



**Evaluación de la eficacia in vitro
del cross-linking contra
*Acanthamoeba***

PAULA CASAS PASCUAL

BEATRIZ JIMENEZ DEL RÍO

LAURA CABEZÓN MARTÍNEZ

Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza

INTRODUCCIÓN

- *Acanthamoeba* es una de las amebas aislada con más frecuencia en muestras ambientales.
- Son una causa reconocida de infección corneal severa, especialmente en portadores de lentes de contacto
- Presenta dos formas a lo largo de su ciclo vital: trofozoíto y quiste.



- La infección por *Acanthamoeba* supone en la actualidad un reto oftalmológico
- La infección persistente se asocia a la presencia de quistes



OBJETIVO DEL ESTUDIO

Evaluar la viabilidad de dos cepas de *Acanthamoeba* tras la aplicación in vitro de terapia UVA-crosslinking



FACO
ELCHE
2012
3.0

CBM-X-LINKER

- Longitud de onda 370nm
- Calibrado antes de cada aplicación
- Radiación de 3mW/cm²
- Diámetro de aplicación de 9 mm.

MÉTODOS

Dos cepas distintas idénticamente testadas:

- *Acanthamoeba sp 65* — cepa ambiental (aislada de agua).
- *Acanthamoeba sp 7376* — cepa patógena, aislada de infección corneal humana.



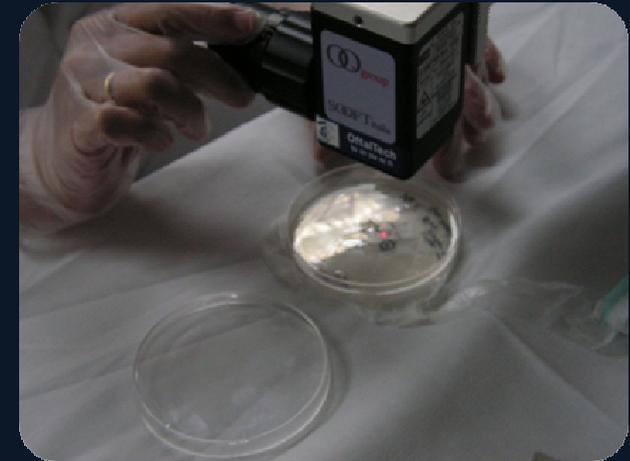
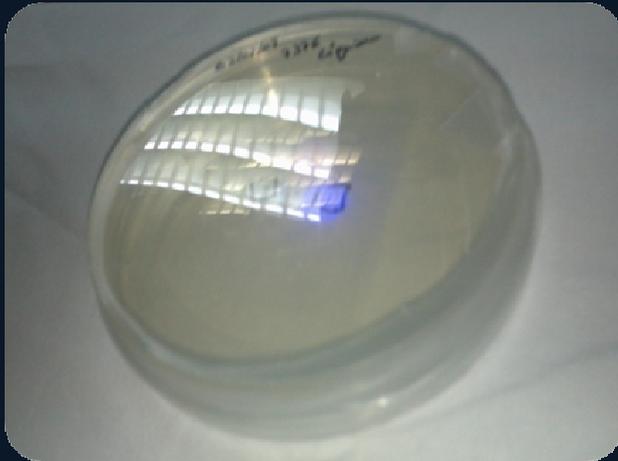
GRUPOS A ESTUDIO (con ambas especies de amebas):

- **GRUPO 1:** 0.1% riboflavina, 30 minutos exposición UVA
- **GRUPO 2:** 0.1% riboflavina, 60 minutos exposición UVA
- **GRUPO 3:** CONTROL: **NO** riboflavina, **NO** exposición UVA
- **GRUPO 4:** 0.1% riboflavina, **NO** exposición UVA

DISEÑO DEL EXPERIMENTO

- Preparación de las cepas de ameba en placas de agar no nutritivo previamente sembrados con E.Coli
- Aplicación de crosslinking con los mismos parámetros utilizados “in vivo”
- Diámetro de aplicación mayor al diámetro de la siembra
- Realización por triplicado para cada grupo

Las placas sembradas con ambas especies de amebas (incluidos los grupos control) fueron incubados a 30°C y examinados 24 horas tras el tratamiento para detectar la presencia de crecimiento.



Si las amebas eran observadas alrededor del área de siembra, el radio de migración era cuantificado, midiendo desde el punto de aplicación de la siembra hasta el punto donde el trofozoíto había migrado.

RESULTADOS

- En todos los grupos para ambas cepas , tanto quistes como trofozoítos fueron detectados a una distancia mayor a 5mm desde el punto de siembra tras el periodo de incubación **VIABILIDAD** de la ameba

- En todos los grupos para ambas cepas , tanto quistes como trofozoítos fueron detectados a una distancia mayor a 5mm desde el punto de siembra tras el periodo de incubación → **VIABILIDAD** de la ameba

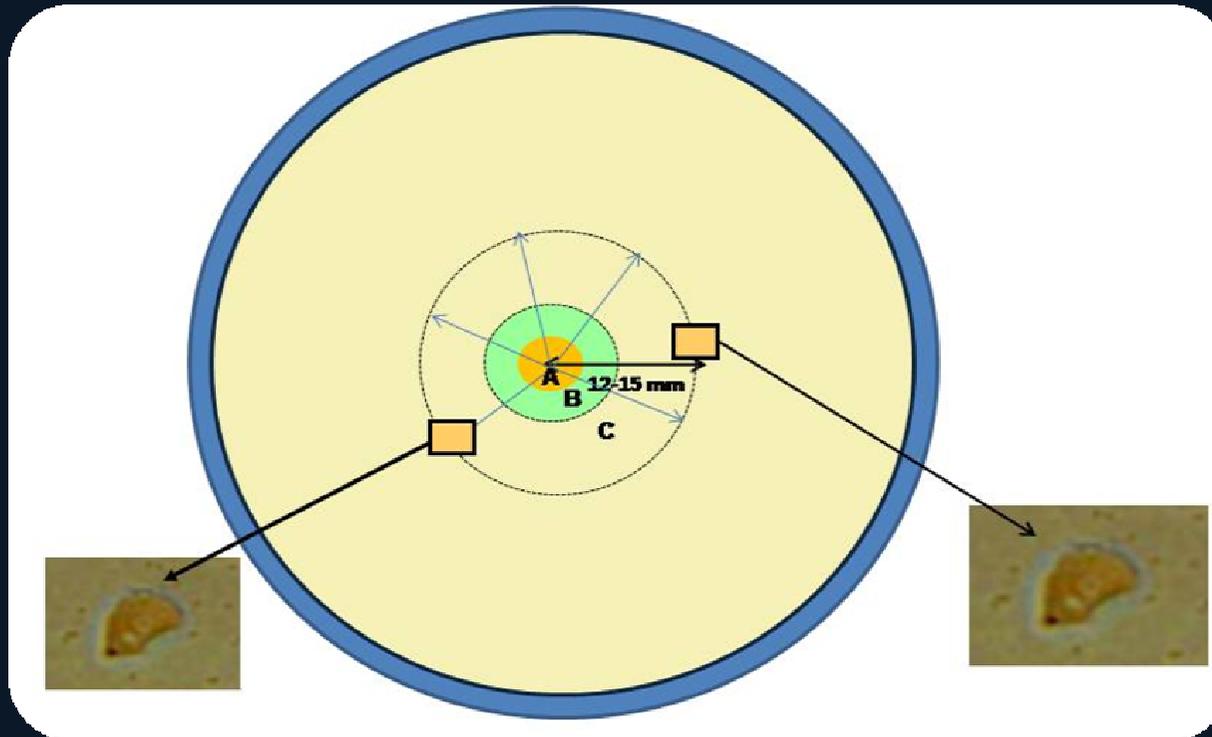
- En todos los grupos para ambas cepas, tanto quistes como trofozoítos fueron detectados a una distancia mayor a 5mm desde el punto de siembra tras el periodo de incubación → **VIABILIDAD** de la ameba

- Los trofozoítos fueron detectados a distancias similares para todos los grupos (14-15mm desde el punto de siembra). Excepto para los GRUPOS 2 de ambas cepas donde se detectó un crecimiento ligeramente menor (12mm).

- En todos los grupos para ambas cepas , tanto quistes como trofozoítos fueron detectados a una distancia mayor a 5mm desde el punto de siembra tras el periodo de incubación  **VIABILIDAD** de la ameba

- Los trofozoítos fueron detectados a distancias similares para todos los grupos (14-15mm desde el punto de siembra). Excepto para los GRUPOS 2 de ambas cepas donde se detectó un crecimiento ligeramente menor (12mm).

- La morfología de los trofozoítos a las 24 horas tras el tratamiento fue similar entre los grupos de intervención y los grupos control. Sin embargo se observó cierta **degradación** de los quistes de ameba tratados con 60 minutos de UVA (GRUPO 2)



- A. Área de siembra, diámetro inferior a 5mm.**
- B. Área de aplicación de la riboflavina e irradiación UVA, 9mm de diámetro.**
- C. Tras incubación a 30°C durante 24 horas, se detectó *Acanthamoeba* a distancias mayores de 5 mm desde el punto de siembra (12-15mm dependiendo del grupo).**



A. *Quistes de Acanthamoeba 7376 sin tratar*



B. *Trofozoítos de Acanthamoeba 7376 sin tratar*



C. *Quistes de Acanthamoeba 7376 tras tratamiento con riboflavina y 60 minutos de crosslinking. Nótese la degradación de algunos quistes en comparación con el control (figura A).*



D. *Trofozoítos de Acanthamoeba 7376 tras tratamiento con riboflavina y 60 minutos de crosslinking.*



- La eficacia de la luz UV como desinfectante ha sido testada y probada en los últimos años.
- NUESTRO ESTUDIO: criterios de crosslinking **aceptados** para el tratamiento del queratocono y descritos por Wollensak en 2003.
- Evaluación antiamebocida ***in vitro*** del crosslinking con niveles usados en la **práctica clínica** en humanos. Variables presentes en tejidos vivos (edema o melting corneal) **NO** son evaluadas en este estudio.



- La terapia **aislada** con Riboflavina **NO** es efectiva contra las dos cepas de *Acanthamoeba* testadas en nuestro estudio.

- La terapia **aislada** con Riboflavina **NO** es efectiva contra las dos cepas de *Acanthamoeba* testadas en nuestro estudio.
- La terapia **combinada** Riboflavina-UVA, tanto 30 como 60 minutos de exposición, **NO** es efectiva contra las dos cepas de *Acanthamoeba* testadas en nuestro estudio.

- La terapia **aislada** con Riboflavina **NO** es efectiva contra las dos cepas de *Acanthamoeba* testadas en nuestro estudio.
- La terapia **combinada** Riboflavina-UVA, tanto 30 como 60 minutos de exposición, **NO** es efectiva contra las dos cepas de *Acanthamoeba* testadas en nuestro estudio.
- A mayor tiempo de exposición a crosslinking, mayor degradación observada en las formas quísticas.
¡¡CUIDADO con toxicidad y daños tisulares in vivo!!

- La terapia **aislada** con Riboflavina **NO** es efectiva contra las dos cepas de *Acanthamoeba* testadas en nuestro estudio.
- La terapia **combinada** Riboflavina-UVA, tanto 30 como 60 minutos de exposición, **NO** es efectiva contra las dos cepas de *Acanthamoeba* testadas en nuestro estudio.
- A mayor tiempo de exposición a crosslinking, mayor degradación observada en las formas quísticas.
¡¡CUIDADO con toxicidad y daños tisulares in vivo!!
- Futuros estudios in vivo arrojarán más información acerca de la eficacia del crosslinking en la infección corneal





[Am J Ophthalmol](#). 2011 Oct 11. [Epub ahead of print]

Evaluation of In Vitro Efficacy of Combined Riboflavin and Ultraviolet A for Acanthamoeba Isolates.



[Am J Ophthalmol](#). 2011 Oct 11. [Epub ahead of print]

Evaluation of In Vitro Efficacy of Combined Riboflavin and Ultraviolet A for Acanthamoeba Isolates.

Gracias por su atención