

EXPERIENCIA CLÍNICA

Queratitis inflamatoria por Acanthamoeba spp. Análisis estructural por microscopía electrónica de transmisión

LILIANA B LATAPIE*, G. CREMONA**, M. A. CARRASCO***,
V. E. MOLINA*, J. P. BOZZINI*** y M. L. MARIANO****

INFECTIOUS KERATITIS BY ACANTHAMOEBA spp. AMOEBA STRUCTURE ANALYSIS USING TRANSMISSION ELECTRONIC MICROSCOPE.

We present the case of a 36 years old patient, who had turbid vision and a 5 week severe optic pain in her left eye at the moment of the clinical consultation. The patient had the habit to use soft contact lens along with a non-adequate hygiene. Bacteriological and virological tests have been performed with negative results. Corneal biopsy material was extracted and observed under microscopy fresh and also with permanent colouring. Trophozoites and oocystis forms of Acanthamoeba were found using xenic culture media. Colonies were observed using optical microscope and phase contrast microscope in fresh. The amoeba ultrastructure was analyzed using Transmission Electronic Microscope.

Key words: *Acanthamoeba*, Keratitis, Transmission Electronic Microscope.

INTRODUCCIÓN

Las amebas patógenas de vida libre constituyen un grupo de protozoos oportunistas que pertenecen a la Familia *Acanthamoebidae*, formado por tres géneros: *Acanthamoeba*, *Naegleria* y *Valkanphia*. Estudios taxonómicos recientes del género *Acanthamoeba* lo han dividido en 16 especies agrupadas en tres grupos; siendo aisladas frecuentemente en infecciones humanas las especies *A. castellanii*, *A. culbertsonii*, *A. polyphaga*, *A. hatchetti*. El parásito presenta dos formas biológicas: el trofozoito metabólicamente activo, que ante condiciones adversas como la privación de nutrientes se transforma en la otra

forma, el quiste. Los quistes son más resistentes a la acción de las drogas, pudiendo permanecer por años en el estroma corneal y son responsables de las recurrencias de esta enfermedad¹⁻⁴.

Estas amebas tienen la particularidad de vivir en diferentes cursos de agua. Los primeros casos de queratitis humana se aislaron en 1974^{1,2,5,6}. A partir de la década del 80, los números de casos aumentaron significativamente. El 85% de aislamientos de *Acanthamoeba* spp fueron obtenidos a través de cultivos de biopsia de córnea, proveniente de pacientes que utilizaban lentes de contacto blandas o semi-blandas⁷⁻¹². La mayoría de los casos reportados están asociados a una incorrecta limpieza de las lentes de contacto,

* Departamento de Parasitología. ANLIS Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán. Av. Vélez Sarfield 563. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. e-mail: llatapie@anlis.gov.ar/

** Servicio de Oftalmología. Htal. de Clínicas José de San Martín. Buenos Aires Argentina.

*** Servicio de Microscopía Electrónica. ANLIS Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán. Av. Vélez Sarfield 563. Capital Federal. Buenos Aires. Argentina.

**** Miembro de la Carrera de Investigador (CONICET).

empleando soluciones salinas de producción hogareña o el agua de red clorada para el enjuague de las mismas. Otros casos fueron aislados de pacientes que practicaban deportes acuáticos con lentes de contacto, sin realizar una correcta higiene posterior¹³⁻¹⁵. En menor porcentaje se han descrito casos con traumas de córnea sin uso de lentes de contacto, donde las infecciones parecen estar asociadas con vegetales contaminados¹⁶⁻¹⁷.

La queratitis presenta múltiples formas clínicas, una de ellas es la pseudo dendrita con estroma en forma de anillo que simula una queratitis herpética, esto puede retardar el diagnóstico y la instauración de un tratamiento adecuado^{10,18-22}.

El objetivo de este trabajo fue optimizar el método de cultivo a partir del método de Visvesvara et al, y confirmar el diagnóstico clínico de la queratitis, mediante el estudio por microscopía óptica y electrónica.

DESCRIPCIÓN DEL CASO

Se presenta una paciente de 36 años usuaria de lentes de contacto gas permeable con inadecuada higiene, cuyo motivo de consulta fue visión borrosa y dolor ocular severo de 5 semanas de evolución en el ojo izquierdo. Contaba con un diagnóstico previo de queratitis estromal de probable etiología herpética. La AVcc (agudeza visual) en ojo derecho (OD) era de 20/25 y el examen oftalmológico era normal; la AVcc en ojo izquierdo (OI) era de 20/100. En la biomicroscopía presentaba inyección conjuntival y ciliar, infiltrado estromal en anillo, presión intraocular 25 mmHg y fondo de ojo normal. (Figura 1).

AVCC: Aguda visual, IO: Ojo izquierdo, OD: Ojo derecho, mmHg: Milímetro de mercurio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de la muestra: Bajo anestesia local se realizó biopsia de córnea, obteniendo una lamela de 3x3 mm, que se divide en 3 lamelas pequeñas para estudio bacteriológico, parasitológico y anátomo-patológico. El transporte de la muestra se realizó en solución fisiológica estéril y con el objeto de evitar la deshidratación, la muestra se procesó dentro de los 60 minutos de la toma quirúrgica. Se realizan exámenes

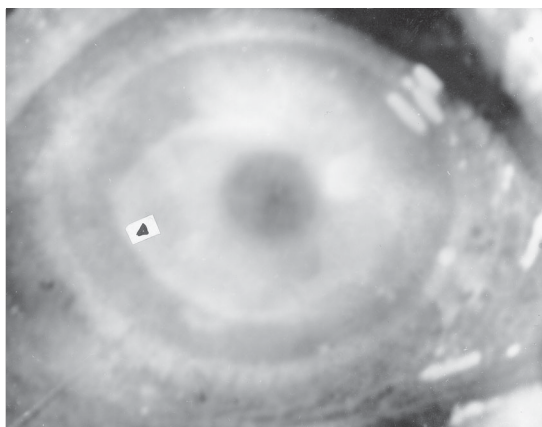


Figura 1. Ojo izquierdo. Se observa el estroma corneal en forma de anillo.

bacteriológico y parasitológico de raspado del epitelio corneal y solución de los estuches de lentes de contacto y PCR (reacción en cadena de polimerasa) para *Herpes simplex*.

Procesamiento: En el laboratorio la muestra se maceró con solución fisiológica estéril y luego se dividió en dos porciones. La primera porción se fijó con reactivo de Schaudin y se coloreó por la Técnica Tricrómica de Gomori modificada por Weatley²³. La segunda porción de biopsia fue sembrada en cultivos xénicos. La muestra fue colocada en solución fisiológica estéril suplementada con 1×10^6 ufc/ml de *Bacillus subtilis* ATCC N° 6.633. El cultivo se realizó a 35° C durante 48-72 hs. Se centrifugó a 100 G durante 2-3 minutos, el pellet obtenido fue sembrado en placa de petri con Bactoagar (OXOID) no nutritivo y en Agar Base Britania B-014-05 adicionado con un 10% de sangre humana estéril^{1,4}.

En ambos casos previo a la siembra del pellet, se realizó la siembra en forma masiva de una colonia de *B. subtilis*. Se incubó en estufa a 37°C durante 4-6 días. Colonias de *Acanthamoeba* spp fueron observadas en un preparado en fresco por microscopía y las micrografías se realizaron con un fotomicroscopio Zeiss, empleando objetivos Apo 40/1,00; Neofluar 63/1,25 y Neofluar 100/1,30; oculares Kpl 12,5x y proyectivos 3,2x y 6,3x en la obtención de negativos. Para muestras coloreadas por la técnica tricrómica de Gomori modificada por Weatley, se emplearon las mismas combinaciones ópticas. Por razones de Bioseguridad, los cultivos fueron procesados en cámara

de seguridad biológica clase II²⁴.

Microscopía Electrónica: La muestra fue tomada del cultivo en donde se observaba desarrollo de colonias. Una alícuota de la misma fue colocada en solución fisiológica y centrifugada a 100 g durante 10 minutos. El pellet obtenido fue resuspendido en fijador de Karnovsky a pH: 7-7,2 a temperatura ambiente durante 1,30 h. Se lavó en buffer cacodilato y se post fijó en Tretróxido de Osmio 1% con el mismo buffer durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó nuevamente con el buffer y se deshidrató por serie de alcoholes de gradación creciente, hasta 100%, seguido por dos pasajes en óxido de propileno. La muestra fue incluida según la técnica de Mollenhauer usando una mezcla de Poli Bed - Araldita. Para la microscopía óptica la muestra incluida, fue cortada en secciones semifinas de 2 m, coloreados con Azul de Toluidina-Azur II. Para la microscopía electrónica se realizaron cortes ultrafinos de 60 nm los cuales fueron contrastados con citrato de plomo y acetato de uranilo. Los preparados fueron observados en un microscopio electrónico ZEISS EM 109.

RESULTADOS

En los exámenes bacteriológicos y virológicos los resultados fueron negativos. En el cultivo realizado con agar sangre el resultado fue negativo. En los cultivos xénicos con los medios descritos se obtuvo desarrollo de colonia luego de 72 h de incubación, los protozoos observados presentan un solo núcleo y una doble pared, de aspecto estrellado.

Por microscopía óptica se observa que la pared del quiste, presenta una estructura doble con áreas más o menos densas, de aspecto ondulado. En el interior se ubica el cuerpo del protozoo muy denso. (Figura 2). En uno de los extremos se observan dos proyecciones relativamente cortas que limitan al ostíolo. (Figura 3).

La observación mediante microscopía óptica de campo claro permite observar en el trofozoito, el núcleo con endosoma aéreo o endosoma perinuclear muy denso y el interior con formaciones radiales. En el citoplasma se evidenciaron vacuolas con bacterias ingeridas. Todo el cuerpo está rodeado por una membrana que aparece con espesor variable, según la incidencia del corte. (Figura 4).

En el corte transversal del quiste mediante

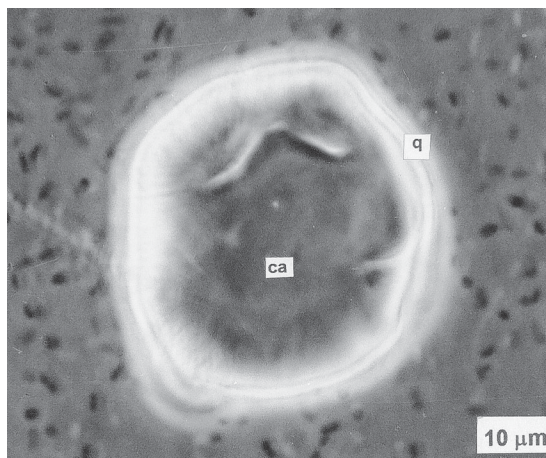


Figura 2. Imagen «in vivo» de la ameba dentro del quiste observada por microscopía de fases. (q) quiste; (ca) cuerpo de la ameba).

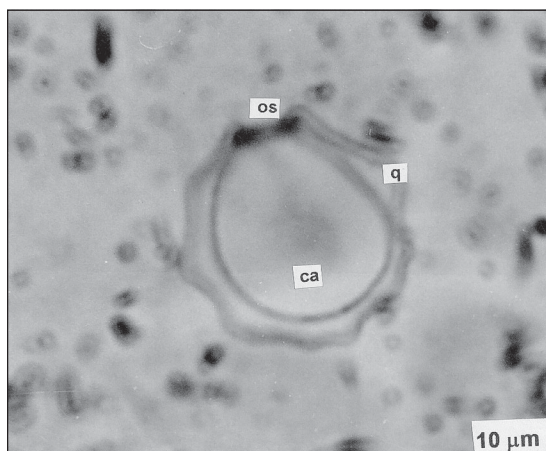


Figura 3. Imagen de la ameba dentro del quiste tomada de un cultivo recientemente fijado tal como se observa en campo claro. (ca) cuerpo de la ameba; (os) ostíolo; (q) quiste.

contraste e fases, se observa la pared con aspecto flexuoso u ondulado. En el interior se ubica el cuerpo del protozoo muy denso y sin definición de estructura. (Figura 5).

La microscopía electrónica confirma que la pared del quiste presenta una estructura doble, con áreas más o menos densas distribuidas con cierta periodicidad. Los detalles estructurales que se definen con el microscopio electrónico, son descritos en las leyendas de esta figura, con el objeto de simplificar y ayudar en la interpretación de la imagen. (Figura 6).

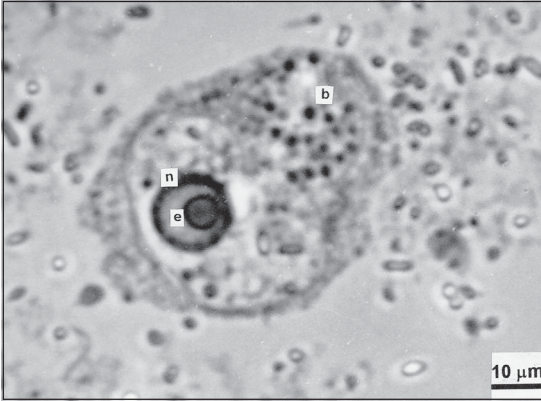


Figura 4. Imagen de un trofozoito libre «in vivo». Fotografía obtenida en contrastes de fases. (b) bacterias; (e) endosoma; (n) núcleo.

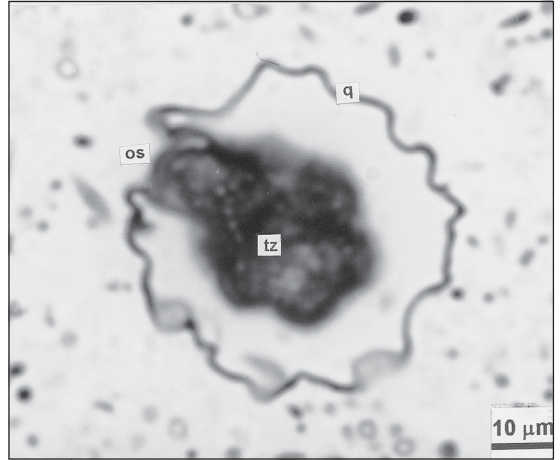


Figura 5. Corte transversal de un quiste incluido en resina coloreado con azul de metileno-azur II, y observado en campo claro. (os) ostíolo; (q) quiste; (tz) trofozoito. Todas las siguientes ilustraciones corresponden a fotografías realizadas con microscopio electrónico de transmisión.

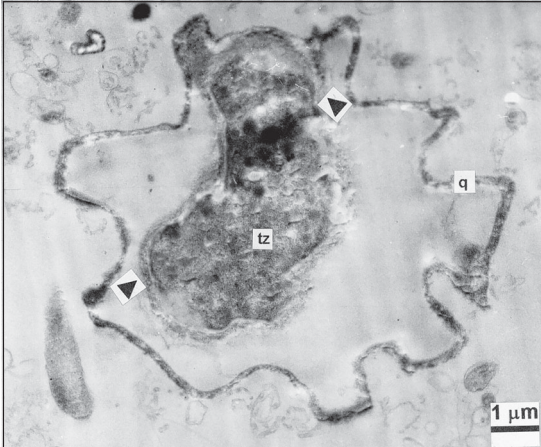


Figura 6. Fotomicrofotografía de *Acanthamoeba* spp. Se observa el quiste y en su interior el trofozoito. El quiste presenta una pared de mediano espesor, cuyo contorno es irregular con invaginaciones y evaginaciones. En un extremo se observa al trofozoito muy avanzado hacia la pared del quiste. Las flechas señalan regiones que fueron observadas con mayor escala de reproducción. (q) quiste; (tz) trofozoito.

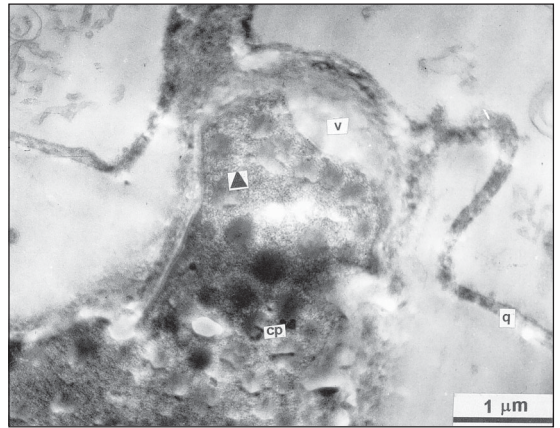


Figura 7. Se observa con respecto a la pared del quiste un extremo distal del trofozoito, se advierten en el citoplasma algunos cuerpos densos granulares, aunque en esta región la homogeneidad del contenido corporal es mayor. (cp) cuerpos lipoproteicos; (q) quiste; (re) retículo endoplasmático. El área señalada con una flecha es analizada a mayor magnificación en la figura 8.

Las observaciones subcelulares mediante el uso del microscopio electrónico de transmisión revelan en el citoplasma del trofozoito la existencia de un sistema de endomembranas, evidenciado por la presencia de retículo endoplásmico, particularmente de tipo rugoso. El reconocimiento de microtúbulos refleja la existencia de un citoesqueleto en la periferia. Se debe mencionar el

esquema de cubiertas del cuerpo del trofozoito, como muestra las Figuras 7 y 8, constituido por un sistema de membrana, cubierta media y envoltura externa; esta última de notable espesor y de naturaleza filamentosa.

Cabe señalarse la existencia de un espacio vacuolar o gran vacuola con contenido granular junto a la superficie, la que se ubica en la región

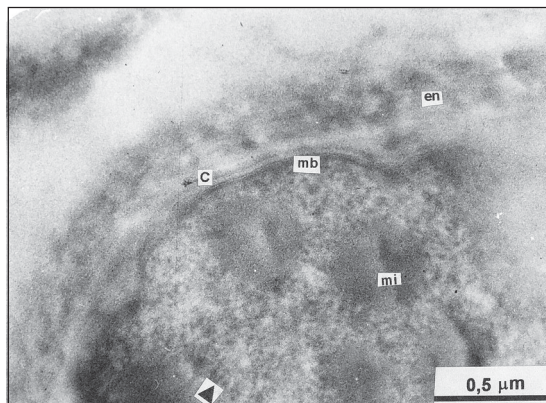


Figura 8. Detalle de la imagen anterior, zona periférica del trofozoito que muestra las membranas y envolturas del cuerpo. Hacia el interior en contacto con el citoplasma, puede observarse una membrana interna de espesor aproximado a 161 nm, formada por tres capas, dos densas, proteicas y una media posiblemente de naturaleza lipídica. Hacia fuera y mediando un espacio menos denso de 133 nm, se observa una segunda membrana, mejor denominada cubierta, de aspecto granular bastante homogénea de 230 nm. Finalmente se encuentra la envoltura del cuerpo de mayor espesor, de estructura filamentososa de aproximadamente 2,45 mm de espesor. En el citoplasma se advierte también la presencia de microtúbulos (flecha), (c) cubierta; (en) envoltura; (mb) membrana, (mi) mitocondrias.

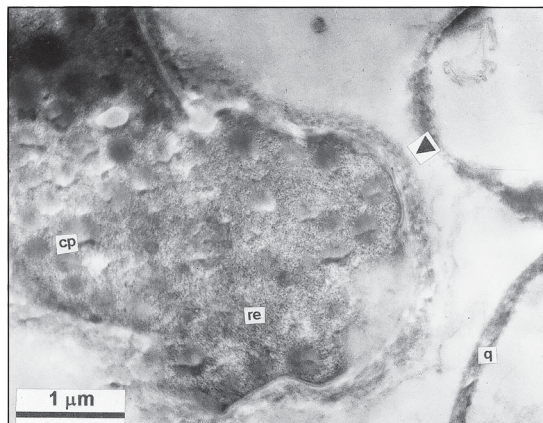


Figura 9. Detalle de la región del cuerpo del trofozoito, que ha avanzado hacia la pared del quiste, sin que aun haya tomado contacto con dicha pared, puede notarse que en esa zona el quiste presenta menor espesor que en el resto del contorno. Dentro del cuerpo del trofozoito puede observarse en el área que va a tomar contacto con el quiste, una gran vacuola o espacio vacuolar; con contenido granular concentrado en la periferia, junto a la pared del cuerpo (flecha). Hacia el interior del citoplasma del trofozoito, se observan formaciones granulares esféricas de aprox. 0,34 μm, posiblemente de naturaleza glicoproteica, que constituyen material de reserva. (cp) cuerpos proteicos; (q) quistes; (v) vacuola.

del trofozoito que va a tomar contacto con la pared del quiste, que en esta área se encuentra adelgazada, lo que sugiere un posible efecto enzimático proveniente del trofozoito. (Figura 9).

DISCUSIÓN

La queratitis por *Acanthamoeba* spp es una afección poco frecuente pero potencialmente grave, por lo tanto la sospecha clínica es fundamental para lograr un diagnóstico precoz. La muestra más utilizada para el diagnóstico es el raspado del epitelio con espátula de Kimura. En los casos de infecciones avanzadas, los microorganismos se encuentran en la profundidad del estroma corneal lo que obliga a realizar biopsia corneal o queratectomía lamelar para obtener el material adecuado²⁵. La microscopía confocal de la córnea es un estudio no invasivo, es útil para el estudio del epitelio con un posterior diagnóstico por cultivo, pero requiere un equipo muy sofisticado y costoso⁹.

Entre los distintos métodos diagnósticos que se pueden aplicar citamos la observación en

fresco con posterior métodos de coloración como por ejemplo Giemsa, PAS y Tricrómico. Si bien estas técnicas son sencillas para ser de rutina presentan poca utilidad, debido a que requieren mucho cuidado en la preparación del extendido, para evitar la ruptura de los quistes. En ocasiones debido a la presencia de células inflamatorias, células epiteliales reactivas o debridamiento celular el diagnóstico puede ser erróneo o confuso. El Calcofluor white es un agente útil para la detección de los quistes, ya que se une a la celulosa presente en la pared de los mismos^{23,26,27}. También se pueden utilizar inmunofluorescencia indirecta o inmunoperoxidasa, pero estas técnicas no son ampliamente difundidas en nuestro medio. Es importante remarcar que los métodos de coloración deben usarse en conjunción con el cultivo xénico y posterior observación microscópica, para aumentar la posibilidad de un diagnóstico correcto.

La técnica utilizada en nuestro laboratorio es el cultivo. Para recuperar el parásito se debe iniciar el procesamiento de la muestra dentro de los 60 minutos de efectuada la toma.

Se ha observado que el pasaje a través de un medio líquido como la solución fisiológica, tiene como ventaja favorecer el desenquistamiento y la rápida reproducción del protozoo. Mientras que el cultivo en medio sólido, permite recuperar y visualizar las colonias de la ameba.

Como cultivo xénico se usó agar no nutritivo enriquecido con *B. subtilis*, aunque otros autores utilizan como agente bacteriano colonias de *Escherichia coli*^{1,23}.

En consecuencia con lo referido por otros autores, los resultados obtenidos en el presente trabajo, permiten corroborar en alto grado el diagnóstico, dado que el análisis microscópico y submicroscópico confirma las similitudes del organismo en el cultivo y en la biopsia.

Se debe sospechar la presencia de *Acanthamoeba* spp en pacientes con queratitis con alguno de los siguientes factores de riesgo: Traumatismos, práctica de deportes acuáticos y náuticos, uso de lentes de contacto con higiene inadecuada, empleo de soluciones salinas hogareñas y agua de red clorada para el lavado de lentes de contacto.

Es indispensable que el material sea recolectado en forma adecuada y sea enviado con rapidez al laboratorio. Por razones de Bioseguridad, con la finalidad de disminuir los riesgos, los cultivos deben ser procesados en cámara de seguridad biológica clase II²⁴.

La metodología utilizada en el presente trabajo, permitió confirmar el diagnóstico clínico de la queratitis inflamatoria e identificar el agente etiológico. Asimismo la optimización del método de cultivo permitirá contar con una metodología apropiada para la detección de *Acanthamoeba* spp.

RESUMEN

Se presenta el caso de una un paciente de 36 años, cuyo motivo de consulta fue visión borrosa y dolor ocular severo de 5 semanas de evolución, en ojo izquierdo. La paciente tenía como hábito el uso de lentes de contacto blandas con higiene inadecuada. Fue sometida a exámenes bacteriológicos y virológicos con resultados negativos.

Para el presente estudio se extrajo material obtenido a través de una biopsia de córnea. Se realizó observación microscópica en fresco y con colorantes permanentes. Por medio de cultivos xénicos, se obtuvo trofozoitos y quistes de *Acanthamoeba* spp: Las colonias fueron

observadas con microscopía óptica en fresco y con contraste de fases. Por MET (microscopía electrónica de transmisión) se analizó la ultraestructura de la ameba.

REFERENCIAS

- 1.- MARTÍNEZ A, VISVESVARA G S. Free living amphizoic and opportunistic Amebas. Brian Pathol 1997; 7: 583-98.
- 2.- JONES D B. *Acanthamoeba* the ultimate opportunist? Am J Ophthalmol 1986; 15: 102: 527-30.
- 3.- CHRISTOPHER D, ILLINWORTH F, STUART D, COOK PHD. *Acanthamoeba* keratitis Mayor Review. Survey of Ophthalmology 1998; 42: 493-508.
- 4.- BRANDT FH, WARE DA, VISVESVARA GS. Viability of *Acanthamoeba* cysts in ophthalmic solutions. Appl Environ Microbiol 1989; 33: 1144-6.
- 5.- VISVESVARA G S, STEHR-GREEN J K. Epidemiology of the free-living amoeba infection. J Protozool 1990; 37: 25s-33s.
- 6.- CHYNN E W, TALAMO J H, SELIGMAN M S. *Acanthamoeba* keratitis: is water exposure a true risk factor? CLAO J 1997; 23: 55-6.
- 7.- MARTINEZ A J, VISVESVARA G S. Laboratory diagnosis of pathogenic free-living amoebas: *Naegleria*, *Acanthamoeba*, *Leptomixid*. Clin Lab Med 1991; 11: 861-72.
- 8.- STEHR-GREEN J K, BAILEY T M, VISVESVARA G S. The epidemiology of *Acanthamoeba* keratitis in United States. Am J Ophthalmol 1989; 107: 331-6.
- 9.- BUCK S L, ROSENTHAL R A, SCHLECH B A. Method used to evaluate the effectiveness of contact lens care solution and other compounds against *Acanthamoeba*: a review of the literature. CLAO J 2000; 26: 72-84.
- 10.- ELANDER T R, GOLDBERG M A, SALINGER C L et al. Microbial changes in the ocular environment with contact lens wear. CLAO J 1992; 18: 53-5.
- 11.- JONES D B, VISVESVARA G S, ROBINSON N M. *Acanthamoeba* polyphaga keratitis and uveitis associated with fatal meningencephalitis. Trans Ophthalmol Soc UK 1975; 95: 221-32.
- 12.- SHARMA S, SRINIVASSAN M, GEORGE C. *Acanthamoeba* keratitis in non-contact lens wearers. Arch Ophthalmol 1990; 108: 676-78.
- 13.- SADIQ S A, AZUARA-BLANCO A, BENNETT D et al. Evaluation of contamination of used disposable contact lenses by *Acanthamoeba*. CLAO J 1998; 244: 155-8.
- 14.- RADFORD C F, BACON A S, DART J K G, MINASSIAN DC. Risk factor for *Acanthamoeba* keratitis in contact lens users: a case-control study. Br Med J 1995; 310: 1567-70.
- 15.- STEHR-GREEN J K, BAYLEY T M, BRANDT F H et al. *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearer: a case-control study. JAMA 1987; 258: 57-60.
- 16.- BACON A S, FRAZER D G, DART J K G et al. A review of 72 consecutive cases of *Acanthamoeba* keratitis, 1984 - 1992. Eye 1993; 7: 719-25.
- 17.- CHYNN E W, LÓPEZ M A, PAVAN-LANGSTON D, TALAMO J H. *Acanthamoeba* keratitis. Ophthalmology 1995; 102: 1369-73.

- 18.- BUEHLER P O, SCHEIN O D, STAMLER J F et al. The increased risk of ulcerative keratitis among disposable soft contact lens users. Arch Ophthalmol 1992; 110: 1555-8.
- 19.- ILLINWORTH C D, COOK S D. *Acanthamoeba* keratitis. Surv Ophthalmol 1998; 42: 493-508.
- 20.- NAGINGTON J, WATSON P G, PLAYFAIR T J et al. Amoebic infection of the eye. Lancet 1974; 2: 1537-40.
- 21.- D'AVERSA G, STERN G A, DRIEBE W T. Diagnosis and succesful medical treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Arch Ophthalmol 1995; 113: 1120-3.
- 22.- LINDQUIST T D. Treatment of *Acanthamoeba* keratitis. Cornea 1998; 17: 11-6.
- 23.- MAKWELL E, VOGÉ MARRIETA E. Parasitología Médica 6ta edición. México. Interamericana Mc Graw Hill 1990; 825-92.
- 24.- RITCHMOND J Y, MC KINNEY R W. Bioseguridad en laboratorios de Microbiología y Medicina. 1ra edición. Atlanta. EEUU. Centro de Control y Prevención de enfermedades. CDC. 2000. Pag: 6-37.
- 25.- WRIGHT P, WARBURST D, JONES B R. *Acanthamoeba* keratitis successfully medically. Br J Ophthalmol 1985; 69: 778-82.
- 26.- WILHELMUS K R, OSATO M S, FONT R L et al. Rapid diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis using calcofluor white. Arch Ophthalmol 1986; Sep; 104: 1309-12.
- 27.- LEHMANN O J, GREEN S M, MORLET N et al. Polymerase chain reaction analysis of corneal epithelial and tears samples in the diagnosis of *Acanthamoeba* Keratitis. Invest Ophthalmol Vis Sci 1998; 39: 1261-5.

ANUNCIO

PARASITOLOGIA LATINOAMERICANA EN INTERNET

Información sobre Parasitología Latinoamericana y su versión electrónica se puede ahora encontrar en Internet. Dirección: www.scielo.cl