



## ***Acanthamoeba griffini* AISLADA DE UN CASO DE QUERATITIS AMIBIANA EN MÉXICO**

Villa-Ramírez, Sandra A.G<sup>1</sup>, Vanzzini-Rosano, Virginia <sup>2</sup>, Hernández-Martínez, María Dolores<sup>1</sup>, Lucio-Cruz, David<sup>1</sup>, González-Robles, Arturo<sup>3</sup>, Salazar-Villatoro, Lizbeth<sup>3</sup>, Ramírez-Flores, Elizabeth<sup>1</sup>, Omaña-Molina, Maritza<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Facultad De Estudios Superiores Iztacala, UNAM, [sagvr89@gmail.com](mailto:sagvr89@gmail.com), [alol\\_madole@yahoo.com.mx](mailto:alol_madole@yahoo.com.mx), [nobel\\_kiddo@hotmail.com](mailto:nobel_kiddo@hotmail.com), [erf@servidor.unam.mx](mailto:erf@servidor.unam.mx), [maritzaomanam@yahoo.com.mx](mailto:maritzaomanam@yahoo.com.mx), <sup>2</sup> Hospital Asociación para evitar la Ceguera en México "Luis Sánchez Bulnes", [vivanzzini@yahoo.com](mailto:vivanzzini@yahoo.com), <sup>3</sup> Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN, [goroa@cinvestav.com](mailto:goroa@cinvestav.com), [bioagam@hotmail.com](mailto:bioagam@hotmail.com)

### **RESUMEN**

Las amibas del género *Acanthamoeba* son agentes causales de queratitis amibiana (QA), la cual es una patología ocular de curso crónico, de difícil resolución, comúnmente asociada al uso de lentes de contacto. Esta infección frecuentemente es mal diagnosticada, confundiendo con una queratitis herpética o micótica. Hasta el momento, no se ha reportado un tratamiento farmacológico de elección que resuelva favorablemente esta patología.

El presente reporte es resultado del trabajo conjunto entre el Hospital Asociación para Evitar la Ceguera en México y la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en el que se diagnosticó un caso de QA de un paciente femenino usuario de lente de contacto, la cual refirió lagrimeo, dolor severo, edema palpebral de quince días de evolución. Bajo exploración se observó úlcera corneal, hiperemia conjuntival ++, reacción ciliar, depósitos subepiteliales y neovascularización. Fue multitratada con Netira/ h, Polimixina/4 h y Miconacina/ 2 h, Clorhexidina/4 h. El caso se resolvió 2 meses después con presencia de leucoma.

A partir de un cultivo en medio no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aereogenes* (NNE), las amibas se axenizaron en medio Bactocasitona al 2% a 30° C, se identificaron taxonómicamente acorde a las claves de Page (1988). Ubicándose como *Acanthamoeba griffini*, especie relacionada con una patología corneal solo en un caso a nivel mundial. Se determinó que la cepa en estudio pertenece al grupo T3 al genotipificar la región DF3 del 18S rDNA. Cabe resaltar que la mayoría de las amibas patógenas pertenecen al grupo T4.

Se demostró que las amibas son invasivas al implementar el modelo murino de encefalitis amibiana granulomatosa, recuperándolas de tejido cerebral.

Es importante difundir el potencial patógeno de *A. griffini* como agente causal de QA.



## INTRODUCCIÓN

Las Amibas de Vida Libre (AVL) son un amplio grupo de protozoos cosmopolitas. De todos los géneros descritos, solo algunas especies llegan a actuar como parásitos para el ser humano y animales a las que se les denomina amibas anfitriónicas; en donde la fase exozoica corresponde a la de vida libre participando como depredadores que controlan las poblaciones bacterianas en el suelo (Rodríguez-Zaragoza, 1994) y la fase endozoica se presenta cuando actúan como parásitos tanto para el ser humano o animales

El género *Acanthamoeba* debe su nombre a los finos pseudópodos que emite el trofozoíto, los cuales semejan espinas, denominados acantópodos. Su ciclo de vida está conformado por dos estadios; uno trófico que se reproduce por fisión binaria y uno quístico que se mantiene inactivo con un metabolismo bajo, pero es viable incluso por años (Khan, 2009). Ambas fases pueden observarse en la naturaleza y en tejidos infectados.

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. actúan como reservorio de algunas bacterias que son 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* (Winiacka-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).

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). Las manifestaciones clínicas de QA comienzan con enrojecimiento, epifora, hiperemia, sensación de cuerpo extraño, dolor y fotofobia. Las irregularidades epiteliales y opacidades suelen observarse pero no son signos específicos de esta patología. Las pseudodentritas representan uno de los primeros signos de QA. En esta etapa las lesiones pueden ser similares a las relacionadas con queratitis por Herpes simple (Prasher *et al.*, 2004). Casos de endoftalmitis por *Acanthamoeba* son sumamente raros (Clarke *et al.*, 2005).

La incidencia de QA registrada recientemente muestra un incremento a nivel mundial. Actualmente las especies más comúnmente aisladas de casos clínicos son: *A. polyphaga* y *A. castellanii*, en menor proporción *A. rhyodes*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. quina* y *A. lugdunensis*, han sido identificadas en infecciones oculares (Visvesvara *et al.*, 2007). En México, no disponemos de datos epidemiológicos sobre infecciones amibianas.



En este estudio se presenta un caso relacionado con una especie de *Acanthamoeba* poco común, que no corresponde con las especies enlistadas. Se llevó a cabo un trabajo conjunto entre el Hospital Asociación para Evitar la Ceguera en México y la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, en el que se diagnosticó un caso de QA de un paciente femenino usuario de lente de contacto, la cual refirió lagrimeo, dolor severo, edema palpebral de quince días de evolución. Bajo exploración se observó úlcera corneal, hiperemia conjuntival ++, reacción ciliar, depósitos subepiteliales y neovascularización. Fue multitratada con Netira/ h, Polimixina/4 h y Miconacina/ 2 h, Clorhexidina/4 h. El caso se resolvió 2 meses después con presencia de leucoma.

### ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Previamente se determinó que la cepa en estudio pertenece al grupo T3 al genotipificar la región DF3 del 18S rDNA, este proceso se realizó en la Universidad de la Laguna, Tenerife, España.

Cultivo amibiano y determinación de la temperatura óptima de crecimiento.

La amiba en estudio se obtuvo a partir de un cultivo en medio no nutritivo enriquecido con *Enterobacter aerogenes* (NNE). Se axenizó en medio Bactocasitona al 2%, y se determinó que la temperatura óptima para su crecimiento se registra a los 25° C (Fig. 1).

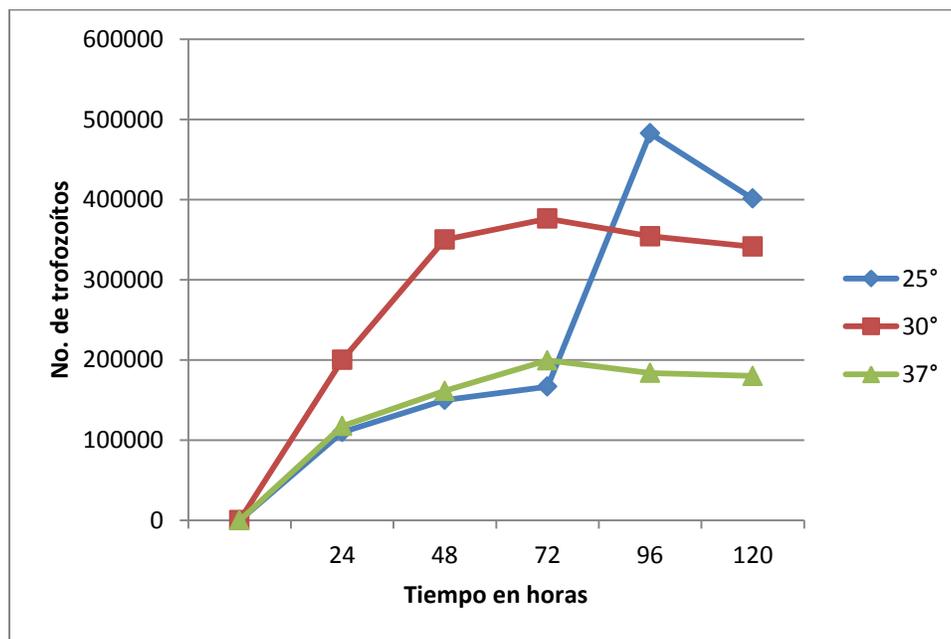


Fig. 1. Curvas de crecimiento de *A. griffini* a diferentes temperaturas. Para determinar la temperatura óptima de crecimiento se sembraron cultivos amibianos en medio axénico, se incubaron a las temperaturas evaluadas y cada 24 horas se realizaron conteos utilizando la cámara de Neubauer; la viabilidad de los trofozoitos se determinó con azul tripano. Cada determinación se realizó por triplicado. El mayor número de trofozoitos se registró a 25 °C teniendo un crecimiento exponencial a las 96 horas, a 30°C el crecimiento fue menor que a 25 °C pero constante, en cambio a 37°C el crecimiento fue considerablemente menor con respecto a las otras temperaturas.



Identificación taxonómica de la amiba en estudio.

Las amibas se identificaron taxonómicamente acorde a las claves de Page (1988). Ubicándose como *Acanthamoeba griffini*; especie relacionada con una patología corneal solo en un caso a nivel mundial (Fig. 2).

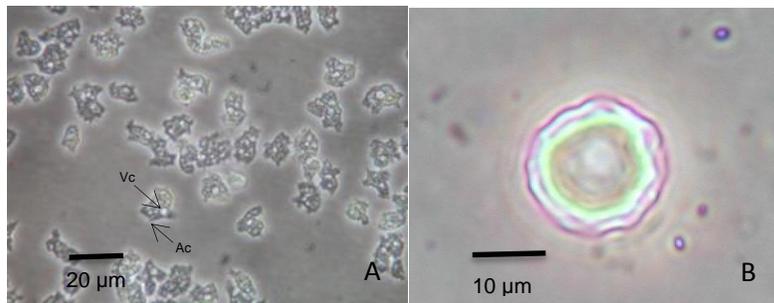


Fig. 2. Microscopia de luz 20x A). Cultivos de trofozoítos pleomórfico de tamaño 26.24 µm en promedio con presencia de acantópodos, vacuola contráctil. B) El quiste esférico, miden en promedio 14.63 µm, el endoquiste es predominantemente pentagonal, unido al ectoquiste ondulado.

#### Pruebas de patogenicidad de *A. griffini*

Se realizaron pruebas de patogenicidad utilizando el modelo murino de encefalitis amibiana granulomatosa de acuerdo a lo establecido por Culbertson (1959). Se trabajó con un lote de 5 ratones machos de 3 semanas de edad de la cepa CD-1, se inocularon con  $1 \times 10^6$  trofozoítos de *A. griffini* por vía intranasal en 20µl del medio, se les dio seguimiento a los ratones infectados durante 21 días, ninguno murió, por tanto el lote de 5 ratones se sacrificó y se hizo la disección del cerebro, pulmón, hígado y riñón (órganos blanco de la infección por estas amibas), y se depositaron en cajas Petri con medio NNE para obtener las amibas de los diferentes órganos, los resultados de recuperación fueron negativos, sin embargo; el día del sacrificio de los ratones se realizaron también improntas del cerebro y del pulmón, observándolas en forma quística en el tejido cerebral, comprobándose así su capacidad invasiva lo cual sugiere que esta especie es poco virulenta (Fig. 3)

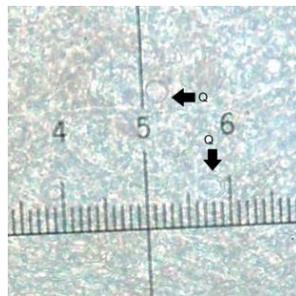


Fig. 3 Microscopia de luz.10x Quistes de *A. griffini* en tejido obtenido de impronta cerebral, posterior al sacrificio en la prueba de patogenicidad.



Interacción con células MDCK.

Se llevaron a cabo interacciones de  $5 \times 10^4$  trofozoítos en fase exponencial de crecimiento con monocapas de células MDCK en una relación 1:1 (Madin Darby Cell Kidney), mismas que se realizaron en placas de 96 pozos a diferentes tiempos de interacción (1, 3, 6, 24h) y con 6 repeticiones para cada unidad experimental. Desde la primera hora de interacción, se observó que los trofozoítos comenzaron a provocar un efecto citopático a la monocapa celular, penetrando a través de las uniones celulares, dejando incluso algunas zonas sin la presencia de la monocapa, donde se observaron numerosos trofozoítos. A las 3, 6 y 24 horas de interacción el efecto citopático se fue generalizando en todos los pozos (Fig.4).

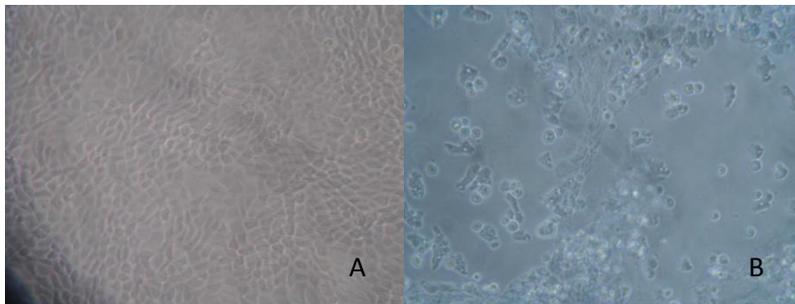


Fig. 4. Microscopia de luz.10x Interacción de células MDCK y trofozoítos de *A. griffini*. A) Monocapa control de células MDCK. B) Daño en la monocapa desde la primera hora de interacción.

## CONCLUSIONES

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

En la descripción morfológica del aislado se confirman las características de *A griffini*: en cuanto a la morfología de esta cepa, su endoquiste es variable es esférica u ovoide, con brazos cortos, el ectoquiste es ondulado; en promedio de número de brazos en el endoquiste es de 6; el diámetro es de 14.63  $\mu\text{m}$  en promedio.

La temperatura óptima de crecimiento de esta especie es de 25° C, temperatura semejante reportada para otros aislados de *Acanthamoeba* de casos de Queratitis amibiana.

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 celulares, no obstante en el modelo murino de EAG solo mostró ser invasiva, esto se confirmó al recuperar quistes de impresoras de tejido cerebral.

Es importante hacer énfasis en el diagnóstico de la QA, ya que si este es oportuno y se lleva a cabo el tratamiento adecuado el pronóstico del paciente es favorable, se debe tener mayor cuidado en usuarios de lente de contacto ya que es la población con más riesgo de contraer esta



patología pero también con pacientes con algún traumatismo corneal y que tengan contacto con agua contaminada.

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

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Band R. N. y Mohrlok S. (1973). The cell cycle and induced amitosis in *Acanthamoeba*. *J Protozool.* 20(5):654–657.
2. Bowers B. y Korn E.D. (1969). The fine structure of *Acanthamoeba castellanii* (Neff strain). II. Encystment. *J Cell Biol.* 41(3):786–805.
3. Barker J., Humphrey T.J. y Brown M.W. (1999). Survival of *Escherichia coli* O157 in a soil protozoan: implications for disease. *FEMS Microbiol Lett.* 173(2):291-295.
4. Byers T. J., Akins R. A., Maynard B. J., Lefken R. A., y Martin S. M. (1980). Rapid growth of *Acanthamoeba* in defined media; induction of encystment by glucose-acetate starvation. *J Protozool.* 27(2):216–219.
5. Brown T. J. y Cursons R.T. (1977). Pathogenic free-living amoebae (PFLA) from frozen swimming areas in Oslo, Norway. *Scand. J Infect Dis.* 9(3):237–240.
6. Chagla A. H. y Griffiths A. J. (1974). Growth and encystation of *Acanthamoeba castellanii*. *J Gen Microbiol.* 85(1):139–145.
7. Clarke D. W., Alizadeh H. y Niederkorn J. Y. (2005). Failure of *Acanthamoeba castellanii* to produce intraocular infections. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46(7):2472–2478.
8. Culbertson C. G., Smith J. W., Cohen H. K., et al. (1959). Experimental infection of mice and monkey by *Acanthamoeba*. *Am J Pathol.* 35:185-197.
9. De Jonckheere J. y 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.
10. Kahane S., Dvoskin B., Mathias M. y 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.
11. Khan N.A., *Acanthamoeba: Biology and Pathogenesis*. Ed. Caister Academic Press, Norfolk UK. 2009.
12. Khunkitti W., Lloyd D., Furr J.R. y Russell A.D. (1998). *Acanthamoeba castellanii*: growth, encystment, excystment and biocide susceptibility. *J. Infect.* 36(1):43–48.
13. Krishna-Prasad B. N. y 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.
14. La Scola B. y Raoult D. (2001). Survival of *Coxiella burnetii* within free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. *Clin Microbiol Infect.* 7(2):75–79.
15. Lloyd D., Turner N. A., Khunkitti W., Hann A. C., Furr J. R. y Russell A.D. (2001). Encystation in *Acanthamoeba castellanii*: development of biocide resistance. *J Eukaryot Microbiol.* 48(1):11–16.
16. Ly T. M. y Muller H. E. (1990). Ingested *Listeria monocytogenes* survive and multiply in protozoa. *J Med Microbiol.* 33(1):51–54.



17. Martínez A. J. Amphizotic Amoeba Human Patology. Infectious Diseases Color Atlas Monographs. En: Rondanelli (ed). Piccin Nuova Libreria. 1987.
18. Michel R., Burghardt H. y 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.
19. Neff R. J. y Neff R. H. (1969). The biochemistry of amoebic encystment. *Symp Soc Exp Biol.* 23:51–81.
20. Page F. C. (1967). Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. *J Protozool.* 14(4):709–724.
21. Page F.C. A New Key to Freshwater and Soil Gymnamoebae. Freshwater Biological Association. Ambleside, UK. 1988.
22. Prasher P., Sachdeva P., Ravinder N.B. y Sachin W. (2004). *Acanthamoeba keratitis*: a review. *NZOS.* 14(1):1–7.
23. Rodríguez-Zaragoza S. (1994). Ecology of Free Living Amoebae. *Crit Rev Microbiol.* 20(3):225-241.
24. Rowbotham T.J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *J Clin Pathol.* 33(12):1179–1183.
25. Steinert M., Birkness K. K., White E., Fields B. y 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.
26. Thom S., Warhurst D. y Drasar B.S. (1992). Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. *J Med Microbiol.* 36(5):303–306.
27. Turner N. A., Harris J., Russell A.D. y Lloyd D. (2000). Microbial differentiation and changes in susceptibility to antimicrobial agents. *J App Microbiol.* 89(5):751–759.
28. Visvesvara G., Moura H. y Schuster F. (2007). Pathogenic and oportunic free-living amoebae: *Acanthamoeba* spp., *Balamuthia mandrillaris*, *Naegleria fowleri*, and *Sappinia diploidea*. *Immunol Med Microbiol.* 50(1):1-26.
29. Winiecka-Krusnell J., Wreiber K., Von Euler A., Engstrand L. y Linder E. (2002). Free-living amoebae promote growth and survival of *Helicobacter pylori*. *Scand J Infect Dis.* 34(4):253–256.