 1994), llegando a sobrevivir en hábitats acuáticos (Arias-Fernández *et al.*, 1989; Sawyer, 1990; Sawyer *et al.*, 1992).

1.1.1.5 Importancia médica

Algunas especies del género *Acanthamoeba* están asociadas a infecciones en piel, problemas en hígado, neumonía, fallas renales, rinitis, faringitis, siendo las

patologías que provoca en sistema nervioso central (encefalitis amibiana granulomatosa) y en ojo (queratitis) las más relevantes en el área médica (Martínez, 1987).

Es importante resaltar que *Acanthamoeba* spp., son reservorios de algunas bacterias patógenas para el ser humano, como *Legionella pneumophila*, (Rowbotham, 1980), *Escherichia coli* O157 (Barker *et al.*, 1999), *Coxiella burnetii* (La Scola y Raoult, 2001), *Pseudomonas aeruginosa* (Michel *et al.*, 1995); *Vibrio cholerae* (Thom *et al.*, 1992), *Helicobacter pylori* (Winiecka-Krusnell *et al.*, 2002), *Simkania negevensis* (Kahane *et al.*, 2001), *Listeria monocytogenes* (Ly y Muller, 1990) y *Mycobacterium avium* (Krishna-Prasad y Gupta, 1978; Steinert *et al.*, 1998).

1.2 Queratitis amibiana

La queratitis por *Acanthamoeba* (QA) es una patología ocular de curso crónico y de difícil resolución, comúnmente asociada al uso de lentes de contacto. Esta infección es frecuentemente mal diagnosticada, confundiéndose con una queratitis herpética o micótica. Hasta el momento no existe un tratamiento farmacológico de elección que resuelva favorablemente esta patología.

Comúnmente solo un ojo es el afectado, sin embargo, se han reportado casos de queratitis bilateral (Visvesvara *et al.*, 2007).

1.2.1 Cuadro clínico de la QA

Las manifestaciones clínicas de la QA comienzan con enrojecimiento, epífora, hiperemia conjuntival, sensación de cuerpo extraño, dolor y fotofobia. Las irregularidades epiteliales y opacidades suelen observarse pero no son signos específicos de esta patología. Las pseudodendritas representan uno de los primeros signos de QA. En esta etapa las lesiones pueden ser similares a las relacionadas con queratitis por Herpes simplex (Prasher *et al.*, 2004). Casos de

endofthalmitis por *Acanthamoeba* son extremadamente raros (Clarke *et al.*, 2005).

1.2.2 Fisiopatología de la QA

Hasta la fecha son pocos los trabajos que se han realizado para conocer la fisiopatología de la QA, a pesar de ello se sabe que la adherencia, migración y penetración en el tejido corneal son los procesos iniciales de la invasión amibiana.

1.2.2.1 Adhesión epitelial y descamación

Se ha observado como la amiba se adhiere al epitelio sano sin algún traumatismo previo (McLaughlin *et al.*, 1991), se cree que glicoproteínas y glucolípidos presentes en el epitelio corneal humano interactúan con una glucoproteína transmembranal de unión a manosa de 136 kDa expresada en *Acanthamoeba* (Nieder Korn *et al.*, 1999). *Acanthamoeba* se adhiere también a colágeno tipo 1. Los trofozoítos son capaces de penetrar y migrar a través de las células epiteliales, lo cual causa una rápida descamación a través de cuatro mecanismos: efecto mecánico, ruptura de uniones celulares del epitelio corneal, fagocitosis e inducción a la apoptosis (Clarke *et al.*, 2012; Omaña-Molina *et al.*, 2013).

1.2.2.2 Invasión estromal

Además, se han descrito una combinación de enzimas secretadas por los trofozoítos que le permiten penetrar la matriz extracelular en el estroma, formando un infiltrado en forma de anillo visto en este tipo de infecciones (Clarke y Nieder Korn, 2006).

1.2.2.3 Neuritis

Se ha demostrado también que los trofozoítos inducen apoptosis a las neuronas corneales, causando un signo clínico de neuritis radial. (Clarke *et al.*, 2005).

1.2.3 Diagnóstico

El diagnóstico de QA debe ser considerado cuando las úlceras corneales crónicas no responden al tratamiento con antibióticos. Sin embargo, las infecciones oculares producidas por *Acanthamoeba* son difíciles de diagnosticar ya que estas se pueden confundir con lesiones producidas por el virus del Herpes simplex, *Pseudomonas aeruginosa* o infecciones por hongos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003).

La biopsia corneal ha sido utilizada para identificar quistes o trofozoítos en algunos casos, ya que los raspados corneales suelen tener resultados negativos (Marciano-Cabral y Cabral, 2003); actualmente en países como Gran Bretaña y Estados Unidos se utiliza también la microscopía confocal y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tu *et al.*, 2008; Yera *et al.*, 2007; Lehmann *et al.*, 1998; Mathers *et al.*, 2000)

1.2.4 Tratamiento

Debido a que el diagnóstico es difícil y el tratamiento tardío, en la mayoría de los casos puede haber pérdida del tejido corneal. Además, si las infecciones por *Acanthamoeba* no son tratadas oportunamente, el microorganismo puede continuar su invasión hacia el estroma corneal llegando al endotelio.

Una variedad de fármacos han sido utilizadas en esta enfermedad incluyendo clorhexidina, polihexametileno biguanida, isetionato de propamidina, isetionato de dibromopropamidina, neomicina, paromomicina, polimixina B, clotrimazol, ketoconazol, miconazol e itraconazol (Schuster y Visvesvara, 2004). En Gran Bretaña se ha utilizado un medicamento oftálmico que contiene como ingrediente activo isetionato de propamidina e isetionato de dibromopropamidina este es considerado un tratamiento efectivo para las infecciones por *Acanthamoeba*, aunque puede provocar intoxicación o desarrollar resistencia (Visvesvara *et al.*, 2007).

1.2.5 Epidemiología de la QA

Los primeros dos casos de QA fueron reportados en Gran Bretaña; posteriormente estos aislados fueron identificados como *A. polyphaga* y *A. castellanii*, respectivamente (Nagington, 1975). El primer caso de QA en EUA fue reportado en Texas en un paciente masculino de 41 años de edad con traumatismo corneal y expuesto a agua contaminada (Jones *et al.*, 1975). En la siguiente década aumentaron significativamente los casos de QA, atribuido al aumento en el uso de lentes de contacto y mala higiene.

En estudios recientes alrededor del mundo se ha observado un aumento en el número de casos de esta infección, reportándose entre 17 y 70 casos de QA por un millón de usuarios de lentes de contacto (Ku. *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2009; Verani *et al.*, 2009; Tu y Joslin, 2010), sin embargo, el número total de casos de QA alrededor del mundo es difícil de establecer (Visvesvara *et al.*, 2007; Siddiqui y Khan, 2012).

La QA se relaciona en el 85% de los casos con el uso de lentes de contacto en personas sanas o que practiquen algún deporte acuático (Kilvington *et al.*, 1990; Martínez y Visvesvara, 1997); 13% se asocia a traumatismos corneales y el 2 % no hay razón aparente (Visvesvara y Sterh-Green, 1990; John, 1993).

Los mismos lentes de contacto pueden provocar un trauma mecánico sobre la córnea lo que favorece la invasión y destrucción del epitelio (Badenoch, 1991; Martínez y Visvesvara, 1997).

En la India se han reportado 38 casos no relacionados con el uso de lentes de contacto, estos se asociaron a traumas y contacto directo con agua contaminada con los microorganismos (Sharma *et al.*, 2000).

Se han identificado 8 especies que provocan QA: *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. rhyodes*, *A. quina*, *A. griffini*, *A. lugdunensis* y *A. culbertsoni* (Moore *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1987; Bacon *et al.*, 1993; Schaumberg *et al.*, 1998.), siendo *A. castellanii* y *A. polyphaga* las más comunes en producir esta patología.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad en México y en muchos países del mundo se desconoce la incidencia real de la QA. Es probable que en algunos lugares estas amibas anfizoicas no se relacionen dentro del diagnóstico en esta infección. Por tanto no solo hay un desconocimiento en los datos epidemiológicos de la QA, sino que tampoco se conocen con precisión las especies amibianas responsables de estos casos clínicos.

De los casos de QA reportados en México a través de un trabajo conjunto entre la FES Iztacala y el Hospital Asociación para Evitar la Ceguera en México, es la primera vez que se presenta un caso en donde el agente causal es *A. griffini*, una especie asociada solamente una vez como agente causal de QA. Por lo que no solo es importante reportar los casos de QA que se presentan en nuestro país, sino también determinar las especies amibianas responsables de estos, sus características biológicas, y su potencial patógeno en el modelo murino de encefalitis amibiana granulomatosa (EAG).

Presentación del caso.

Paciente femenino de 30 años de edad usuaria de lentes de contacto la cual refirió dolor ocular agudo en ojo derecho, discomfort, epífora e hiperemia conjuntival de dos meses de evolución. Inicialmente la paciente fue tratada con moxifloxacina 0.5%, netilmicina 0.5%, natamicina 5%, polimixina 0.3% sin una dosis prescrita, y gotas oftálmicas de atropina 1% para la midriasis.

En la consulta en el Hospital Asociación para evitar la ceguera en México, al examen con la lámpara de hendidura se observó una úlcera corneal central de 4 × 5 mm con bordes bien definidos y depósitos subepiteliales, reacción ciliar ++, hiperemia conjuntival, y con una presión intraocular normal tomada por medio de tonometría digital. La agudeza visual estaba limitada a los movimientos de la mano. En el laboratorio se tomaron muestras de la úlcera corneal y de los lentes de contacto, se sembraron en agar sangre, agar chocolate, agar Sabouraud y Emmons y medio de cultivo no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes*

viva (NNE) y se incubaron a 30 °C en búsqueda de bacterias, hongos y *Acanthamoeba*. El tratamiento se continuó con moxifloxacin 0.5 y, netilmicina 0.3% cada hora, natamicina 5% cada 2 h y gotas oftálmicas de atropina 1% cada 8 h fueron prescritas para midriasis.

Después de 2 días de incubación los medios de cultivo de ambos lentes de contacto fueron positivos a *Flavimonas oryzihabitans*, *Klebsiella oxytoca*, *Corynebacterium aquaticum*, *C. bovis*, *C. pseudotuberculosis* mostrando todas susceptibilidad a los fármacos prescritos. El resultado de laboratorio más sobresaliente fue la presencia de amibas del género *Acanthamoeba* en la muestra de córnea; por esta razón se adicionó al tratamiento gotas oftálmicas de clorhexidina 0.02 % cada 2 h durante 10 días.

Transcurrido este tiempo, la paciente ya no refirió dolor y en la lesión corneal había epitelización; se identificó en el lugar de la úlcera un absceso de 3.5 × 4.5 mm. Se indicó continuar el tratamiento con clorhexidina cada 4 horas hasta la próxima cita. Diez días después se suspendieron las gotas de natamicina considerando que el laboratorio refirió negativa una infección fúngica, observándose una lesión corneal estable de 1.3 × 3.6 mm, con una presión intraocular de 11 mm Hg. La remisión de la infección a este tratamiento confirmó la importancia de estas amibas como agente causal de la queratitis en este caso clínico.

El último tratamiento fue mantenido 30 días más, y en la siguiente consulta la córnea estaba transparente, detectándose solo un defecto en la zona de la lesión, un leucoma central corneal y una agudeza visual de 20/200 y corregida a 20/100; un mes después de la última consulta la agudeza visual final del paciente fue de 20/150 y corregida a 20/70, las queratometrías finales fueron 36.25 a 0° x 42.50 a 90°D.

Finalmente se sugirió una queratoplastia para mejorar la agudeza visual.

La toma de muestra y el manejo de la paciente se realizaron siguiendo las normas del Comité de ética del Hospital Asociación para evitar la ceguera en México I.A.P. "Dr. Luis Sánchez Bulnes".

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Descripción biológica de *Acanthamoeba griffini* aislada de un caso de Queratitis Amibiana en México.

3.2 Objetivos particulares

Cultivar en medio axénico la amiba en estudio.

Determinar su temperatura óptima de crecimiento.

Describir morfológicamente la amiba en estudio.

Evaluar la patogenicidad de la amiba en el modelo murino de Encefalitis Amibiana Granulomatosa (EAG)

Evaluar el efecto citopático de la amiba sobre monocapas de células epiteliales de riñón de perro (Madin Darby Canine Kidney -MDCK).

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1 Cultivo amibiano. Las amibas se recibieron en el medio monoxénico no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* (NNE) (Anexo 1). A partir de estos cultivos se transfirieron trozos de agar de aproximadamente 1 cm², que contenían abundantes trofozoítos, a los medios axénicos: Bactocasitona al 2% y Chang modificado, enriquecidos con suero fetal bovino al 10% y antibiótico al 1% (Anexo 2). Se revisaron los cultivos diariamente durante 7 días utilizando un microscopio invertido para verificar su crecimiento.

4.2 Temperatura óptima de crecimiento. Una vez axenizada la cepa en estudio, se realizaron curvas de crecimiento a 25, 30 y 37 °C, este procedimiento se hizo después de sembrar 5×10^4 trofozoítos, en tubos de borosilicato de 13 × 125mm, y dar seguimiento a los cultivos durante una semana (Anexo 3); el conteo diario de las amibas se realizó en la cámara de Neubauer (Anexo 4), cada temperatura se evaluó por triplicado.

4.3 Descripción morfológica de la amiba en estudio. Se observaron trofozoítos y quistes en preparaciones en fresco tanto de cultivos monoxénicos como axénicos utilizando un microscopio de contraste de fases; se describieron las características de ambos estadios y se determinó su tamaño promedio midiendo 50 quistes y 50 trofozoítos.

4.4 Prueba de patogenicidad en ratones. Para comprobar la patogenicidad y determinar la virulencia de las amibas se utilizó el modelo murino de encefalitis amibiana granulomatosa. Se trabajó con un lote de 5 ratones machos de 3 semanas de edad de la cepa CD-1 los cuales se inocularon por vía intranasal con 1×10^6 amibas en 20µl del medio. Los animales se monitorearon por 21 días y como no presentaron signos de infección, se sacrificaron. Se extrajo cerebro, pulmón, hígado y riñón, se depositaron en cajas Petri con medio NNE y se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento amibiano durante 7 días. Diariamente se observaron bajo el microscopio invertido en busca de trofozoítos

que hubieran invadido estos órganos (Anexo 5).

Se trabajó acorde a las normas éticas preestablecidas en la NOM-062-ZOO-1999 y con el aval de la Comisión de Ética de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala: los ratones se mantuvieron en cajas de policarbonato con tapa y filtro, de tamaño estándar (especial para ratones), con alimento y agua potable a libre acceso; a temperatura y condiciones de luz y obscuridad de acuerdo a la misma norma oficial, apartado 5.

Para la inoculación los ratones se anestesiaron en una atmósfera de isoflurano, y se sacrificaron en cámara de CO₂. NOM-062-ZOO-1999, apartados 9.4.1.2 y 9.4.1.3, respectivamente.

Los cadáveres se colocaron en bolsas de color amarillo de polietileno etiquetadas como RPBI, norma NOM-087-SSA1-2002, y se entregaron al bioterio de la FES Iztacala, para su disposición final, como se menciona en la norma NOM-062-ZOO-1999, en el apartado 6.2.3.4.

4.5 Determinación del efecto citopático sobre células MDCK. Se trabajó con el cultivo de células de riñón de perro: Madin Darby Canine Kidney (MDCK), para determinar si las amibas podían provocar un efecto citopático en monocapas de estas células; para lo cual se colocaron sobre éstas 5×10^4 amibas en cada pozo en una relación de 1:1 en medio Bactocasitona-D-MEM, previa determinación del medio idóneo, la interacción se llevó a cabo durante 1, 3, 6 y 24 horas. Transcurrido cada uno de los tiempos se agregaron 5 µl de una solución de azul tripano y se observaron al microscopio invertido en busca de algún efecto (Anexo 6). Los pozos se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS 0.1 M y se realizó el registro fotográfico de los mismos. La determinación se realizó por sextuplicado.

5. RESULTADOS

5.1 Cultivo amibiano.

La descripción de la cepa en estudio se llevó a cabo a partir de un cultivo monoxénico de más de tres semanas, con el propósito de tener quistes maduros (Fig. 7).

La descripción de las amibas se realizó a partir de un cultivo axénico con una población trófica en fase exponencial de crecimiento (Fig. 8).



Fig. 7. Microscopía de luz 40x. Cultivo amibiano en medio NNE. Se observan quistes maduros sobre la superficie del agar con endociste angular y ectociste con una superficie rugosa.

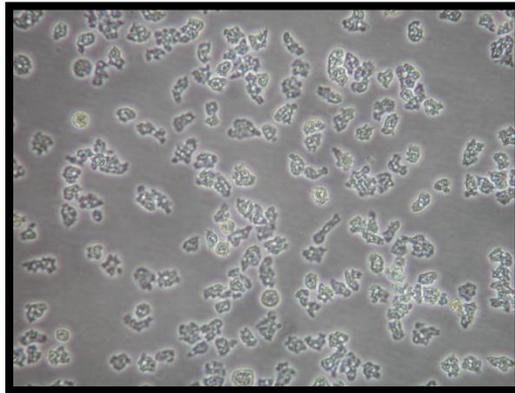


Fig. 8. Microscopía de luz 20x. Cultivo amibiano en medio Bactocasitona al 2 %, en fase exponencial de crecimiento. Se muestran abundantes trofozoítos adheridos a la superficie de las botellas de cultivo celular.

5.2 Temperatura óptima de crecimiento

Se graficaron los promedios del número de trofozoítos contados por cada día de cultivo (en total se hicieron conteos por 5 días) (Fig. 9). En todas las temperaturas se observó que el crecimiento exponencial se registró a las 72 horas.

Se determinó la temperatura óptima a los 25 °C. En menor proporción crecieron a 30 °C. El menor crecimiento se registró a 37 °C.

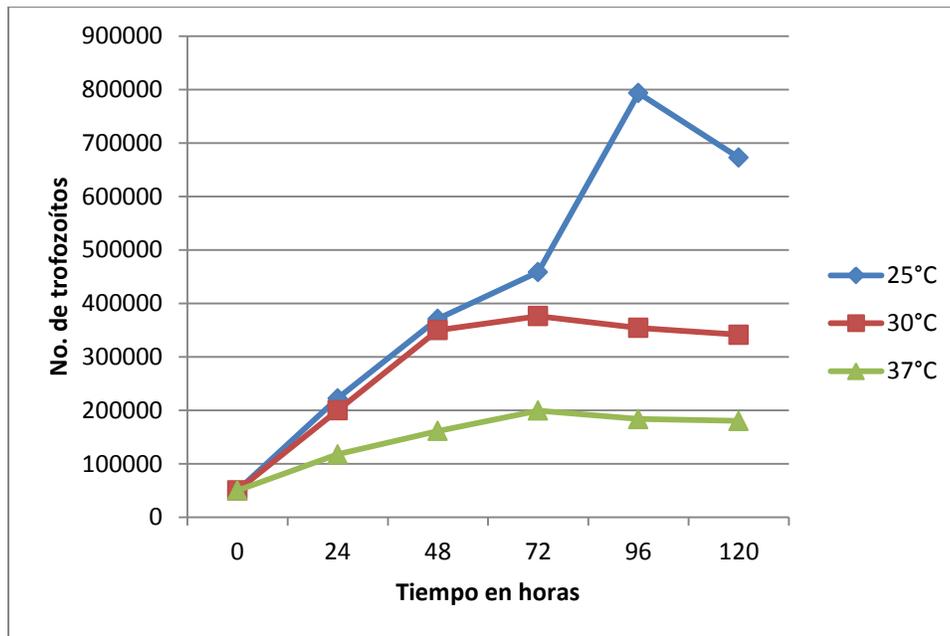


Fig. 9. Curvas de crecimiento de *A. griffini* a diferentes temperaturas.

El crecimiento óptimo con un 100% de trofozoítos se registró a 25 °C teniendo un crecimiento exponencial entre las 72 y 96 horas. En cambio el crecimiento fue considerablemente menor en los cultivos a 30 y 37 °C.

5.3 Descripción morfológica.

De acuerdo a las características morfológicas y con base las claves taxonómicas de Page (1988) se confirmó que el aislado amibiano corresponde a la especie *Acanthamoeba griffini*; el trofozoíto es pleomórfico con presencia de acantópodos, vacuola contráctil, núcleo y nucléolo, de tamaño 26.24 μm en promedio (Fig. 10A) El quiste es esférico, mide en promedio 14.63 μm , el endoquiste es predominantemente hexagonal, fuertemente unido al ectoquiste ondulado (Fig. 10B)

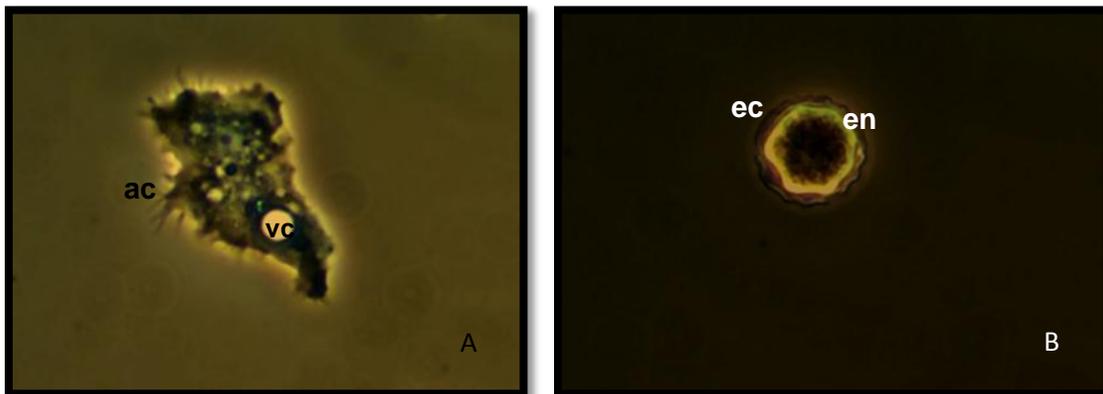


Fig. 10. Imágenes de contraste de fases 40 x. A). Trofozoíto pleomórfico con presencia de acantópodos (ac) y vacuola contráctil (vc). B) Quiste esférico con el endoquiste (en) predominantemente hexagonal, unido al ectoquiste (ec) ondulado.

5.4 Prueba de patogenicidad en ratones

Los ratones inoculados vía intranasal con un 1×10^6 de trofozoítos de *A. griffini* no murieron después de 21 días, por lo que se sacrificaron, extrayendo el cerebro, pulmón, hígado y riñón. Los órganos se colocaron en cajas de Petri con medio NNE enriquecido con *Enterobacter aerogenes*. Previo a la siembra se realizaron improntas de pulmón y cerebro. En la preparación de tejido cerebral se observaron quistes amibianos (Fig. 11). Posteriormente se realizó la tinción de Wright (Fig. 12 A y B).

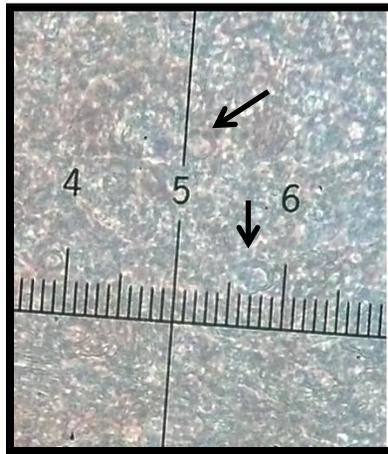


Fig. 11. Microscopía de luz 10x. Quistes de *A. griffini* en tejido obtenido de impronta cerebral, posterior al sacrificio en la prueba de patogenicidad.

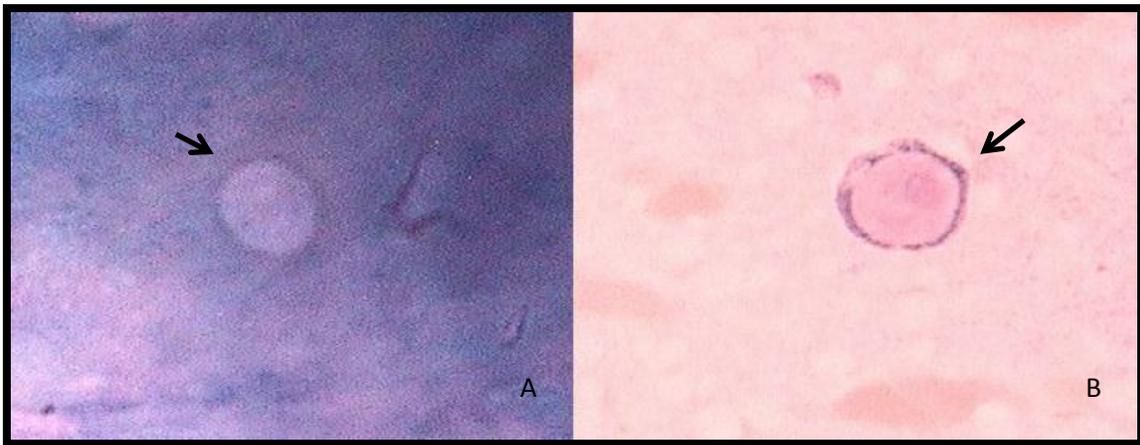


Fig. 12. Microscopía de luz 100x. Tinción de Wright. Improntas de tejido de ratón sacrificados 21 días después de haber sido inoculados con *A. griffini*. A) Se observa un quiste en tejido pulmonar, y B) en tejido cerebral.

La recuperación de amibas en el medio NNE a partir de los diferentes órganos fue negativa.

5.5 Determinación del efecto citopático sobre células MDCK.

Durante la interacción entre las monocapas de células MDCK y trofozoítos *A. griffini* se observó que desde la primera hora de incubación, éstos comenzaron a adherirse en la monocapa y a migrar hacia las uniones celulares (Fig. 13B). A las tres horas se localizaron zonas desprovistas de células MDCK en 4 de los 6 pozos interccionados, a las 6 horas la amiba provocó un efecto citopático en los 6 pozos al igual que a las 24 horas. (Fig. 13C-E)

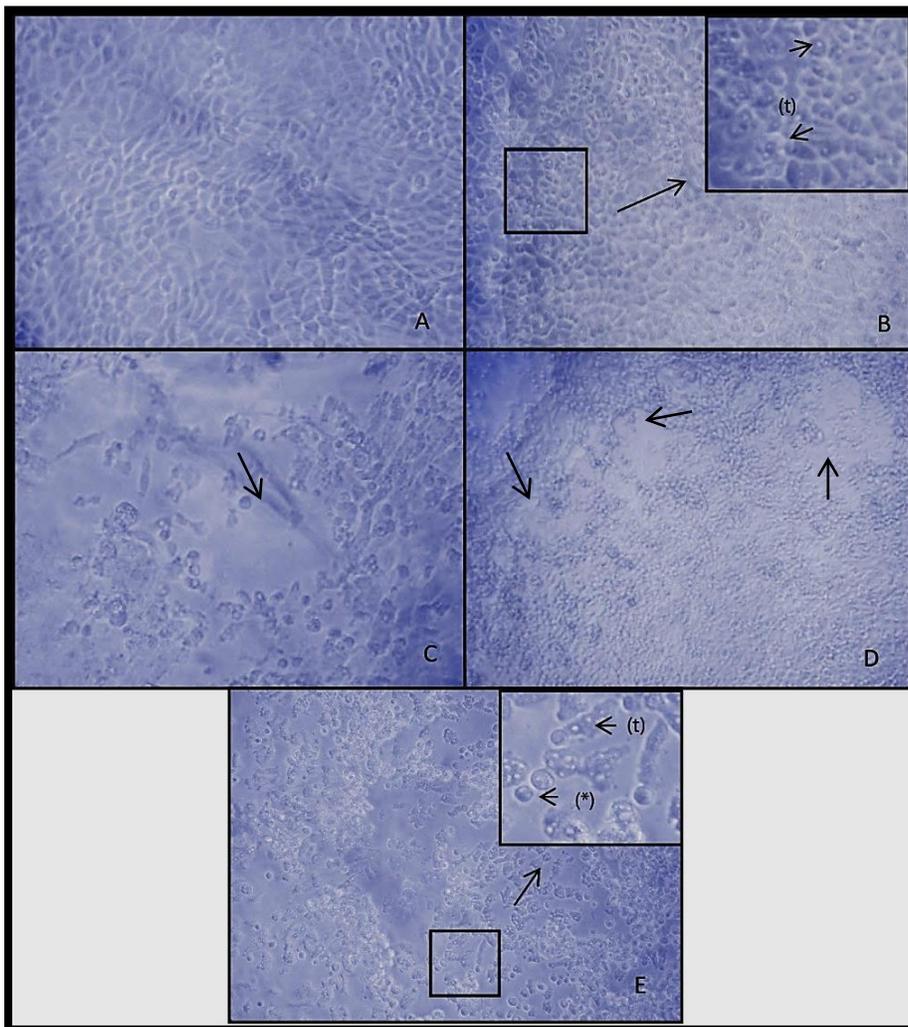


Fig.13. Microscopía de Luz. Interacción entre trofozoítos de *A. griffini* y monocapas de células MDCK (10 x). A) Control de células MDCK a las 24 h, Se observaron células confluentes y adheridas conformando la monocapa. B) Después de 1 hora

de interacción, las amibas se observaron adheridas a las células MDCK ubicándose entre las uniones celulares. C) A las 3 horas los trofozoítos comenzaron a destruir la monocapa observándose zonas desprovistas de células MDCK. D) Mayor número de zonas de destrucción se observaron 6 h post interacción. E) 24 horas post-interacción se observaron células MDCK(*) redondeadas, disgregadas y una gran cantidad de trofozoítos (t) mostrando su morfología típica ocupando espacios desprovistos de células MDCK.

6. DISCUSIÓN

La QA es una infección corneal de difícil resolución asociada al uso de lentes de contacto, si está se diagnostica de manera oportuna el pronóstico del paciente es favorable. En nuestro caso la amiba se diagnosticó de una infección corneal de 2 meses de evolución.

La mayoría de los aislados reportados como agentes etiológicos de esta patología pertenecen al grupo T4.

La revisión de las características morfológicas de los trofozoítos y de los quistes de la cepa en cultivo permitió confirmar el diagnóstico morfológico de *A. griffini*, (Page 1988); presenta un quiste de forma variada principalmente esférica u ovoide de 14 μm de diámetro en promedio. Tiene un ectoquiste ondulado y el endoquiste con o sin brazos cortos, y a veces estrellado con brazos desarrollados dando la apariencia de una rueda dentada, en promedio el número de brazos es de 6. En cuanto al trofozoíto este suele ser pleomórfico, con presencia de acantópodos y vacuola contráctil con un tamaño entre 15-50 μm en promedio.

A. griffini ha sido asociada únicamente por Ledee *et al.*, 1996, como agente causal de QA en el mundo. Por lo que este caso constituye el segundo reportado a nivel mundial y el primero en nuestro país de infección corneal por esta especie. Es probable que nuestra amiba en estudio no muestre una distribución cosmopolita como *A. castellanii* y *A. polyphaga*, las especies aisladas más frecuentemente de casos de QA y en el ambiente (Visvesvara *et al.*, 2007). En un estudio previo, se determinó por biología molecular que las amibas aisladas de este caso corresponden al genotipo T3, grupo pocas veces asociado a patologías en humanos.

La elaboración de las curvas de crecimiento permitió determinar que 25 °C es la temperatura más adecuada para el crecimiento de *A. griffini*. Se ha mencionado de manera general la relación entre la termotolerancia y la patogenicidad de las amibas anfizoicas; sin embargo, se ha comprobado que esta capacidad de crecer a temperaturas superiores a 40 °C está presente principalmente en aislados

reportados de infecciones a nivel sistémico, mientras que los aislados amibianos de casos de QA crecen mejor entre 25 y 30 °C. (Schuster y Visvesvara, 1998). Temperaturas más cercanas a la encontrada en la córnea humana, que es aproximadamente de 34 °C (Lorenzo-Morales *et al.*, 2015).

Para confirmar el potencial patógeno del aislado amibiano se utilizó el modelo murino de EAG propuesto por Culbertson en 1959. Sin embargo, a pesar de que los resultados en la prueba de patogenicidad fueron negativos, al no causar la muerte de los ratones y no recuperarse las amibas a partir de los órganos blanco, la presencia de quistes amibianos observados en las improntas de tejido cerebral y pulmonar confirman la capacidad invasiva de estas amibas inoculadas 21 días antes vía intranasal, lo que podría interpretarse también como baja virulencia de la amiba en estudio; De Jonckheere en 1980 reportó que esta cepa no es patógena en ratones. Es importante mencionar que el caso clínico se resolvió de manera pronta y favorable lo que podría vincularse también a baja virulencia. Page y Mathers en 2013, realizaron un estudio retrospectivo de 372 casos de QA y concluyeron que los pacientes diagnosticados con esta patología presentan un amplio espectro de características clínicas y microscópicas; y confirmaron que el uso de lentes de contacto blandos continúa siendo el principal factor de riesgo. Otra variable que pudo influir en el resultado de la prueba de patogenicidad es la temperatura óptima de crecimiento del aislado amibiano, como se mencionó previamente ésta fue determinada en 25 °C, por lo que difiere de manera importante de la temperatura corporal de un ratón (36 °C) y de la temperatura óptima reportada para amibas anfitriónicas aisladas de sistema nervioso central (Schuster y Visvesvara, 1998).

Debemos considerar también que el modelo murino de EAG ha sido utilizado para evaluar o confirmar la patogenicidad de amibas anfitriónicas como *Naegleria fowleri* y *Acanthamoeba* spp., y que el tiempo establecido para ello es de 21 días (Culbertson, 1959), sin embargo, se sabe que la EAG provocada por especies del género *Acanthamoeba* en humanos, es una infección oportunista de curso crónico que puede presentar meses de evolución. La presencia de quistes de *Acanthamoeba* en las improntas de cerebro sugiere que quizá dando seguimiento

al modelo durante más tiempo, o bien bajo un estado de inmunocompromiso o inmunodepresión, podría manifestarse clínicamente la infección.

Como método alternativo para evaluar el potencial patógeno de las amibas anfizoicas se utiliza la interacción entre monocapas de células en cultivo *in vitro*. A pesar de que las amibas no provocaron la EAG en el modelo murino, durante la interacción con monocapas de células MDCK estas amibas mostraron desde la primera hora de interacción su capacidad para provocar daño, ubicándose desde tiempos tempranos entre las uniones celulares, y mostrando su capacidad para separar las células y empezar a desplazarse a través de las uniones celulares (Fig. 13B). El mecanismo de daño observado para nuestro aislado es semejante al descrito por Omaña y colaboradores para otras especies de *Acanthamoeba*, tanto en monocapas de células MDCK como en córnea de hámster y en córnea humana; los trofozoítos después de adherirse a la superficie migran a las uniones celulares, después al parecer por un efecto mecánico, empiezan a romper las uniones celulares emitiendo pseudópodos entre ellas; después de que las separan pueden fagocitarlas o penetrar por debajo de éstas a capas más profundas del epitelio corneal o provocar importantes zonas líticas sobre monocapas de células. (Omaña-Molina *et al.*, 2004).

El diagnóstico de la QA continúa siendo un reto dentro de las entidades clínicas en las enfermedades corneales. De manera clásica la infección produce un infiltrado anular y perineuritis radial con dolor severo, sin embargo, es importante considerar que la QA puede presentarse con una amplia variedad de hallazgos clínicos. Factores del hospedero y características microbiológicas de cada cepa probablemente juegan un papel en estas diferencias (Szenasi *et al.*, 1998). *A. griffini* es una especie que ha sido reportada solamente en 2 casos de QA, y en nuestro trabajo no se comprobó su patogenicidad en el modelo murino establecido para este grupo de amibas; sin embargo, es importante conocer las características biológicas de estas amibas asociadas a patologías en humanos lo que nos permitirá ampliar nuestro conocimiento en torno a ellas y tratar de asociar estas

características a las presentaciones clínicas que provocan, lo que permitirá hacer un diagnóstico oportuno.

7. CONCLUSIÓN

En este trabajo se describen las características más relevantes de este agente causal de QA diagnosticada morfológicamente como *Acanthamoeba griffini*.

En la descripción morfológica del aislado se confirman las características de *A griffini*: su endoquiste es variable siendo esférico o poligonal, con brazos cortos, el ectoquiste es ondulado; el promedio de número de brazos en el endoquiste es 6 y el diámetro es de 14.63 μm en promedio.

La temperatura óptima de crecimiento de esta cepa es de 25 °C.

A pesar de ser un aislado poco frecuente en casos de QA, se demuestra que tiene la capacidad de provocar un efecto citopático en los cultivos de células MDCK, no obstante en el modelo murino de EAG solo mostró ser invasiva, esto se confirmó al recuperar quistes de improntas de tejido cerebral y pulmonar.

Es importante resaltar el papel del diagnóstico de la QA, ya que si éste es oportuno y se lleva a cabo el tratamiento adecuado, el pronóstico del paciente es favorable.

En el área clínica se debe difundir el potencial patógeno de *A. griffini* como agente causal de QA.

8. REFERENCIAS

1. Arias-Fernandez M.C., Paniagua-Crespo E., Martimallen M., Peñas-Aves M.P.M. and Castro-Casas M.L. (1989). Marine Amoeba from waters of north-western Spain, with comments on a potentially pathogenic euryhaline species. *J. Protozool.* 36(3):239-241.
2. Bacon A.S., Frazer D.G., Dart J.K., Matheson M., Ficker L.A. and Wright P. (1993). A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984–1992. *Eye.* 7 (Pt 6):719-725.
3. Badenoch P.R. (1991). The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Aust NZ J Ophthalmol.* 19(1):9-20.
4. Band R.N. and Mohrlök S. (1973). The cell cycle and induced amitosis in *Acanthamoeba*. *J Protozool.* 20(5):654–657.
5. Barker J., Humphrey T.J. and Brown M.W. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS MicrobiolLett.* 173(2):291-295.
6. Bowers B. and Korn E.D. (1969). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J. Cell Biol.* 41(3):786–805.
7. Brown, T. J. and Cursons R.T. (1977). Pathogenic free-living amebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway. *Scand. J. Infect. Dis.* 9(3):237–240.
8. Byers T. J., Akins R. A., Maynard B. J., Lefken R. A. and Martin S. M. (1980). Rapid growth of *Acanthamoeba* in defined media; induction of encystment by glucose-acetate starvation. *J. Protozool.* 27(2):216–219.
9. Carvalho F.R., Foronda A.S., Mannis M.J., Höfling-Lima A.L., Belfort R. Jr. and de Freitas D. (2009). Twenty years of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea.* 28(5):516–519.
10. Chagla, A. H. and Griffiths A. J. (1974). Growth and encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *J. Gen. Microbiol.* 85(1):139–145.
11. Clarke B., Sinha A., Parmar D.N. and Sykakis E. (2012). *Review Article Advances in the Diagnosis and Treatment of Acanthamoeba Keratitis.* *J*

- Ophthalmol.* 2012:1-6.
12. Clarke D.W. and Niederkorn J.Y. (2006). The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. *Trends in Parasitol.* 22(4):175–180.
 13. Clarke D.W., Alizadeh H. and Niederkorn J.Y. (2005). Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(7):2472–2478.
 14. Corsaro D., Walochnik J., Köhler M. and Rott M.B. (2015). *Acanthamoeba* misidentification and multiple labels: redefining genotypes T16, T19, and T20 and proposal for *Acanthamoeba micheli* sp. nov. (genotype T19). *Parasitol Res.* 114(7):2481-2490.
 15. Culbertson C.G., Smith J.W., Cohen H.K. and Minner J. R. (1959). Experimental infection of mice and monkeys by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol.* 35(1):185-197.
 16. De Jonckheere, J. and Van de Voorde H. (1976) Differences in destruction of cysts of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* and *Acanthamoeba* by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 31(2):294–297.
 17. Fundación Bioquímica Argentina
<http://www.faba.org.ar/fabainforma/402/peece01.htm>
 18. John D.T. (1993). Opportunistically pathogenic free-living amoebae. In: Kreier J.P, and Baker J.R. (eds). *Parasitic Protozoa.* 2(3):143-246.
 19. Jones D.B., Visvesvara G.S. and Robinson N.M. (1975) *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 95(2):221-232.
 20. Kahane S., Dvoskin B., Mathias M. and Friedman M.G. (2001). Infection of *Acanthamoeba polyphaga* with *Simkania negevensis* and *S. negevensis* survival within amoebal cysts. *Appl Environ Microbiol.* 67(10): 4789–4795.
 21. Khan N.A. (2009). *Acanthamoeba: Biology and Pathogenesis*, ed. Caister Academic Press, Norfolk UK.
 22. Khunkitti, W., Lloyd D., Furr J.R. and Russell A.D. (1998). *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J. Infect.* 36(1):43–48.

23. Kilvington S., Larkin D.F.P., White D.G. and Beeching J.R. (1990). Laboratory investigation of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol.* 28(12):2722–2725.
24. Krishna-Prasad B.N. and Gupta S.K. (1978). Preliminary report on engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of axenically grown *Acanthamoeba castellanii* Douglas. *Curr Sci.* 47: 245–247.
25. Ku J.Y., Chan F.M. and Beckingsale P. (2009). *Acanthamoeba* keratitis cluster: an increase in *Acanthamoeba* keratitis in Australia. *Clin Experiment Ophthalmol.* 37(2):181–190.
26. La Scola B. and Raoult D. (2001). Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect.* 7(2):75–79.
27. Ledee D.R., Hay J., Byers T.J., Seal D.V. y Kirkness C.M. (1996). *Acanthamoeba griffini*. Molecular characterization of a new corneal pathogen. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 37(4):544-50.
28. Lehmann O.J., Green S.M., Morlet N., Kilvington S., Keys M.F., Matheson M.M., Dart J.K., McGill J.I. and Watt P.J. (1998). Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tear samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39(7):1261-1265.
29. Lloyd D., Turner N.A., Khunkitti W., Hann A.C., Furr J.R. and Russell A.D. (2001). Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J. Eukaryot. Microbiol.* 48(1):11–16.
30. Lorenzo-Morales J., Khan N. A. and Walochnik J. (2015). An update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, pathogenesis and treatment. *Parasite.* 2015;22:10. doi: 10.1051/parasite/2015010.
31. Ly T.M. and Muller H.E. (1990). Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol.* 33(1):51–54.
32. Marciano-Cabral F. and Cabral G. (2003). *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev.* 16(2):273-307.
33. Martinez A.J., Amphizoic Amoeba Human Patology, Infectious Diseases Color Atlas Monographs, Rondanelli ed, Piccin Nuova Libreria, 1987.
34. Martinez A.J. and Visvesvara G.S. (1997). Free-living amphizoic and

- opportunistic amebas. *Brain Pathol.* 7(1):583–598.
35. Mathers W. D., Nelson S. E., Lane J. L., Wilson M. E., Allen R. C. and Folberg R. (2000). Confirmation of confocal microscopy diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using polymerase chain reaction analysis. *Arch Ophthalmol.* 118(2):178–183.
36. McLaughlin G.L., Stimac J.E., Luke J.M., Kuhlenschmidt M.S., Vernon R.A., Morton L.D., Visvesvara G.S. and Whiteley H.E. (1991). Development of *Acanthamoeba*-cornea coinubation assays. *Rev Infect Dis.* 13(5):S397–S398.
37. Michel R., Burghardt H. and Bergmann H. (1995). *Acanthamoeba* naturally intracellularly infected with *Pseudomonas aeruginosa*, after their isolation from a microbiologically contaminated drinking water system in a hospital. *Zentralbl Hyg Umweltmed.* 196(6):532–544.
38. Moore M.B., McCulley J.P., Luckenbach M., Gelender H., Newton C., McDonald M.B. and Visvesvara G.S. (1985). *Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses. *Am J Ophthalmol.* 100(3):396–403.
39. Moore M.B., McCulley J.P., Newton C., Cobo L.M., Foulks G.N, O'Day D.M., Johns K.J., Driebe W.T., Wilson L.A., Epstein R.J., *et al.* (1987). *Acanthamoeba* keratitis. A growing problem in soft and hard contact lens wearers. *Ophthalmology.* 94(12):1654–1661.
40. Nagington J.(1975). Isolation of amoebae from eye infections in England. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 95(2):207-209.
41. Neff R.J. and Neff R.H. (1969). The biochemistry of amoebic encystment. *Symp Soc Exp Biol.* 23:51–81.
42. Niederkorn J.Y., Alizadeh H., Leher H. and McCulley J.P. (1999). The pathogenesis of *Acanthamoeba* keratitis. *Microbes and Infection.* 1(6):437–443.
43. Omaña-Molina M., González-Robles A., Salazar-Villatoro L.I., Lorenzo-Morales J., Cristóbal-Ramos A.R., Hernández-Ramírez V.I., Talamás-Rohana P., Méndez Cruz A.R. and Martínez-Palomo A. (2013). Reevaluating the role *Acanthamoeba* Proteases in Tissue Invasion:

- Observation of Cytopathogenic Mechanisms on MDCK Cell Monolayers and Hamster Corneal Cells. *Biomed Res Int.* 2013:461329. doi: 10.1155/2013/461329.
44. Omaña-Molina M., Navarro-García F., González-Robles A., Serrano-Luna J.J., Campos-Rodríguez R.C., Martínez-Palomo A., Tsutsumi V. and Shibayama M. (2004). Induction of morphological and electrophysiological changes in hamster cornea after in vitro interaction with trophozoites of *Acanthamoeba* spp. *Infect Immun.* 72(6): 3245–3251.
 45. Page F.C. (1967). Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J Protozool.* 14(4): 709–724.
 46. Page F.C. (1988) A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association, Ambleside, UK.
 47. Page M. A. and Mathers W.D. (2013). *Acanthamoeba* Keratitis: A 12-Year Experience Covering a Wide. *J Ophthalmol.* 2013:670242.
 48. Pérez-Pomata T., Pérez-Álvarez M.J., Rodríguez-Zurita M.A. y Moreno-López M. (2005). Queratitis en portador de lentes de contacto. *ELSEVIER.* 4 doi: 10.1016/S0213-005X(06)73775-2.
 49. Prasher P., Sachdeva P., Ravinder N.B. and Sachin W. (2004). *Acanthamoeba* keratitis: a review. *NZOS.* 14(1):1–7.
 50. Rodríguez-Zaragoza S. (1994). Ecology of Free Living Amoebae. *Crit Rev Microbiol.* 20(3): 225 -241.
 51. Rowbotham T.J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol.* 33(12):1179–1183.
 52. Sawyer T.K. (1990). Marine amoeba in waters of Chincoteague Bay, Virginia: Ecological Significance of “Old” and “New” Species. *Virgin Journ Scien.* 41(4a):433-440.
 53. Sawyer T.K., Nerad T.A. and Visvesvara G.S. (1992). *Acanthamoeba jacobsi* sp. N. (protozoa: Acanthamoebidae) from sewage contaminated ocean sediments. *J. Helminthol. Soc.* 59(2):223-226.
 54. Schaumberg D.A., Snow K.K. and Dana M.R. (1998). The epidemic of

- Acanthamoeba* keratitis: where do we stand?. *Cornea*. 17(1):3–10.
55. Schuster F.L. and Visvesvara G.S. (2004). Opportunistic amoebae: challenges in prophylaxis and treatment. *Drug Resistance Updates*. 7(1):41–51.
56. Schuster F.L. and Visvesvara G.S. (1998). Efficacy of novel antimicrobials against clinical isolates of opportunistic amebas. *J Eukaryot Microbiol*. 45(6):612-618.
57. Sharma S., Garg P. and Rao G.N. (2000). Patient characteristics, diagnosis and treatment of non-contact lens related *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol*. 84(10):1103-1108.
58. Siddiqui R. and Khan N.A. (2012). Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. *Parasit. Vectors*. 5: 6.
59. Szénási Z., Endo T., Yagita K and Nagy E. (1998). Isolation, identification and increasing importance of „free-living” amoebae causing human disease. *J Med Microbiol*. 47(1): 5-16.
60. Steinert M., Birkness K.K., White E., Fields B. and Quinn F. (1998). *Mycobacterium avium* bacilli grow saprozoically in coculture with *Acanthamoeba polyphaga* and survive within cyst walls. *Appl Environ Microbiol*. 64(6): 2256–2261.
61. Thom S., Warhurst D. and Drasar B.S. (1992). Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J Med Microbiol*. 36(5):303–306.
62. Tu E.Y., Joslin C. E., Sugar J., Booton G. C., Shoff M. E., and Fuerst P. A. (2008). The relative value of confocal microscopy and superficial corneal scrapings in the diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *Cornea*. 27:(7)764-772.
63. Tu E.Y. and Joslin C.E. (2010). Recent outbreaks of atypical contact lens-related keratitis: What have we learn. *Am. J. Ophthalmol*. 150(5):602–608.
64. Turner N. A., Harris J., Russell A.D. and Lloyd D. (2000). Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. *J. Appl. Microbiol*. 89(5):751–759.
65. Verani J.R., Lorick S.A., Yoder J.S., Beach M.J., Braden C.R., Roberts

- J.M., Conover C.S., Chen S., McConnell K.A., Chang D.C., Park B.J., Jones D.B., Visvesvara G.S. and Roy S.L.(2009). National outbreak of *Acanthamoeba* keratitis associated with use of a contact lens solution, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 15(8):1236–1242.
66. Visvesvara G.S. and Sterh-Green J.K. (1990). Epidemiology of free-living amoeba infections. *J Protozool.* 37(4):255-335.
67. Visvesvara G., Moura H. and Schuster F. (2007). Pathogenic and opportunistic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Immunology Med Microbiol.* 50(1): 1-26.
68. Winiecka-Krusnell J., Wreiber K., von Euler A., Engstrand L. and Linder E. (2002). Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis.* 34(4): 253–256.
69. Yera H., Zamfir O., Bourcier T., Ancelle T., Batellier L., Dupouy-Camet J. and Chaumeil C. (2007). Comparison of PCR, microscopic examination and culture for the early diagnosis and characterization of *Acanthamoeba* isolates from ocular infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 26(3):221-224.

9. ANEXOS.

1. Medio NNE (medio no nutritivo)

Reactivos	Cantidad
Cloruro de sodio NaCl	0.12 g.
Sulfato de magnesio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.004 g.
Cloruro de calcio $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.004 g.
Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4	0.136 g
Fosfato de potasio dibásico K_2HPO_4	0.142 g.
Agar bacteriológico no nutritivo	15 g.
Agua destilada	1 l

Procedimiento:

1. Pesar los reactivos
2. Colocarlos en un matraz y agregar el agua destilada
3. Poner el matraz en la parrilla con el agitador magnético y esperar hasta que hierva y se torne traslucido
4. Esterilizar el medio a 121° C durante 15 min.

Ya estéril el medio de cultivo se vacía en las cajas de petri en un campo estéril (esperar a que el medio este a una temperatura aproximada de 40°C). Esperar a que gelifique.

5. Guardar las cajas en el cuarto frio por 24 horas para posteriormente colocar la bacteria.

Tomar la suspensión de bacterias que se prepara previamente (descripción de la preparación más adelante)

6. Colocar tres gotas en cada caja.
7. Con la varilla de vidrio esterilizada esparcir la bacteria.
8. Almacenar las cajas de Petri con el medio en el cuarto frio hasta su uso.

El proceso para obtener la bacteria (preparar el medio de cultivo nutritivo,

resembrar y cosecharla) que servirá de alimento para las amibas se describe a continuación.

Medio de cultivo nutritivo.

La especie bacteriana con la que se trabaja es *Enterobacter aerogenes*

Reactivos	Cantidades
Agar nutritivo	23 g
Agua destilada	1000 ml

Procedimiento

Se realiza el mismo procedimiento que en el medio de cultivo NNE, y bajo las mismas condiciones de esterilización, 121 °C durante 15 minutos.

Siembra de bacteria.

Procedimiento:

1. Esterilizar el asa de siembra directo a la flama.
2. Tomar una asada de la reserva de bacteria para obtener un cultivo de 24 horas.
3. Cuidadosamente sin perforar el agar, colocar la muestra haciendo una línea a lo largo de la caja y posteriormente distribuirla por estría en toda la caja.
4. A partir del cultivo de 24 h tomamos con un hisopo una pequeña muestra de la bacteria y hacemos una siembra masiva en cada una de las cajas con agar nutritivo.
5. Colocar las cajas en la incubadora a 37°C de 18 a 24 horas.
6. Cosechar la bacteria.

Cosecha de bacteria

Procedimiento:

1. Tomar con una pipeta Pasteur aproximadamente 3 ml de agua destilada estéril.
2. Colocar el agua destilada en cada una de las cajas.
3. Con un gendarme hacer un barrido por toda la caja.
4. Tomar la suspensión de bacteria con la pipeta y colocarla en los tubos de ensayo.
5. Inactivar la bacteria en la olla de presión o autoclave a 121°C por 5 minutos. (no cerrar totalmente los tubos).

2. Bactocasitona al 2%

Material:

Reactivos	Cantidad.
Bactocasitona	2 g
Agua destilada	100 ml.
Suero fetal bovino o de ternera	10 %
Antibiótico	0.1 %

Procedimiento:

Se disuelve la bactocasitona en el agua destilada, sin necesidad de calentar, y se vierte en tubos de ensayo (13 X 120) con tapón de rosca; o bien si se prepara en botella se deben esterilizar también los tubos y pipetas graduadas que se requieran para vaciarlo; se esteriliza también a 121°C por 15 minutos.

Se deja enfriar y se pasa a prueba de esterilidad colocando el medio en la incubadora por 24 h; si esta traslucido indica que no está contaminado y puede utilizarse; en caso de que se encuentre turbio se esteriliza y se desecha. Guardar el medio bactocasitona en el refrigerador y al utilizarlo agregar el suero y el antibiótico a la concentración recomendada.

Para axenizar las cepas se transfieren las amibas del medio monoxénico al medio axénico de la siguiente forma:

Procedimiento:

1. Agregar 2.7 ml de bactocasitona a los tubos.
 - a. Observar a contra luz el suero para ver si esta traslucido, en caso de que éste se encuentre turbio se tiene que pasar a través de un filtro de 0.45 ó 0.22 μm . de poro.
2. Con la micropipeta de 100-1000 μl con punta azul colocar 300 μl de suero fetal bovino.
3. Con la micropipeta de 0.5-10 μl con punta blanca colocar en cada tubo 3 μl de antibiótico.

Una vez preparados los tubos se transfieren las amibas de la siguiente manera:

1. Tomar la muestra de amibas cortando un trozo del cultivo en medio NNE de aproximadamente 0.5 cm de lado e introducirlo en los tubos.
2. Incubar los tubos a la temperatura óptima de crecimiento monitoreando diariamente el crecimiento amibiano.

3. Curva de crecimiento

Procedimiento:

1. Obtener un cultivo masivo en fase exponencial de crecimiento de la cepa en estudio
2. Resuspender las amibas de la botella de cultivo de 25 cm^2 y colocarlas en un tubo de centrifuga.
3. Homogenizar y hacer el conteo en la cámara de Neubauer, bajo el microscopio.
 - a. Se requieren 2,250,000 amibas para realizar las curvas de crecimiento.
 - b. Para determinar el número de amibas por medio de la cámara, ésta

- debe de encontrarse limpia y sin grasa.
- c. Colocar 10 μ l en la cámara de Neubauer.
 - d. Colocar la cámara de Neubauer en la platina del microscopio y realizar el conteo en los cuadrantes para glóbulos blancos, localizados en las cuatro esquinas.
 - e. Después de contar se realiza el siguiente cálculo:

Promedio de los 4 cuadrantes \times 10,000= número de amibas/ml

Número de amibas por ml \times Volumen total (ml)= Número total de amibas

4. Centrifugar la muestra por 10 minutos a 2,500 rpm, para formar una pastilla.
5. Ajustar el volumen para agregar en cada tubo 50,000 amibas en 100 μ l de medio.
6. Agregar los 100 μ l del cultivo a cada tubo manteniendo homogénea la suspensión de amibas.
7. Etiquetar los tubos con la clave de la cepa, día y temperatura de incubación.
 - a. Ejemplo: 19779-Día 1-25°C.
8. La curva de crecimiento se realiza por triplicado a 25°C, 30°C y 37°C.

4. Conteo de amibas.

Procedimiento:

1. Colocar los tubos en el hielo por 5 minutos.
2. Resuspender las amibas del tubo agitando por un minuto en el vortex.
3. Tomar 10 μ l del cultivo y colocarlo en la cámara de Neubauer.

Se realiza el conteo en la cámara de Neubauer, como se describió previamente. Hacer prueba de viabilidad a un tubo de cada temperatura agregando 10 μ l de azul tripano. Los trofozoítos que se tiñen están muertos.

4. Sacar el promedio de los tres tubos para cada día, de cada temperatura.

5. Prueba de patogenicidad en ratones.

Para esta prueba se requieren lotes de 5 ratones CD-1, machos, recién destetados y un cultivo amibiano masivo.

Procedimiento:

1. Resuspender las amibas y vaciar el cultivo en un tubo de centrifuga.
2. Realizar el conteo de amibas en la cámara de Neubauer.
3. Centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm.
4. Se decanta el medio y se ajusta el volumen de medio necesario para inocular a cada ratón con 1×10^6 amibas en 10 μ l.
5. Anestesiarse a los ratones.
6. Tomar 10 μ l del cultivo e inocular a los ratones vía nasal.

Se debe revisar diariamente a los ratones, buscando signos de la infección, ya que estos pueden morir a causa de la amiba. Si mueren en el transcurso de la prueba, o si después de 21 días no han muerto, se sacrifican y se extraen del ratón los siguientes órganos: cerebro, pulmón, hígado y riñón y, se depositan en cajas Petri con medio NNE y se incuban a la temperatura óptima de crecimiento de la cepa en estudio; se monitorean diariamente en el microscopio invertido durante 10 días en busca de trofozoítos recuperados de los órganos. Con esto se determina si la cepa es patógena o invasiva.

6. Interacción *IN VITRO* con células MDCK

Para este procedimiento se requiere monocapas de células MDCK en placas de cultivo de 96 pozos, la relación entre las células y las amiba es de 1:1.

Procedimiento.

1. Resuspender las amibas, tomar el medio y transferirlo al tubo de centrifuga.
2. Realizar el conteo de amibas en la cámara de Neubauer.
3. Centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm y ajustar el volumen para tener una

cantidad de 5×10^4 amibas en 100 μ l de medio bactocasitona-medio D-MEM (relación 1:1).

4. Las amibas se colocan sobre las monocapas de células MDCK en placas de 96 pozos manteniendo una relación de 1:1 (5×10^4).
5. Observar al microscopio óptico a 1, 3, 6 y 24 horas. Transcurrido cada tiempo verificar la viabilidad de las amibas.

Quitar el medio de los pozos y colocar el fijador. Analizar bajo el microscopio el posible efecto citopático de las amibas sobre las monocapas de células MDCK.