



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



DIAGNÓSTICO DE LA QUERATÍTIS POR *Acanthamoeba* spp.

TESINA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

Jesús Hugo Capiz Herrera

ASESORA:

Q.F.B. ROSA ELENA TORRES RUIZ

Morelia, Michoacán de Ocampo

Enero 2013.



LA PRESENTE INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA SE REALIZÓ DURANTE EL DIPLOMADO TEÓRICO PRÁCTICO DE PARASITOLOGÍA CLÍNICA, ORGANIZADO POR LA ASOCIACIÓN PROFESIONAL PARA LA CAPACITACIÓN CONTÍNUA (APCC) Y AVALADO POR LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO A TRAVÉS DE LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOLOGÍA, A QUIÉN LE AGRADECEMOS INFINITAMENTE EL APOYO ACADÉMICO Y LOGÍSTICO BRINDADO.



A MIS PADRES:

HUGO Y CARMEN,
A QUIENES ADMIRO PROFUNDAMENTE Y
AGRADEZCO PORQUE SIN ELLOS NADA DE
ESTO HABRIA SIDO POSIBLE



INDICE	Pág.
1. Justificación	1
2. Objetivos	2
3. Resumen	3
4. Introducción	4
5. Historia del género <i>Acanthamoeba</i>	5
5.1 Generalidades de <i>Acanthamoeba</i> spp.	6
5.2 Clasificación del parásito	7
5.3 Antecedentes históricos	7
5.4 Ciclo biológico	8
5.5 Mecanismos patógenos	9
5.6 Manifestaciones clínicas	10
6. Diagnóstico por laboratorio de queratitis por <i>Acanthamoeba</i> spp.	12
6.1 Obtención de la muestra	13
6.2 Cultivo de la muestra	13
6.3 Examen de los cultivos	15
6.4 Identificación	15
6.5 Subcultivos	15
7. Diagnóstico de la queratitis a través de frotis	17
8. Validación por PCR tiempo real y microscopía electrónica de transmisión para el diagnóstico de queratitis por <i>Acanthamoeba</i> spp.	19
9. Epidemiología	21
10. Tratamiento	22
11. Prevención	24
12. Resultados	25
13. Discusión	26
14. Conclusiones	27
15. Glosario	28
16. Bibliografía	32



INDICE DE IMÁGENES, ESQUEMAS Y TABLAS.

Figura:	Pág.
1. Número de artículos publicados desde 1960 relacionados con <i>Acanthamoeba</i> , <i>Naegleria</i> , <i>Balamuthia</i> , <i>Sappinia</i>	1
2. Trofozoíto de <i>Acanthamoeba</i> spp. Microscopía de escaneo electrónico	6
3. Ciclo biológico de <i>Acanthamoeba</i> spp. Imagen original de CDC, DPDx.	8
4. La patofisiología de la queratitis por <i>Acanthamoeba</i> spp.	9
5.-5.5 Daño en el ojo causado por <i>Acanthamoeba</i> spp.	11
6. Método de sembrado de la muestra en placa de Petri	14
6.1 Raíles formados por <i>Acanthamoeba</i> en palca de agar no nutritivo	16
7 -7.6 Tinciones diversas de extendidos de <i>Acanthamoeba</i> spp	17-18
8. Fotomicrografías de <i>Acanthamoeba</i> obtenidas por MET.	20
9-9.5 Respuesta del ojo al tratamiento con CHX.	22-23



1. JUSTIFICACION

La investigación se llevó a cabo sobre el diagnóstico por el laboratorio de la Queratitis por *Acanthamoeba* spp. Para hacer énfasis acerca de la prevención y control de esta enfermedad debido a que puede llegar a causar ceguera al hombre. Así como conocer los métodos de diagnóstico más novedosos que se emplean para identificar a este parásito con rapidez y exactitud ya que es de vital importancia para el paciente pues de esto depende que pueda o no recuperarse de manera satisfactoria.

Además a nivel global ha incrementado el interés sobre este parásito, como muestra la figura 2, *Acanthamoeba* spp. Es el organismo con más publicaciones realizadas desde el año 1975 debido al incremento en la incidencia de enfermedades por este parásito.

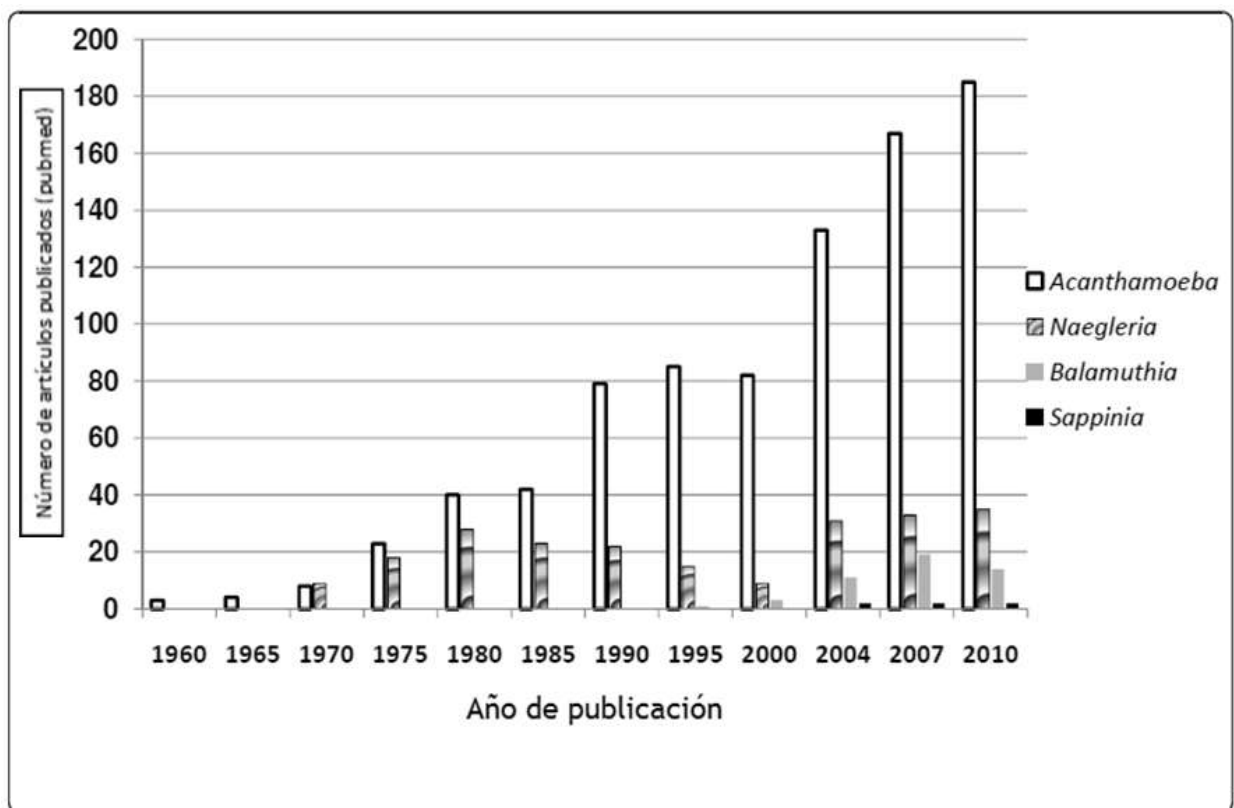


Figura 1. Número de artículos publicados desde 1960 relacionados con *Acanthamoeba*, *Naegleria*, *Balamuthia*, *Sappinia*, (Siddiqui and Khan, 2012)



2. OBJETIVOS

El objetivo de la presente tesina es investigar los avances más importantes que se describen en la bibliografía especializada en relación al diagnóstico de la queratitis por *Acanthamoeba* spp; Además que pretende:

- Investigar las generalidades de *Acanthamoeba* spp.
- Mencionar los exámenes de laboratorio empleados para el diagnóstico de queratitis por *Acanthamoeba* spp.



3. RESUMEN

Acanthamoeba spp. Es una amiba de vida libre que puede invadir de manera accidental la córnea del ojo de personas inmunocompetentes y originar el cuadro clínico denominado queratitis por *Acanthamoeba*.

El hombre se infecta por contacto directo del ojo con agua contaminada en presencia de quistes o trofozoítos del mismo, cuando una persona presenta daño mecánico en la córnea como puede ser una herida en el ojo o cuando se utilizan lentes de contacto con una mala calidad en la higiene de los mismos.

Acanthamoeba spp. En su fase trófica mide entre 10-45 μm y se caracteriza por sus acantopodios. En su fase quiste puede medir hasta 20 μm y tiene una pared externa denominada ectoquiste la cual es lisa o ligeramente arrugada y otra interna o endoquiste de aspecto poliédrico o estrellado. En personas fuertemente inmunosuprimidas este parásito puede causar además de queratitis, encefalitis amibiana granulomatosa, enfermedad diseminada en individuos inmunocomprometidos, uveítis y lesiones en piel.

Su distribución geográfica es cosmopolita de ahí su importancia en el diagnóstico por laboratorio. Los exámenes más utilizados para el diagnóstico son: El examen directo en fresco, exudado de las lesiones corneales en busca de trofozoítos. Frotis con: Giemsa, Acido Periódico de Schiff (PAS), blanco de calcofluor, Hematoxilina-eosina entre otras. Otra manera diagnóstica es el uso de medios de cultivo para su aislamiento por ejemplo el medio PAGE. Los anti amebianos más eficaces son las diamidinas y las biguanidas. Entre las diamidinas disponibles se encuentran el isetionato de propamidina al 0,1% y la hexamidina, al 0,1%. En las biguanidas, la clorhexidina y la polihexametilenbiguanida son las más habituales en el tratamiento contra esta amiba.



4. INTRODUCCIÓN.

La queratitis amebiana es la manifestación clínica más habitual de la infestación por el género *Acanthamoeba*. Se caracteriza por ser dolorosa e invalidante. La infección progresa originando una ulceración de la córnea y puede dar como resultado ceguera en casos muy graves. Es una enfermedad difícil de diagnosticar y tratar, ya que las manifestaciones clínicas se confunden a menudo con las de las queratitis herpética, fúngica o mico bacteriana.

El género *Acanthamoeba* comprende protozoos ubicuos de vida libre que se encuentran en el aire, suelo, aguas dulces o saladas, residuales, e incluso en el agua del grifo o embotellada, unidades de diálisis, material odontológico, etc. Han sido aisladas de las vías respiratorias altas de humanos sanos, de lesiones de piel en inmunodeprimidos y de tejido corneal.

Entre los factores predisponentes destacan los traumatismos corneales, el contacto con cuerpos extraños o la exposición al agua templada. Pero el factor de riesgo más importante para contraer esta infección es el uso de lentes de contacto, sobre todo si se usan soluciones salinas caseras o agua corriente para el lavado de las mismas, el no desinfectarlas apropiadamente o con la frecuencia recomendada, y su utilización durante la práctica de la natación.

La identificación de *Acanthamoeba* spp. En el humano se basa en la observación de trofozoítos que muestran un movimiento lento ameboideo por contracciones y relajaciones del citoplasma; un tamaño variable entre 10-45 μm , son tenues (hialinos), generalmente mono nucleados y con una vacuola grande y visible, que se contrae y desaparece cada 45-50 segundos. Con más aumento (40X) pueden observarse unas finas proyecciones citoplásmicas que parecen flagelos, pero que no lo son, que se extienden y retraen constantemente, denominadas acantopodios (Salazar et al, 2011).



5. HISTORIA DEL GÉNERO *Acanthamoeba*.

El primer reporte que indica que el género *Acanthamoeba* podría causar enfermedad en el hombre data de 1958 y correspondió a una prueba de calidad de la vacuna contra la poliomielitis en cultivos celulares, en la que aparecieron placas que se pensó, inicialmente, podrían haber sido inducidas por el virus polio, porque ratones y monos, posterior a la inoculación con fluidos provenientes de los cultivos, murieron a causa de una meningoencefalitis. Sin embargo, se encontró que las placas habían sido causadas por amebas cuyos trofozoítos y quistes fueron identificados como pertenecientes al género *Acanthamoeba*. La observación realizada por Culbertson y cols, de los animales muertos, permitió presumir su rol como patógeno para el hombre.

Acanthamoeba fue descrita primero por Castellani, cuando reportó la presencia de una ameba en cultivos de *Cryptococcus parvulus*. El género fue establecido, posteriormente, por Volkonsky en 1931. En la actualidad, es parte de la familia Acanthamoebidae y la identificación de género es relativamente fácil y se realiza utilizando criterios morfológicos. Para la diferenciación de especies se han aplicado criterios inmunológicos, bioquímicos, fisiológicos y moleculares, ya que los morfológicos resultan subjetivos y se ven alterados por las condiciones de cultivo.

Se ha logrado la secuenciación completa del gen de la subunidad menor ribosomal del núcleo. Usando este criterio, Stothard y cols designaron 12 tipos de secuencias (genotipos) de T1 a T12. De este análisis se ha podido establecer, por ejemplo, que la mayoría de las cepas aisladas en cuadros de queratitis corresponderían al genotipo 4. (Jercic, 2007)

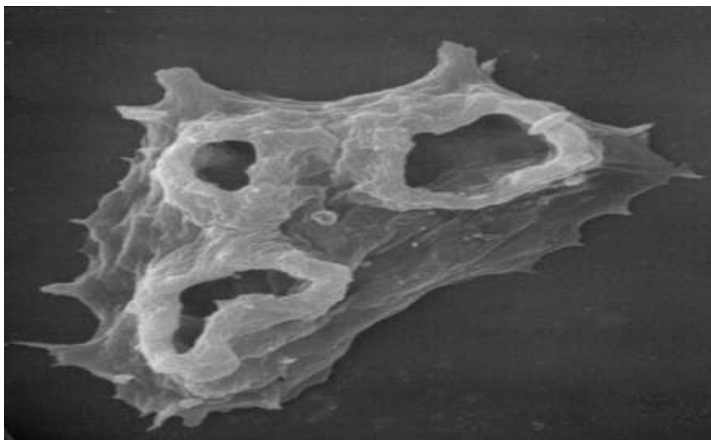


5.1. GENERALIDADES DE *Acanthamoeba* spp.

Son amibas espinosas o filosas, la principal característica de sus especies es la presencia de acantopodios, que son pseudópodos que le dan aspecto de “erizo”; no se han descrito fases flagelares. Existen cuatro especies de importancia médica, *Acanthamoeba culbertsoni* (Singh y Das, 1970; Sawyer y Griffin, 1975) *Acanthamoeba castellanii* (Douglas, 1930), *Acanthamoeba polyphaga* (Peschikew, 1913; Vivesvara, 1975) y *Acanthamoeba astronyxis* (Ray y Hayer, 1945; Page, 1967). La diferenciación de especies con base a la morfología es difícil por lo que solo se establece si se emplean técnicas de tinción inmunofluorescente o de inmunoperoxidasa.

Estos organismos presentan dos fases: la de trofozoíto (trófica o activa) y la de quiste (resistencia). La fase trófica presenta un tamaño y forma variables; las formas redondeadas miden de 10-45 μm . El núcleo presenta un cariosoma muy aparente; en algunos especímenes se puede observar una vacuola contráctil más aparente que el núcleo.

La fase quística es característica y en exámenes en fresco de cultivos se encuentran unidos a los trofozoítos (figura 1); son esféricos con bordes irregulares, miden en promedio 20 μm . Presentan una pared externa o ectoquística esférica, lisa o ligeramente arrugada y otra interna o endoquística poliédrica o estrellada.



(Figura 2)

Trofozoíto de *Acanthamoeba* spp.
Microscopía de escaneo electrónico.
Bruno da Rocha-Azevedo, 2009



5.2. CLASIFICACIÓN DEL PARÁSITO

Dominio: Eukaryota

Reino: Protozoa

Subreino: Sarcomasttigota

Filo: Amoebozoa

Subfilo: Lobosa

Clase: Amoebaea

Orden: Centramoebida

Familia: Acanthamoebidae

Género: *Acanthamoeba*

(Sawyer & Griffin, 1975)

5.3. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Los primeros reportes de queratitis por el género *Acanthamoeba* fueron publicados por Nagington y cois en 1974, en Gran Bretaña, y por Jones y cois, en 1975 en E.U.A. Varias especies se han descrito como agentes causales de estos cuadros, entre las que destacan *A. castellanii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*, *A. culbertsoni*, *A. rhysodes*, *A. griffini*, *A. quina* y *A. lugdunensis*. En los años '80, incluso, se hablaba de una epidemia de queratitis por *Acanthamoeba*, debido al aumento del número de casos por el uso masivo de los lentes de contacto, tanto con fines terapéuticos como también cosméticos. Es justamente este cuadro, el más común en Chile y el primer caso publicado data de 1993. Los síntomas más frecuentes incluyen: ojos rojos, lagrimeo constante y edema palpebral. Inicialmente, las amebas se restringen al epitelio corneal, luego invaden el estroma, causando un daño extensivo, con un cuadro que va desde una inflamación leve a grave. Una de las características más importantes es la presencia de un infiltrado estromal en forma de anillo.



5.4. CICLO BIOLÓGICO

A partir del suelo, agua, sistemas de aire acondicionado, etc. *Acanthamoeba* spp. Penetra por contacto directo con la cornea tras haber sufrido un traumatismo ocular seguido de contaminación con agua o tierra contaminada. (figura 2)

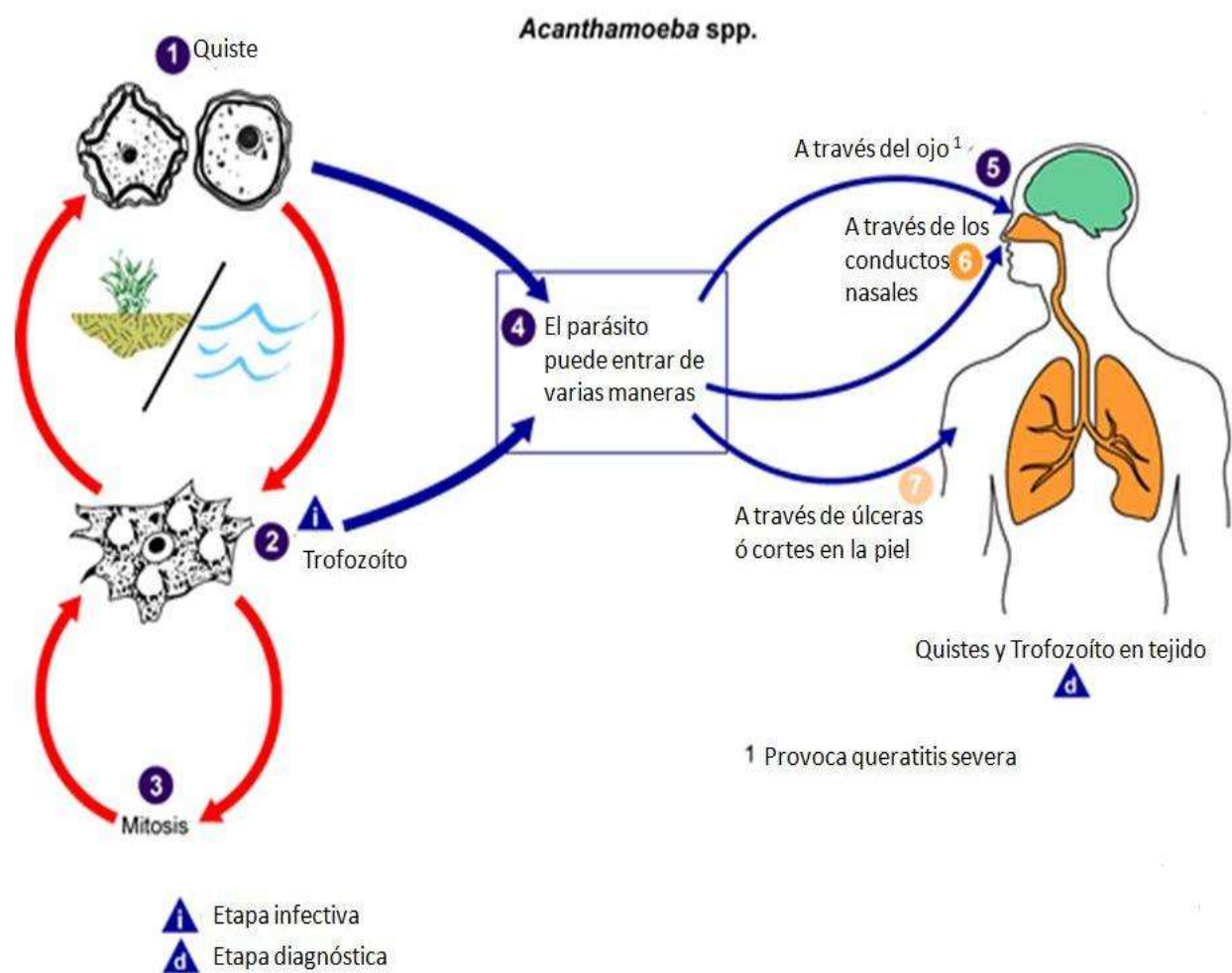


Figura 3. Ciclo biológico de *Acanthamoeba* spp. Imagen original de CDC, DPD. (Editada por Capiz, 2012)



5.5. MECANISMOS PATÓGENOS

Se ha propuesto que la secuencia de daño a la córnea se sucede de la siguiente manera:

- (1) Los trofozoítos de *Acanthamoeba* spp. Se adhieren a glicoproteínas de manosa que aumentan en respuesta a una abrasión corneal, en el epitelio corneal.
- (2) Cuando *Acanthamoeba* spp. se encuentra con la presencia de manosa se induce la liberación de una sustancia llamada MIP133, que es extremadamente citolítica.
- (3) El trofozoíto rompe la membrana de Bowman y entra en el estroma de colágeno.
- (4) El trofozoíto continúa con la producción de varias proteasas que contribuye a la disolución del estroma corneal, estas proteasas son : MIP133, collagenasa, MPP (enzimas proteolíticas) Y APA (plasminogeno activador de *Acanthamoeba* por sus siglas en inglés)
- (5) Los trofozoítos se agrupan alrededor de los nervios corneales. (Figura 3)

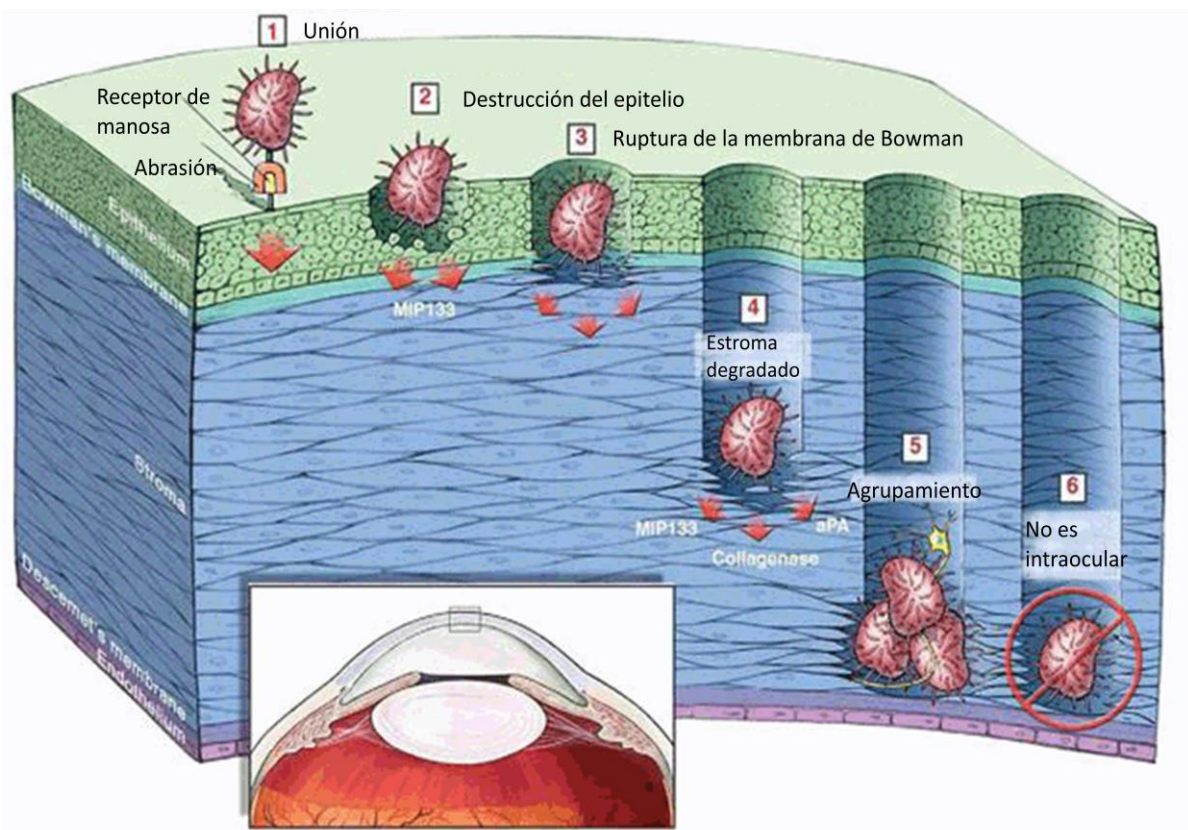


Figura 4. La patofisiología de la queratitis por *Acanthamoeba* spp. (Clarke WD y Jerry, 2006). (Editada por Capiz, 2012)



5.6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La queratitis amebiana es la manifestación clínica más habitual de la infestación por el género *Acanthamoeba*. Se caracteriza por ser dolorosa e invalidante. La infección progresa originando una ulceración de la córnea y puede dar como resultado ceguera en casos muy graves. Es una enfermedad difícil de diagnosticar y tratar, ya que las manifestaciones clínicas se confunden a menudo con las de las queratitis herpética, fúngica o mico bacteriana, lo que provoca que el diagnóstico correcto y el comienzo del tratamiento se retrasen semanas o meses.

El cuadro clínico varía según el momento de la primera consulta. Al principio, las amebas se encuentran en el epitelio corneal, pero si la enfermedad progresa ocurre la invasión del estroma. En sus inicios, se caracteriza por limbitis, queratopatía punteada, infiltrados epiteliales, subepiteliales o perineurales (queratoneuritis radial). En este momento el paciente sufre enrojecimiento, lagrimeo, fotofobia y dolor de diversa intensidad, pero desproporcionado respecto a los signos oculares, así como visión borrosa. Si la enfermedad progresa, puede observarse ulceración, infiltrados anulares, placas endoteliales y uveítis anterior, con o sin hipopión (presencia de pus en la cámara anterior del ojo), y más infrecuentemente, edema corneal. Si el proceso se agrava, se pueden producir abscesos, escleritis, glaucoma, catarata e infección microbiana secundaria. Lo más característico es la presencia de un infiltrado anular compuesto por células inflamatorias (neutrófilos). Los pacientes que sufren esta infección son generalmente inmunocompetentes; no obstante, no desarrollan inmunidad protectora apreciable, por lo que es posible la reinfección. (Pérez-Irezábal *et al.* 2006)

Las manifestaciones clínicas pueden observarse en las siguientes figuras según sus días de evolución.



Fig. 5 (15 días de evolución)

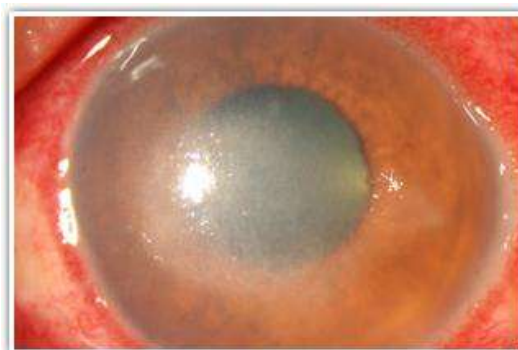


Fig. 5.1 (25 días de evolución)

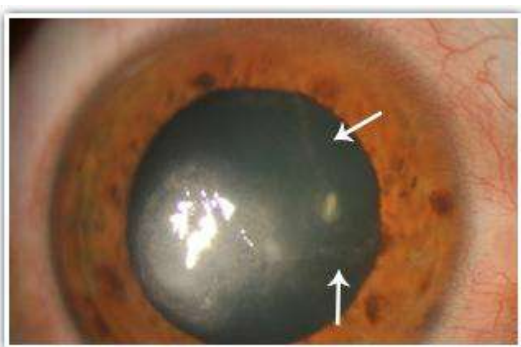


Fig. 5.2 (40 días de evolución)

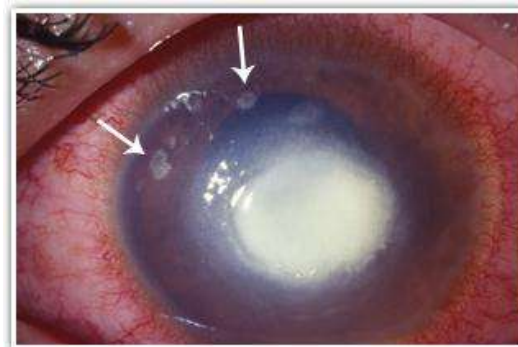


Fig. 5.3 (Meses de evolución)



Fig. 5.4

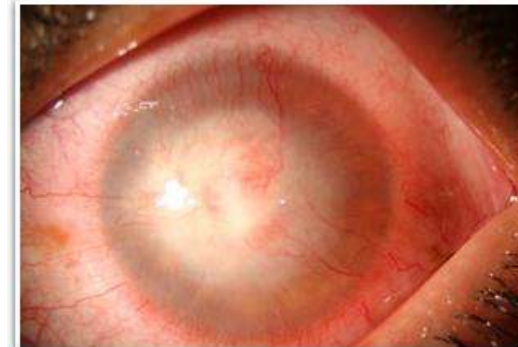


Fig. 5.5

Las lesiones progresan con aparición de infiltrados estromales anteriores difusos o focales, edema circunscrito, Fig. 8. En estados avanzados hay abscesificación y queratolisis Fig. 9.

Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9. Daños en el ojo causados por *Acanthamoeba* spp. (Francisco Barraquer C. M.D, 2009)



6. DIAGNÓSTICO POR LABORATORIO DE QUERATITIS POR *Acanthamoeba* spp.

El diagnóstico de queratitis por *Acanthamoeba* se realiza por la visualización de amebas en extensiones o en cultivos. El mayor porcentaje de aislamientos ocurre en estadios relativamente precoces de la enfermedad cuando la ameba está confinada al epitelio. Con el tiempo, las amebas penetran en tejidos más profundos, lo que dificulta su identificación en muestras superficiales y hace necesaria la realización de la biopsia corneal. En portadores de lentes de contacto debemos examinar también las lentes y su estuche portador.

Las amebas se visualizan en extensiones teñidas con Giemsa, PAS, calcoflúor o naranja de acridina. El agar no nutriente con *Escherichia coli* es el medio de cultivo de elección para aislar amebas. También crecen bien en agar chocolate y en agar tamponado con carbón-levadura. Es característica la formación de raíles en el medio de cultivo formados por el avance de los trofozoítos.

La microscopia confocal *in vivo* también puede utilizarse para la observación de estos organismos, particularmente en su forma quística.

El tratamiento adecuado de la queratitis por *Acanthamoeba* requiere un rápido aislamiento de este agente en las muestras de tejido. Deberíamos sospechar *Acanthamoeba* en cualquier queratitis con cultivos negativos para bacterias, herpes simples, hongos o micobacterias atípicas. Además, cualquier queratitis que a pesar del tratamiento no mejore debería hacernos sospechar en la *Acanthamoeba*.



6.1 OBTENCIÓN DE LA MUESTRA.

Ante una sospecha de queratitis por *Acanthamoeba*. El oftalmólogo solicitará al laboratorio de Microbiología, el envío de un recipiente idóneo para el transporte y conservación de la muestra. Un tubo o frasco estéril de boca ancha, con 1 ml de solución de Page, previamente atemperada en estufa de cultivos durante 20 min, para depositar las pequeñas virutas corneales recogidas asépticamente mediante micro espátula oftálmica, también es adecuado para descartar queratitis de otra etiología, bacteriana o vírica, puesto que el fin primordial es evitar la desecación de la muestra. El recipiente se mantendrá a temperatura ambiente hasta su transporte al laboratorio.

6.2 CULTIVO DE LA MUESTRA.

Una vez que la muestra llega al laboratorio, se procede de la siguiente manera:

- Atemperar una placa de Petri con medio de Page (MP, con base de agar no nutritivo) o un tubo con el mismo medio (solidificado en posición inclinada).
- Colocar, en un tubo estéril, 1 ml de la solución de Page y emulsionar finamente 1-2 colonias de un cultivo de *Escherichia coli* (o *Enterobacter aerogenes*), hasta obtener una turbidez media y homogénea. Conviene utilizar un cultivo reciente (18-24 h), bien identificado.
- Mediante una varilla de vidrio, fragmentar las virutas corneales en el frasco de recogida o, previo paso de éstas a otro recipiente más idóneo, con 0,5-1 ml de SP, dependiendo de la cantidad de muestra.
- Inocular la placa de Petri (con medio de Page), con 0,2 ml de la solución de *Escherichia coli* y con asa bacteriológica extender por toda la placa o por el medio inclinado, en caso de utilizar el tubo.



- Con una pipeta tipo Pasteur, añadir un par de gotas de la solución con la muestra (virutas corneales disgregadas en SP) en el centro de la placa o dejando resbalar por el plano inclinado en el tubo. Esperar un tiempo para que se absorba y cerrar la placa con tira adhesiva porosa y el tubo con la tapa roscada floja para permitir una buena aireación. Luego, incubar ambos en estufa de 35-37°C) (Pérez-Irezábal *et al.*(2006) (Figura 10.)

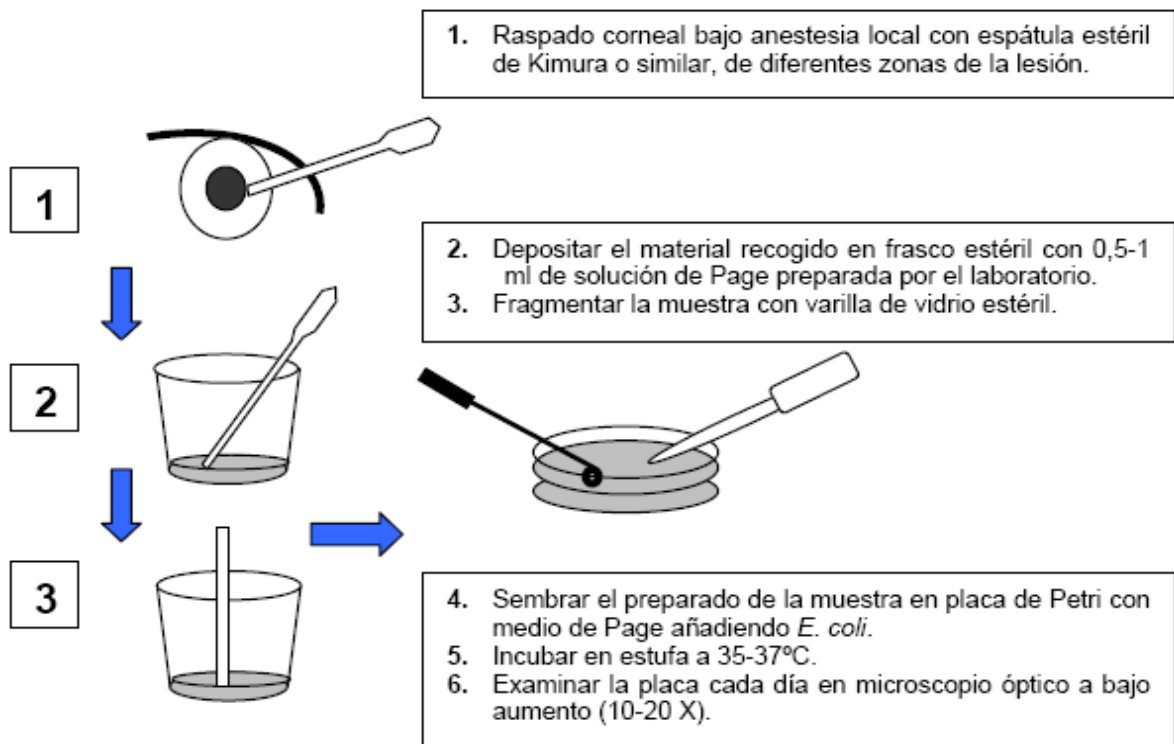


Figura 6. Método de sembrado de la muestra en placa de Petri. (J Pérez-Irezábal *et al.*2006)



6.3 EXAMEN DE LOS CULTIVOS

Los cultivos se deben examinar cada 24-48 h al principio (durante los primeros 7-8 días) y después cada semana, hasta un mínimo de 4-6 semanas. Se debe examinar la placa en un microscopio óptico con objetivo seco de bajo aumento (10-20X); en el caso del tubo, se toma una pequeña cantidad de la fase líquida (25-50 ml) con una pipeta estéril, y previa agitación suave, se deposita en un portaobjetos limpio y se observa igualmente con objetivo seco. En caso de positividad, se aprecian los trofozoítos o quistes de morfología característica.

6.4 IDENTIFICACIÓN

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* muestran un movimiento lento típicamente ameboideo, por contracciones y relajaciones del citoplasma; un tamaño variable entre 15-45 μ m, son hialinos, generalmente mono nucleados y con una vacuola grande y visible, que se contrae y desaparece cada 45-50 segundos. Con (40X) se observan proyecciones citoplásmicas que parecen flagelos, que se extienden y retraen constantemente, denominadas acantopodios.

Los quistes tienen un tamaño de 10-25 μ m y, de forma característica, una doble pared: una externa, irregular y gruesa (ectoquiste), y otra interna redondeada, más fina y lisa (endoquiste). Si las condiciones son adversas, la pared interna del quiste va encogiéndose y adoptando formas geométricas, irregulares o estrelladas, frecuentemente en triángulo o pentágono. (Pérez-Irezábal *et al.* (2006)

6.5 SUBCULTIVOS

Si los cultivos son negativos a los 6-8 días, se realiza un subcultivo, sobre todo si lo han sido también los cultivos ordinarios para bacterias y hongos. Se procede de la siguiente manera:

- Se toma una porción de agar en forma de cuadrado de la placa de Petri, e introducirla en tubo con MP inclinado, previamente inoculado con *Escherichia coli* y con 0,3 ml de SP atemperada; mover suavemente y re incubar.



- En caso de subcultivo a partir de un tubo, tomar 0,1 ml de la fase líquida, previamente bien agitada, e inocular un nuevo tubo con MP (con *Escherichia coli* y 0,2-0,3 ml de SP). Se deben mantener los subcultivos en estufa, durante un mínimo de 20 días antes de informarlos como negativos.

Para obtener cultivos ricos en trofozoítos, los mejores resultados se obtienen realizando subcultivos seriados en placa de Petri previamente inoculada con *Escherichia coli* y humedecida con SP reciente, e incubar a 35°C.

Para mantener quistes viables es conveniente realizar subcultivos cada 1-2 meses en MP en tubo con *Escherichia coli* y en estufa de 30°C.



Fig 6.1. Raíles formados por *Acanthamoeba* spp en medio no nutritivo (100x). The Charles T. Campbell eye microbiology lab. (2011)



7. DIAGNOSTICO DE LA QUERATITIS A TRAVES DE FROTIS

Ante la sospecha de una queratitis por *Acanthamoeba* se debe practicar un extendido, raspando la superficie corneal con una espátula plana roma, en sentido paralelo a la superficie corneal. El material obtenido se coloca en una gota de agua destilada en el centro de un portaobjetos de vidrio limpio y se deja secar al aire. Una vez seco se fija con alcohol metílico de 96° por 15 minutos.

Las coloraciones empleadas en extendidos corneales para visualizar los quistes y trofozoitos de *Acanthamoeba* son múltiples siendo recomendables Giemsa y el Acido Periódico de Schiff (PAS) porque ambas son usuales en los laboratorios de patología.

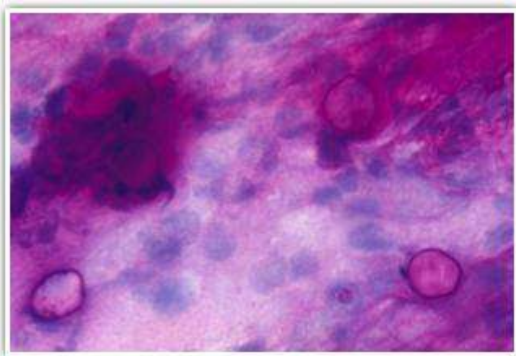


Fig. 7. (Quistes PAS x250)

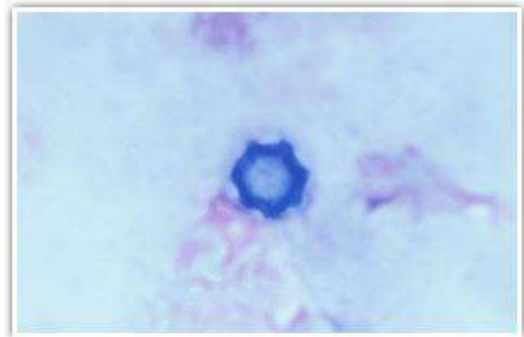


Fig. 7.1 (Quiste Giemsa x400)

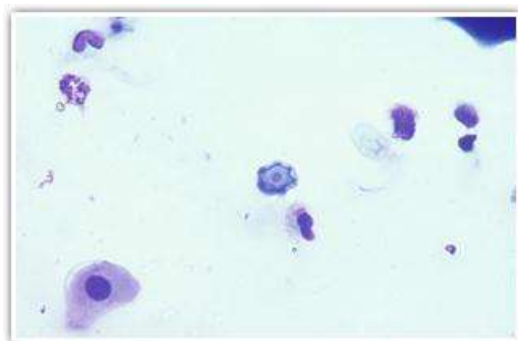


Fig. 7.2 (Quiste de *Acanthamoeba*, Giemsa x160)



Otros métodos son basados en la estimulación de fluorescencia, como el Blanco de Calcofluor (CW) y el Anaranjado de Acridina. Se requiere un microscopio de fluorescencia por reflexión y juegos de filtros en las longitudes de onda de excitación y de emisión del fluorocromo empleado.

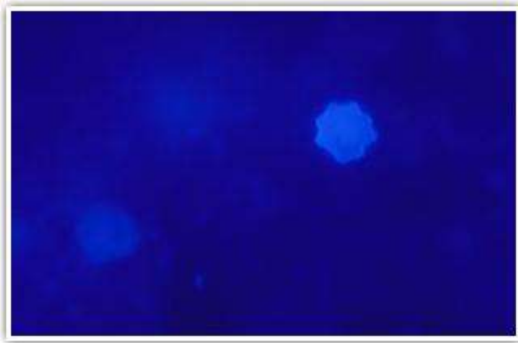


Fig. 7.3 (Quiste blanco de calcofluor x250)



Fig. 7.4 (Quistes CW x160)

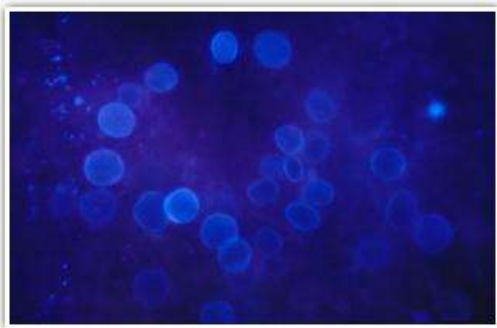


Fig. 7.5 (Quistes CW, x160)

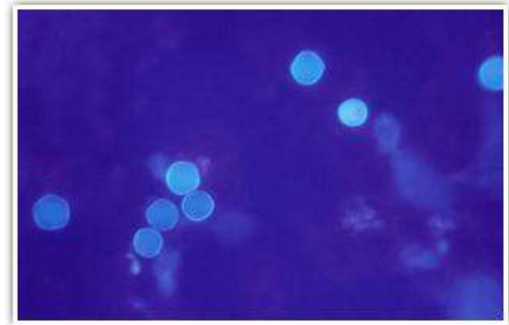


Fig. 7.6 (Quistes CW x160,)

Figuras 7-7.6. Tinciones diversas de extendidos de *Acanthamoeba* spp. Tomado de: (Francisco Barraquer C. M.D. 2009)



8. VALIDACIÓN POR PCR TIEMPO REAL Y MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN PARA EL DIAGNOSTICO DE QUERATITIS POR *Acanthamoeba* spp.

La emergencia actual de queratitis por *Acanthamoeba* spp. Y la gravedad de estas úlceras han motivado el diseño de métodos moleculares de diagnóstico. Las lesiones producidas por este parásito no siempre tienen una morfología típica en estadios precoces, pudiéndose confundir con queratitis víricas y retrasándose el tratamiento correspondiente. Se han diseñado procedimientos de PCR en tiempo real con sondas TaqMan dirigidas a secuencias específicas de la fracción 18S del ARNr. Estas técnicas permiten detectar un bajo número de quistes y trofozoitos en lesiones de portadores de lentes de contacto.

Siguiendo el protocolo publicado por Schroeder . Se usan cebadores JDP1 (5'-GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA) y JDP2 (5'-TCTCACAAGCTGCTAGGGGAGTCA), que amplifican una región del ADN ribosomal (18S rDNA) específica para el género *Acanthamoeba*. El producto de la PCR, ASA.S1 ("*Acanthamoeba*-specific amplimer" S1), presenta un tamaño que oscila entre 423 a 551 pb dependiendo del genotipo. El segmento ASA. S1, es específico del género *Acanthamoeba*.



Se realizan además estudios ultra estructurales por microscopia electrónica de transmisión donde es posible observar en el citoplasma de quistes y trofozoítos numerosas mitocondrias, vacuolas de exclusión de agua, vacuolas digestivas de contenido amorfo, gotas de lípidos, un núcleo único con nucléolo

Central esférico, complejo de Golgi y retículo endoplásmico. Figura (A)

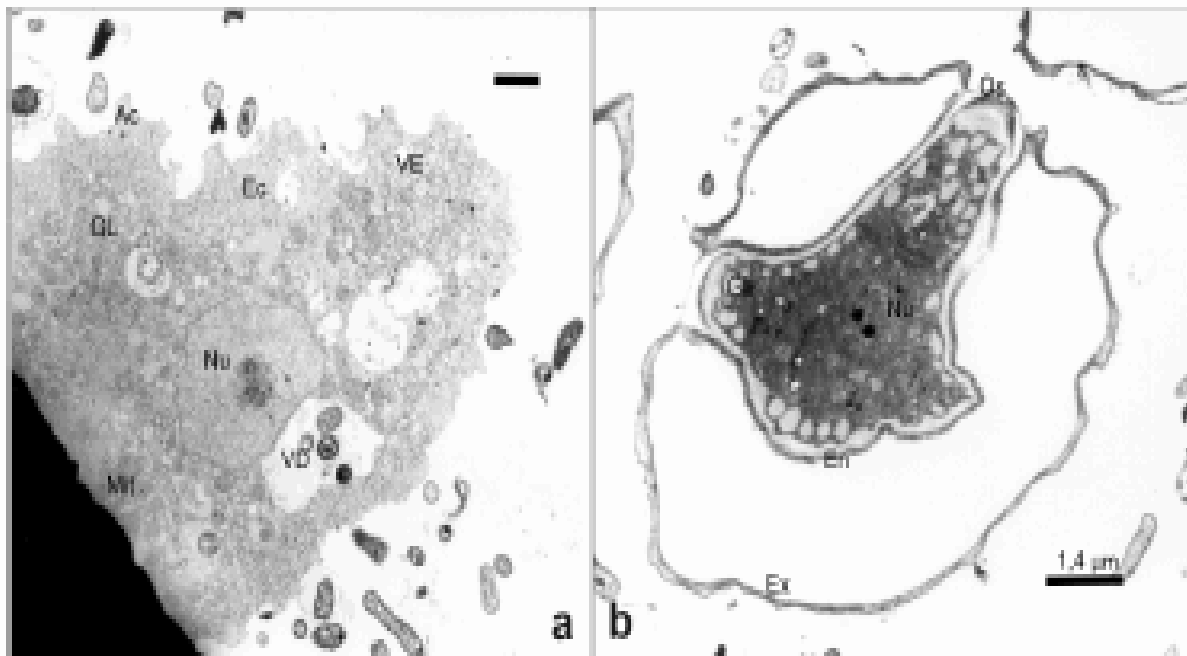


Figura 8 (A. Fotomicrografías de *Acanthamoeba* obtenidas por MET. (a) trofozoíto aislado de la biopsia; (b) quiste. Ac: acantópodos, Ec: ectoplasma, VE: vacuolas de exclusión de agua, GL: gotas de lípidos, Mit.: mitocondrias, Vd: vacuolas digestivas, Nu: núcleo, Ex: exoquiste, En: endoquiste, Os: ostiolo.



9. EPIDEMIOLOGIA

Acanthamoeba es una ameba cosmopolita y muy frecuente en el ambiente, en agua, aire y suelo, en todas las latitudes. Además se ha detectado en duchas, acuarios, humidificadores, jarrones, y otras colecciones acuosas domésticas. Así mismo, es frecuente en hospitales y se ha hallado en ventiladores, baños de hidroterapia, unidades de aire acondicionado, sistemas de irrigación dental, etc. Esta ubicuidad determina un estrecho contacto entre el hombre y *Acanthamoeba*. Sin embargo, si se exceptúa la queratitis amebiana y muy pocos casos descritos en niños inmunocompetentes, la infección está restringida a huéspedes inmunodeprimidos. En estos casos es un patógeno oportunista.

Los quistes son muy resistentes a las condiciones ambientales como temperatura, salinidad, pH; agentes físicos como calor, congelación, radiaciones ultravioleta; agentes químicos como biocidas, compuestos clorados y antimicrobianos. (eduCommons, 2012).



10. TRATAMIENTO

El tratamiento de la queratitis por *Acanthamoeba* es, fundamentalmente, médico. Desde la revisión de Bacon *et al.* Hace más de 10 años, se sabe que los antiamebianos más eficaces, hasta la fecha, son las diamidinas y las biguanidas, estas últimas de primera elección, solas o asociadas a diamidinas (ambas son quisticidas). Entre las diamidinas disponibles se encuentran el isetionato de propamidina al 0,1% (Brolene, May and Baker, Dagenham, Reino Unido), y la hexamidina, también al 0,1% (Desomedine, Chauvin, Montpellier, Francia). Ambos preparados pueden obtenerse de estos países a través de solicitud de medicamentos extranjeros. Entre las biguanidas, las más activas son la clorhexidina (CHX, Ashton Chemicals Ltd., Aylesbury, Reino Unido) y la polihexametilenbiguanida (PHMB, Avecia HQ, Manchester, Reino Unido), ambas utilizadas en colirio al 0,02% y no disponibles comercialmente. La PHMB puede solicitarse al Moorfields Eye Hospital (Londres) ya que la obtención del principio activo puede resultar complicada.

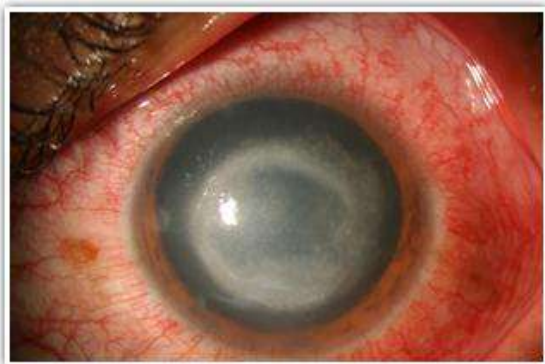


Fig. 9, Clorhexidina 0.2% cada hora



Fig. 9.1 Clorhexidina (CHX) por 13 días

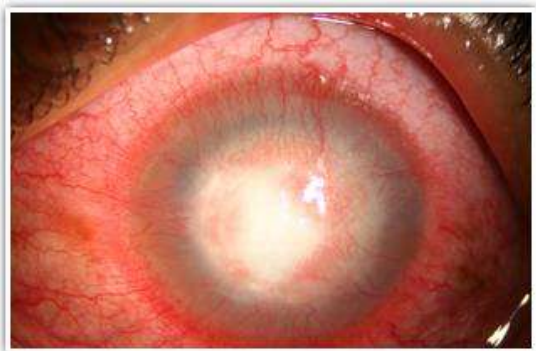


Fig. 9.2, CHX por 43 días

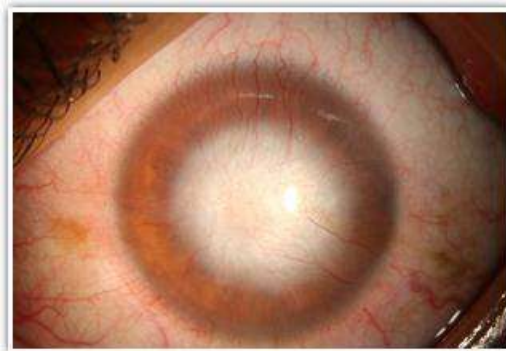


Fig. 9.3, CHX por 64 días



Fig. 9.4, 7 meses de CHX y se suspende

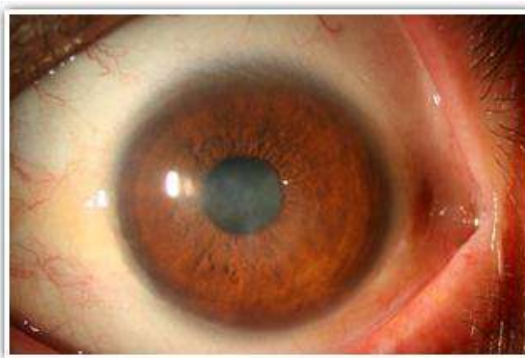


Fig. 9.5, estado a los 9 meses

Figuras 9-9.5. Respuesta del ojo al tratamiento con CHX. (Francisco Barraquer C. M.D. 2009)



11. PREVENCIÓN

A partir de 1984, coincidiendo con el incremento del número de portadores de lentes de contacto, la incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* aumentó de forma espectacular. En la actualidad, la incidencia parece haberse estabilizado, probablemente porque los factores de riesgo entre los usuarios de estas lentes se han identificado y evitado. Aún así, más del 90% de los casos que se observan podrían evitarse utilizando un sistema eficaz de desinfección, como el calor o el peróxido de hidrógeno de dos pasos, el empleo de soluciones comerciales de suero fisiológico y la regular desinfección y limpieza del estuche de las lentes.



12. RESULTADOS

La queratitis por *Acanthamoeba* spp. Se caracteriza por la presencia de trofozoítos en el tejido corneal sin llegar a ser intraocular. Puede llegar a provocar la ceguera en las personas que no tengan tanto cuidados como la administración de un medicamento y dosis adecuadas.

El diagnostico de laboratorio para la queratitis por *Acanthamoeba* spp. Se realiza del tejido corneal mediante un raspado del mismo y con la ayuda de medios de cultivo como el de PAGE, así como el empleo de Tinciones rutinarias como lo es la de Giemsa o la del Acido Periódico de Schiff (PAS) estas últimas siendo de mayor ayuda para el paciente ya que no requieren de un lapso de tiempo prolongado para llegar a un diagnóstico.



13. DISCUSIÓN

Como medidas de control se recomienda a las personas: evitar el uso de lentes de contacto cuando se realicen actividades tales como: nadar o bañarse en aguas no cloradas, o que no se conozca su procedo. Así como una higiene adecuada en los lentes de contacto. Además hay que tener un especial cuidado con las personas inmunocomprometidas y aquellas que presenten lesiones mecánicas en la cornea ya que esta amiba puede penetrar a través de la misma y provocar queratitis por *Acanthamoeba*.



14. CONCLUSIONES

- Se realizó una investigación sobre los avances más recientes y significativos de la biología y el diagnóstico de *Acanthamoeba* spp.
- Es importante el conocimiento de los cuidados que se deben tomar en cuenta para evitar la infección por *Acanthamoeba* spp. Ya que es un parásito que puede causar la pérdida total o parcial de la vista.
- Se debe conocer el ciclo de vida de *Acanthamoeba* spp. Ya que de esta forma se pueden tener las precauciones necesarias para evitar la infección por este parásito.
- La queratitis por *Acanthamoeba* spp. Es una afección cosmopolita y como tal deben tomarse las precauciones ya mencionadas en esta investigación.
- El diagnóstico por laboratorio de la queratitis es de suma importancia pues de este depende que el paciente pueda recuperarse en su totalidad.
- El proceso de diagnóstico puede ser tardado por lo tanto la clínica es de vital importancia en el tratamiento de esta parasitosis.
- El tratamiento para la queratitis por *Acanthamoeba* spp. Generalmente es difícil complicado de obtener.



15. GLOSARIO:

Abscesificación: inflamación del tejido del organismo caracterizado por la hinchazón y la acumulación de pus.

Acido Periódico de Schiff: O leucofucsina, un colorante incoloro pero que se torna rojo estable al contacto con los grupos aldehídos.

ADN ribosomal: es una secuencia de ADN contenida en los cromosomas del nucléolo que codifica ARN ribosómico.

Acantopodios: finas proyecciones citoplásmicas que parecen flagelos, pero que no lo son, que se extienden y retraen constantemente.

Biocidas: sustancias químicas sintéticas o de origen natural o microorganismos que están destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre.

Biguanidas: son moléculas o grupos de medicamentos que funcionan como antidiabéticos orales para el tratamiento de diabetes mellitus y algunos como antimaláricos.

Cariosoma: Masa densa e irregular de filamentos de cromatina en el núcleo celular.

Citolísis: es el proceso por el cual la célula se rompe, es decir, que su membrana celular se descompone, perdiéndose su material genético y deteniéndose sus procesos vitales.



Edema: es la acumulación de líquido en el espacio tisular intercelular o intersticial.

Escleritis: Es la inflamación de la esclerótica, la pared exterior blanca del ojo.

Estroma: es el armazón o entramado de un órgano, esto es su matriz extracelular, componentes fibrilares y sustancia fundamental. Además de aquellos elementos celulares conectivos que sintetizan la matriz

Hipopión: se utiliza en medicina para designar la existencia de leucocitos y fibrina en la cámara anterior del ojo, la mayor parte de las veces aséptico y que se debe a la reacción de las toxinas bacterianas

Membrana de Bowman: es una de las cinco capas de la córnea. Está localizada entre el epitelio externo y el estroma de la misma, su grosor oscila entre 8 y 14 micras. Está compuesta de fibras de colágeno y ayuda a la córnea a mantener su forma

Microscopia confocal: es un microscopio que emplea una técnica óptica de imagen para incrementar el contraste, reconstruir imágenes tridimensionales utilizando un colimador de orificio delimitante para eliminar la luz desenfocada o destellos de la lente en especímenes que son más gruesos que el plano focal.

Plasminogeno: es una glicoproteína sintetizada por el hígado, presente en el plasma sanguíneo y la mayor parte del fluido extracelular como el precursor inactivo de una enzima proteasa llamada plasmina.

Proteasas: son enzimas que rompen los enlaces peptídicos de las proteínas.



Queratitis: es una inflamación que afecta a la córnea, es decir la porción anterior y transparente del ojo.

Quiste: es un estadio en el ciclo de vida de algunos protozoarios, de animación suspendida, es decir, la forma morfológica de protección del organismo, en el que se recubre por una cubierta resistente tanto a factores físicos como químicos y permanece inmóvil e inactivo hasta que se reanuden las condiciones favorables para su supervivencia

Reacción en Cadena de la Polimerasa: conocida como **PCR** por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN particular, partiendo de un molde.

Tinción Giemsa: es un método habitual para el examen de frotis sanguíneos, cortes histológicos y otro tipo de muestras biológica.

Trofozoito: es la forma vegetativa activada que se alimenta generalmente por fagocitosis y se reproduce, a diferencia del quiste, el cual es la forma vegetativa infectante y de resistencia, en el ciclo de vida de los parásitos protozoarios.

Uveítis: es la inflamación de la úvea, lámina intermedia del ojo situada entre la esclerótica y la retina

Infiltrado corneal: se define como un acúmulo de células inflamatorias en el espesor de la córnea. Las células migran desde los vasos del limbo y desde la lágrima como respuesta a un estímulo quimiotáctico, que pudiera ser consecutivo a la liberación de sustancias en el proceso de un daño epitelial.



Abrasión corneal: es una laceración o un rasguño en la córnea.

Absceso: es una infección e inflamación del tejido del organismo caracterizado por la hinchazón y la acumulación de pus. Puede ser externo y visible, sobre la piel, o bien interno.

Queratólisis: Desprendimiento o ablandamiento de la capa córnea de la epidermis.

Solución de Page: Se utiliza para realizar cultivos de raspado corneal y se compone de:

NaCl 120mg

MgSO₄.7H₂O 4mg

CaCl₂.2H₂O 4mg

Na₂HPO₄ 142mg

KH₂PO₄ 136mg

H₂O destilada csp1000ml



16. BIBLIOGRAFÍA.

- http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S1816-89492005000200005&script=sci_arttext
- <http://212.128.130.23/eduCommons/ciencias-biosanitarias/introduccion-a-la-protozoologia-clinica-i/contenidos/Unidad%203%20Amebas.pdf>
- <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia/cap31.asp>
- <http://www.oftalmo.com/publicaciones/lentes/cap17.htm>
- <http://www.institutobarraquer.com/informacion-medica/articulos/fb-06-09-acantha/index.html>
- http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0716-10182007000600010&script=sci_arttext
- <http://www.faba.org.ar/fabainforma/391/peec01.htm>
- <http://eyemicrobiology.upmc.com/Acanthamoebae.htm>
- Salazar Schettino PM, Cabrera Bravo M, Bucio Torres MI, Haro Arteaga I de. Diagnóstico morfológico de las parasitosis. 3a. ed. México: Méndez Editores, SA de CV. 328 pp. 2011.
- (Pérez-Irezábal et al.(2006) Queratitis por *Acanthamoeba*. Servicios de Microbiología y Parasitología y de Oftalmología. Hospital de Cruces, Barcaldo, Vizcaya)
- Tay-Lara, Velasco, O., Gutiérrez M. Parasitología médica, séptima edición. Méndez Editores, México 2002.
- Koneman, Winn, Allen, Janda, Procop, Schreckenberger, Woods. Diagnóstico microbiológico texto y atlas a color, sexta edición. Editorial panamericana, España 2006.
- Julio Pérez-Irezábal, Patricia Isasa, Jorge Barrón e Inés Martinez. Queratitis por *Acanthamoeba*. Vizcaya 2009
- Daniel W. Clarke and Jerry Y. Niederkorn. The pathophysiology of *Acanthamoeba* keratitis. Dallas, TX USA April 2006.
- Naveed Ahmed Khan . *Acanthamoeba* invasion of the central nervous system. London, September 2006.



- Francine Marciano-Cabral* and Guy Cabral. *Acanthamoeba* spp. as Agents of Disease in Humans. Virginia, USA 2006.
- Bruno da Rocha-Azevedo,¹ Herbert B. Tanowitz,² and Francine Marciano-Cabral. Diagnosis of Infections Caused by Pathogenic Free-Living Amoebae. Bronx, NY June 2009.
- M. L. Gertiser, E. Giagante, E. Sgattoni, N. Basabe, F. Rivero, H. Luján, M. Occhionero, L. Paniccia, E. Visciarelli, S. R. Costamagna. Queratitis por *Acanthamoeba* spp.: primer caso confirmado por aislamiento y tipificación molecular en Bahía Blanca, provincia de Buenos Aires, Argentina. 2010
- Ruqaiyyah Siddiqui¹ and Naveed Ahmed Khan^{1,2*}, Biology and pathogenesis of *Acanthamoeba*. Pakistan 2012.
- Jercic L.M.I. (2007). Amebas de vida libre género *Acanthamoeba*. Rev Chil Infect 2007; 24 (6): 491-492
- LILIANA B LATAPIE, G. CREMONA, M. A. CARRASCO, V. E. MOLINA, J. P. BOZZINI y M. L. MARIANO. Queratitis inflamatoria por *Acanthamoeba* spp. Análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión. Argentina, 2003.

