



UNIVERSITAT POLITÈCNICA
DE CATALUNYA

ESCOLA UNIVERSITÀRIA D'ÒPTICA
I OPTOMETRIA

DEPARTAMENT D'ÒPTICA I OPTOMETRIA

COLONIZACION FUNGICA DE LENTES DE CONTACTO

Memoria presentada para optar al grado de
Doctora en Ciencias (sección Biológicas) por la
Universitat Politècnica de Catalunya realizada
por M^a SOLEDAD MARQUES CALVO

V^o B^o,
el director de la memoria

Dr. D. Josep M^a Torres-Rodríguez
(Departament de Genètica i Microbiologia,
Universitat Autònoma de Barcelona)

Terrassa, abril de 1998

APENDICE

1.- Formulario elaborado para acompañar cada lente de contacto hidrofílica procedente de un usuario cuyos depósitos debían ser identificados.

OPTICA
 Número de lentes

*** DATOS A COMPLETAR POR EL USUARIO**

A. DATOS DEL USUARIO

Nombre

Edad

Actividad profesional

Hábitat habitual	rural	urbano	
------------------	-------	--------	--

Fumador/a habitual	si	no	a veces
--------------------	----	----	---------

¿Se maquilla cuando lleva las lentes?	siempre	a veces	nunca
---------------------------------------	---------	---------	-------

Uso diario de las lentes	4-8h	8-12h	+ de 12h
--------------------------	------	-------	----------

¿Sufre alguna enfermedad que le obligue a tomar medicación?	si	no	
---	----	----	--

En caso afirmativo indique:

Nombre del medicamento

Duración del tratamiento

¿Esta enfermedad está relacionada con el ojo?	si	no	
---	----	----	--

En caso afirmativo indique cual

Con el uso de las lentes :

Tiene sensación de sequedad	si	no	a veces
-----------------------------	----	----	---------

Le escuecen los ojos	si	no	a veces
----------------------	----	----	---------

Tiene lagrimeo	si	no	a veces
----------------	----	----	---------

Tiene legañas	si	no	a veces
---------------	----	----	---------

Las lentes que lleva le han durado entre	1-6 meses	6-12 meses
--	-----------	------------

12-24 meses	+ de 24
-------------	---------

3.- Lágrima real (Weil & Milder 1985), sintética (Mirejovski et al. 1991) y sintética modificada utilizada en el estudio.

COMPONENTES QUIMICOS	REAL (mg/100 ml)	SINETICA (mg/100 ml)	MODIFICADA (mg/100 ml)
PROTEINAS Y GLUCOPROTEINAS			
LISOZIMA	170.00	190.00	180.00
LACTOFERRINA	150.00	180.00	160.00
GLUCOPROTEINAS α -ACIDAS	--	50.00	50.00
ALBUMINA	0.39	20.00	0.50
MUCINA	--	15.00	15.00
γ -GLOBULINAS	0.27	10.00	0.40
LIPIDOS			
COLESTERIL LINOLEATO	--	2.40	2.40
LINALIL ACETATO	--	2.00	2.00
TRIOLEINA	--	1.60	1.60
ESTER PROPILICO ACIDO OLEICO	--	1.20	1.20
DICAPROINA	--	0.32	0.32
SAL SODICA ACIDO UNDECILENICO	--	0.30	0.30
COLESTEROL	--	0.16	0.16
SALES			
CLORURO SODICO	--	662.60	640.00
CLORURO POTASICO	--	171.60	75.00
CLORURO CALCICO	--	--	48.00
CLORURO MAGNESICO	--	--	30.00
ACETATO SODICO	--	--	390.00
CITRATO SODICO	--	--	170.00
BICARBONATO SODICO	--	137.60	--
ACIDO LACTICO	--	27.00	--
CLORURO CALCICO BIHIDRATADO	--	14.70	--
BIFOSFATO SODICO BIHIDRATADO	--	10.00	--
TAMPON	--	--	418.00
GENTAMICINA	--	--	8.00

- a. Poner la solución de sales (solución salina equilibrada Alcon: cloruro sódico 6.4 mg, cloruro potásico 0.75 mg, cloruro cálcico 0.48 mg, cloruro magnésico 0.30 mg, acetato sódico 3.9 mg, citrato sódico 1.7 mg) y el tampón en un vaso de precipitados.
- b. Añadir los lípidos y colocar en un agitador con plataforma calefactora.
- c. Incorporar la mucina a la mezcla sin dejar de agitar.
- d. Añadir el resto de proteínas.
- e. Esterilizar mediante filtro Millipore de 0.22 μm de diámetro de poro.
- f. Conservar entre 4 y 8 °C durante un mes o congelar a -18 °C sin que el ciclo congelación-descongelación afecte a las propiedades de la solución.

4.- Preparación de agar maltosa de Sabouraud al 2%

Peptonas	10.0 g
D(+) maltosa	20.0 g
Agar-agar	17.0 g
Sulfato de gentamicina	0.08 g
Agua destilada	1000 ml

- a. Pesar 30 g de medio deshidratado y la gentamicina.
- b. Disolver en un litro de agua destilada y llevar a ebullición.
- c. Repartir en botellas con tapón de rosca.
- d. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

5.- Preparación de agar dextrosado de Sabouraud al 2%

Peptonas	10.0 g
D(+) glucosa	20.0 g
Agar-agar	17.0 g

Sulfato de gentamicina	0.08 g
Agua destilada	1000 ml

- a. Pesar 30 g de medio deshidratado y la gentamicina.
- b. Disolver en un litro de agua destilada y llevar a ebullición.
- c. Repartir en botellas con tapón de rosca.
- d. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

6.- Preparación del caldo dextrosado de Sabouraud al 2%

Peptona de carne	5.0 g
Peptona de caseína	5.0 g
D(+) glucosa	20.0 g
Sulfato de gentamicina	0.08 g
Agua destilada	1000 ml

- a. Pesar 30 g de medio deshidratado y la gentamicina.
- b. Disolver en un litro de agua destilada.
- c. Repartir en botellas con tapón de rosca.
- d. Esterilizar en autoclave a 121 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.

7.- Preparación del medio para el aislamiento de bacterias helicoidales

Glucosa	5.0 g
Peptona	2.0 g
Extracto de levadura	17.0 g
Vitamina B ₁₂	10 ⁻⁵ g
Tampón fosfato	15.0 ml
Solución de sales	100 ml

Solución de sulfuro sódico	10.0 ml
Agua destilada	875 ml

- Preparar la solución de sales añadiendo 0.2 g de ácido etilenediamino tetraacético a 800 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 7.0 con hidróxido potásico al 2.5%. Incorporar $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (2 g), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.75 g), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g). El volúmen de esta solución de sales se ajusta a 1000 ml con agua destilada.
- Preparar la solución de sulfuro sódico (2 g $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ /100 ml agua destilada). Autoclavar a 121 °C y 1 atmósfera durante 20 minutos.
- Mezclar los restantes componentes y esterilizar en las mismas condiciones citadas.
- Mezclar las tres soluciones poco antes de ser utilizadas.

8.- Preparación de las soluciones utilizadas en microscopía electrónica de barrido

Solución tampón

Cacodilato sódico 0.1M	50.0 ml
HCl 0.1N	2.7 ml
Agua destilada	100 ml

- Mezclar los componentes y guardar en botellas con tapón de rosca.
- El pH de la solución es de 7.4.

Fijador 1

Glutaraldehído al 2.5%	12.0 ml
Solución tampón	100 ml

- a. Preparar una solución de glutaraldehído al 2.5% diluyendo el glutaraldehído comercial.
- b. Mezclar con el tampón.

Fijador 2

Tetraóxido de osmio al 2%	12.5 ml
Solución tampón	100 ml

- a. Preparar una solución de tetraóxido de osmio al 2% con un gramo de tetraóxido de osmio disuelto en 50 ml de agua destilada.
- b. Mezclar con el tampón.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. COLONIZACION FUNGICA DE LAS LENTES DE CONTACTO HIDROFILICAS PROCEDENTES DE USUARIOS

4.1.1. COLONIZACION DE LAS LENTES DE CONTACTO SEGUN SU CONTENIDO HIDRICO

Los resultados de la colonización fúngica de las lentes analizadas se muestran en la tabla 2. De las 330 lentes estudiadas, 291 (88.18%) presentaron exclusivamente depósitos químicos y, por tanto, se eliminaron del estudio. La invasión por hongos tuvo lugar en 39 lentes (11.82%).

Se pudo determinar el contenido hídrico de 288 lentes (87.27%), de las cuales 255 (88.54%) tenían únicamente contaminantes químicos y 33 (11.46%) mostraron degradación por hongos. Presentaron depósitos químicos asociados con hongos 8 lentes, es decir, el 2.42% del total de lentes analizadas y el 20.51% de las lentes colonizadas.

Si únicamente se consideran las lentes con contenido hídrico conocido ($n = 288$), el 88.19% de las mismas ($n = 254$) estuvieron fabricadas con materiales de baja hidratación (inferior al 50%) y el 11.81% ($n = 34$) eran de alto contenido hídrico (superior al 50%). El test χ^2 puso de manifiesto que las diferencias entre las frecuencias de colonización de lentes con grado de hidrofilia menor y mayor al 50% no fueron significativas.

En la mayoría de los casos, la identificación taxonómica de los hongos contaminantes se pudo efectuar sólo a nivel de género. De todos los cultivos realizados únicamente fueron identificados los hongos que colonizaron 10 lentes de contenido hídrico inferior al 50%. Los hongos invasores de las restantes

lentes de la misma hidratación ($n = 18$) no crecieron en el medio de cultivo y, por tanto, no fue posible realizar las observaciones macroscópicas y microscópicas necesarias para su identificación.

Acremonium sp colonizó dos lentes que procedían de usuarios diferentes. *Alternaria alternata* invadió dos lentes del mismo usuario que guardaba cada noche en un estuche común para ambas. Por tanto, la misma solución humectante bañó las dos lentes. *Aspergillus niger* degradó una lente, al igual que *Gliomastix* sp. Dos lentes procedentes de distintos usuarios fueron colonizadas por *Humicola grisea*, mientras que *Phoma* sp consiguió invadir dos lentes del mismo usuario pero que ubicaba en portales independientes.

Se recibieron en el laboratorio las 6 lentes de 3 usuarios que guardaban en estuches con líquido de conservación común. Todas presentaron degradación por hongos y las colonias invasoras de cada pareja tenían las mismas características morfológicas en ambas lentes. Solamente se pudo identificar taxonómicamente a *Alternaria alternata* como especie invasora de las lentes de un usuario. En los cultivos efectuados de las otras cuatro, no crecieron colonias hecho que impidió la determinación taxonómica de los hongos invasores. Procede recordar que dichos cultivos se efectuaron, en primer lugar, a partir del líquido de suspensión de las lentes y posteriormente, en el caso que no existiera formación de colonias, a partir de las propias lentes (véase apartado 3.1.2.).

La identificación taxonómica de los microorganismos colonizadores de las lentes con contenido hídrico superior al 50% se pudo efectuar sólo en una lente, siendo *Acremonium* sp el género-forma invasor. Ni la siembra del líquido de humectación de las 4 lentes restantes, ni la de las propias lentes generaron la formación de colonias, por lo que no fue posible realizar su identificación taxonómica. En ningún caso se dispuso de las dos lentes del mismo usuario.

Según se expone en la tabla 2, no fue posible hallar el grado de hidrofilia de 42 lentes (12.73%) por presentar roturas parciales. No obstante, y a pesar de que no se dispuso de dicho parámetro, se efectuó el mismo estudio que en los

casos anteriores. Se obtuvieron cultivos de 3 de las 6 lentes colonizadas por hongos y se identificó *Aureobasidium pullulans* como invasor de 2 de ellas. Correspondían al mismo usuario que guardaba ambas lentes en un portalentes común y que, por tanto, estaban bañadas por la misma solución. *Penicillium* sp fue el hongo colonizador de la tercera lente. No crecieron colonias fúngicas del cultivo de las soluciones humectantes de 3 lentes, hecho que impidió su identificación taxonómica.

Las características macro y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*, así como la morfología de los hongos en las lentes de contacto, se exponen en el apartado 4.1.2.

Cabe indicar que nunca se obtuvo crecimiento en el laboratorio de levaduras colonizadoras. Por otra parte, tal como se comprobó microscópicamente, ninguna de las lentes analizadas fue invadida por más de un hongo. En consecuencia, a partir de la siembra e incubación del líquido de conservación de cada lente, sólo existió crecimiento de un tipo de colonias en el medio de cultivo. Cuando no se formaron colonias a partir del cultivo de dicho líquido, tampoco se originaron a partir de la siembra de la propia lente (véase apartado 3.1.2.).

Batellier et al. (1992) indicaron que la morfología del micelio invasor varía según la especie. En nuestro estudio hemos identificado, básicamente, tres modelos morfológicamente diferentes de colonización de las lentes:

A) Pueden formarse numerosas ramificaciones a partir de un punto situado en la superficie lenticular, fenómeno que condicionará a la formación de colonias compactas (este es el caso de *Phoma* sp.).

B) Es posible la aparición de muchos puntos de penetración con arborizaciones escasas, generando colonias pequeñas y aisladas (siguen este modelo *Acremonium* sp y *Aspergillus niger*).

Tabla 2.- Resultados de la colonización fúngica de las lentes de contacto hidrofílicas analizadas. Junto a cada género de hongo invasor se indica entre paréntesis el número de lentes colonizadas. Q: depósitos químicos; F: depósitos fúngicos; FQ: depósitos fúngicos y químicos asociados.

LENTE ANALIZADA (n=330)		CONTENIDO HIDRICO <50% (n=254)	CONTENIDO HIDRICO >50% (n=34)	CONTENIDO HIDRICO sin determinar (n=42)	
Lentes no colonizadas (n=291)	n	226	29	36	
	%	88.98	85.30	85.72	
Lentes colonizadas (n=39)	n	28	5	6	
	%	11.02	14.70	14.28	
Hongo colonizador		<i>Acremonium</i> (2) <i>Alternaria</i> (2) <i>Aspergillus</i> (1) <i>Gliomastix</i> (1) <i>Humicola</i> (2) <i>Phoma</i> (2) No cultivado (18)	<i>Acremonium</i> (1) No cultivado (4)	<i>Aureobasidium</i> (2) <i>Penicillium</i> (1) No cultivado (3)	
Tipo de depósito	Q	n	226	29	36
		%	88.98	85.30	85.72
	F	n	23	4	4
		%	9.05	11.76	9.52
	FQ	n	5	1	2
		%	1.97	2.94	4.76

C) Existen hongos cuyo micelio no parece penetrar en la matriz de la lente pero que permanece fuertemente anclado a su superficie (tal es el caso de *Aureobasidium pullulans* y *Alternaria alternata*).

Todas las lentes analizadas estuvieron invadidas por un hongo que morfológicamente presentó en ellas uno de los modelos indicados. Paralelamente, el cultivo en el laboratorio del líquido de conservación de la lente o de la propia lente permitió, asimismo, el crecimiento de un único hongo invasor.

4.1.2. CARACTERISTICAS MACRO Y MICROSCOPICAS DE LAS COLONIAS OBTENIDAS IN VITRO Y MORFOLOGIA DE LOS HONGOS EN LAS LENTES DE CONTACTO

Como se ha indicado en el apartado 4.1.1., 39 lentes (11.82% del total) de contacto hidrofílicas presentaron invasión fúngica asociada en ocasiones a depósitos químicos. Un total de ocho hongos colonizadores de 14 lentes (35.90% del total de lentes con contaminación fúngica) pudieron ser identificados taxonómicamente. En el presente apartado se efectúa una descripción de dichos hongos, haciéndose referencia a las características macro y microscópicas que presentaron las colonias cultivadas *in vitro*, así como la forma que adoptó el microorganismo al invadir las lentes. Los hongos invasores de las 25 lentes restantes (64.10%) que no crecieron en el medio de cultivo se describen en el apartado 4.1.3.

Todos los hongos que crecieron en el medio de cultivo y que pudieron ser identificados taxonómicamente después de las observaciones macro y microscópicas de sus colonias, pertenecen al filum-forma Deuteromycota. La clase-forma de los Hyphomycetes y de los Coelomycetes estuvieron representadas por diferentes familias-forma y géneros-forma que se indican a continuación. En este sentido, se tratarán los hongos siguientes, ordenados alfabéticamente: *Acremonium*, *Alternaria* (*A. alternata*), *Aspergillus* (*A. niger*),

Aureobasidium (*A. pullulans*), *Gliomastix*, *Humicola* (*H. grisea*), *Penicillium* y *Phoma*.

Género-forma *Acremonium*

Acremonium es un Hyphomycete del orden-forma Moniliales, perteneciente a la familia-forma Moniliaceae y fue el hongo colonizador de 3 lentes (232, 306 y 307). Dos de ellas pertenecieron al mismo usuario y las guardaba cada noche en un estuche común para ambas. La solución en la que estaban inmersas mostró abundantes y finos filamentos visibles a ojo desnudo. Dos de las lentes invadidas estaban fabricadas con un material de contenido acuoso inferior al 50% (37% según espectrofotómetro) siendo el de la tercera superior a este valor (hidrofilia del 55%). En ningún caso se presentó asociación del hongo con depósitos químicos. Debemos indicar que no se dispuso de formulario para ninguna de las tres lentes colonizadas por *Acremonium*.

Características macro y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*

La siembra y el cultivo de la solución humectante de las lentes citadas puso de manifiesto la aparición de colonias fúngicas que presentaron las siguientes características.

A 37 °C la morfología colonial fue típicamente levaduriforme y de color crema. El cultivo a 25 °C permitió el crecimiento de colonias esféricas, blancas y de aspecto algodonoso. El hongo colonizador de la lente 232 presentó surcos radiales y concéntricos poco patentes. Por su parte, los dos surcos concéntricos bien marcados de las colonias procedentes de las lentes 306 y 307 delimitaron la presencia de tres anillos. La parte más madura, que correspondía al anillo central, adoptó por el reverso una coloración más amarillenta que el resto. Ninguna de las colonias mostró surcos radiales

pronunciados. Tampoco excretaron gotas de exudado ni liberaron pigmentos en el medio de cultivo.

Con la observación microscópica de las colonias se comprobó la presencia de un micelio constituido por delgadas hifas, septadas, hialinas, con largas y muy finas fiálides en cuyos extremos se asentaron racimos de conidios alargados (4-8 μm x 2-3 μm) y que, a veces, parecían septados.

Morfología del hongo en las lentes de contacto

La observación de las tres lentes con microscopio estereoscópico no permitió ver en ellas colonias contaminantes. Estas se pusieron de manifiesto con microscopía óptica a más de 100 aumentos. Las colonias fueron siempre poco compactas, a modo de simples filamentos muy hialinos que invadieron las dos caras de las lentes. Estas presentaron, por tanto, numerosos puntos de penetración con escasas ramificaciones internas. Como ocurrió con todas las colonias no pigmentadas y poco compactas, las colonias de *Acremonium* que se desarrollaron en las lentes se observaron mejor al iluminar la lente con campo oscuro. Este procedimiento permitió destacar el delicado micelio de color blanco sobre un fondo oscuro. Las hifas invasoras mostraron una clara disposición helicoidal.

Género-forma *Alternaria*

Alternaria alternata es un Hyphomycete que pertenece a la familia-forma Dematiaceae incluida en el orden-forma Moniliales. Invadió las dos lentes (324 y 325) de un usuario que guardaba cada noche en un estuche común. El contenido hídrico de su material de fabricación fue inferior al 50% (38% según espectrofotómetro). No se dispuso de más datos sobre las lentes o su usuario. Debe indicarse que la solución que bañó ambas lentes presentó numerosos

filamentos pardos visibles a ojo desnudo.

Características macro y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*

El cultivo del líquido de humectación de ambas lentes a 25 °C durante 7 días permitió el crecimiento de colonias pardo-rojizas en la zona central y verdosas en su periferia, de aspecto aterciopelado. Numerosos surcos radiales, así como un pliegue concéntrico periférico fueron fácilmente observables. Las colonias produjeron exudado abundante, principalmente sobre los surcos radiales. El reverso permaneció de color gris durante todos los días de incubación. A los 15 días las colonias mostraron el anverso y el reverso de color gris oscuro y mantuvieron las demás características citadas.

Las observaciones con microscopía óptica nos permitieron comprobar la existencia de hifas septadas, dematiáceas, de paredes gruesas y que podían ramificarse. Destacaron los grandes conidios pardos (7-10 μm x 24-24 μm), multicelulares, con tabiques transversales y longitudinales. Su forma elongada a modo de palillo de tambor y su disposición, a veces en cadena, son características del género. La iluminación de la lente con campo oscuro confirió al hongo un color anaranjado, coloración propia de las hifas que presentan las características indicadas.

Morfología del hongo en las lentes de contacto

Las lentes presentaron gruesos y numerosos depósitos químicos esféricos, blancos, situados en su zona óptica, visibles a ojo desnudo (figura 4.1.1.). Con el microscopio óptico pudimos observar que, entre dichos depósitos y distribuidos por la superficie de las dos caras de la lente, existían filamentos dematiáceos, superficiales en ocasiones, que no tenían las paredes paralelas, sino que mostraron numerosos estrechamientos a modo de rosario (figura 4.1.2.). Los extremos de algunas hifas podían invadir la lente adoptando una

disposición helicoidal. La observación con campo oscuro permitió apreciar de nuevo la coloración anaranjada de las hifas, propia de hongos dematiáceos que forman colonias compactas.

Género-forma *Aspergillus*

Al igual que *Acremonium*, el género-forma *Aspergillus* pertenece a la familia-forma Moniliaceae, Hyphomycete del orden-forma Moniliales. *Aspergillus* colonizó la lente hidrofílica 319 con un contenido hídrico del 39% hallado experimentalmente y que no presentó alteración por depósitos químicos. No se dispuso de formulario de la lente y por tanto no se obtuvo información adicional relacionada con su limpieza y desinfección ni sobre el usuario de la misma. No obstante, apreciamos que el estuche en el cual recibimos la lente presentaba un grado muy elevado de suciedad superficial y adherida. Numerosos filamentos blanquecinos se observaron en la solución salina donde estaba inmersa la lente.

Características macro y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*

El cultivo de la solución humectante de la lente permitió identificar taxonómicamente a *Aspergillus niger* como especie colonizadora. Se obtuvo el crecimiento óptimo del hongo a 25 °C con la formación de colonias esféricas, blancas, aterciopeladas y con numerosos surcos radiales. A medida que aumentaron los días de incubación las colonias se tornaron paulatinamente de color negro, iniciándose el proceso por el centro de la colonia y extendiéndose hasta la periferia. Por tanto, desapareció el micelio estéril por la formación de conidios negros que le dan el nombre a la especie (figura 4.1.3.). El reverso de las colonias permaneció de color tostado y nunca se tornó negro. No se observaron gotas de exudado, ni pigmentos que difundieran en el medio de cultivo. El micelio aéreo también estuvo ausente.

Microscópicamente el micelio estaba dotado de hifas vegetativas septadas, hialinas que aparecían conjuntamente con hifas reproductoras dotadas de conidióforos largos, lisos, no ramificados y biseriados. La vesícula esférica originó grandes métulas y fiálides más pequeñas que formaron cadenas de conidios esféricos y, a veces, rugosos con un diámetro de 2-5 μm .

Morfología del hongo en las lentes de contacto

La observación de la lente con la lupa no permitió comprobar la presencia de colonias contaminantes. Microscópicamente se apreció que el hongo invasor no formó grandes colonias compactas, sino que las hifas hialinas y aisladas se distribuían por ambas caras de la lente y penetraban en su matriz mostrando una morfología helicoidal (figura 4.1.4.). La iluminación con campo oscuro permitió comprobar mejor su presencia. *Aspergillus niger* presentó en la lente las mismas características morfológicas que *Acremonium* sp.

Género-forma *Aureobasidium*

Dos lentes (303 y 304) fueron invadidas por *Aureobasidium pullulans*, Hyphomycete del orden-forma Moniliales perteneciente a la familia-forma Dematiaceae. Ambas pertenecían al mismo usuario que las guardaba cada noche en un estuche común. El líquido de humectación presentó numerosos filamentos pigmentados visibles a ojo desnudo. No se pudo hallar el grado de hidrofilia del material de las lentes porque se rompieron al intentar establecer el valor del parámetro con el espectrofotómetro.

Características macro y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*

Se cultivó el líquido de humectación obteniendo, a 37 °C, colonias

levaduriformes de tamaño reducido que crecieron muy poco durante todo el tiempo de incubación. A 25 °C y tres días después de la siembra se apreció el crecimiento de un hongo de color rosa con colonias circulares, brillantes y pastosas de morfología levaduriforme y que no emitían olor característico (figura. 4.1.5.). Paulatinamente el hongo fue perdiendo las características mencionadas, formó periféricamente un micelio aéreo de color pardo y perdió en esta zona el brillo y la consistencia indicada. Filamentos externos se extendieron por el medio de cultivo. Las colonias se tornaron negras a las tres semanas tanto por su anverso como por su reverso. Desapareció totalmente su aspecto levaduriforme y presentó una morfología típica de hongo filamentoso con colonias que mostraron ausencia de surcos radiales y concéntricos, sin gotas de exudado, ni pigmentos difusibles en el medio de cultivo.

Microscópicamente se comprobó la presencia de dos tipos de hifas. Unas eran hialinas, finas y de paredes delgadas que producían directamente conidios unicelulares, pequeños, elípticos y no pigmentados. Asimismo aparecieron hifas dematiáceas, muy septadas, que podían estar interrumpidas por clamidosporas. Algunas células presentaron cortas expansiones desde donde se originaron conidios hialinos, ovalados (4-6 μm x 8-12 μm) y que se multiplicaban por gemación. Estos, a veces formaron yemas (blastoconidios) y crecieron como levaduras no pigmentadas. En ocasiones formaron cadenas y se oscurecieron.

Morfología del hongo en las lentes de contacto

Con el microscopio estereoscópico se vió que la superficie de la lente no era brillante y presentaba algunas irregularidades. El microscopio óptico nos permitió comprobar que las hifas no formaron colonias compactas en las lentes y se disponían de forma aleatoria entrecruzándose entre sí (figura 4.1.6.). La presencia de hifas dematiáceas de pared gruesa fue muy elevada en relación a la de hifas hialinas. Adoptaron forma de rosario con cuentas

irregulares más o menos alargadas, muy parecidas a las hifas de *Alternaria alternata* cuando invadían las lentes. En ningún caso el micelio penetró en la matriz lenticular (figura 4.1.7.), no obstante, debía estar fuertemente adherido a su superficie ya que muy pocas hifas se liberaron en el suero fisiológico tras su agitación, así como después de ser frotadas las lentes con los dedos para intentar eliminar las hifas no invasoras. La observación de las lentes con campo oscuro permitió visualizar la coloración rojiza de las hifas.

Aureobasidium pullulans fue el único hongo aislado de las lentes de contacto, cuyas características microscópicas en el medio de cultivo y en la lente fueron prácticamente idénticas.

Género-forma *Gliomastix*

La lente 13, con un grado de hidrofilia del 36% según el espectrofotómetro, fue invadida por el Hyphomycete *Gliomastix* sp. No se dispuso de más datos sobre la lente o su usuario que nos permitieran aportar más información. Cabe indicar que, *Gliomastix* sp, al igual que *Humicola grisea* y *Phoma* sp, constituye una nueva cita de hongo colonizador de lentes de contacto hidrofílicas.

Características macro y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*

A 37 °C no se obtuvo crecimiento del hongo tras la incubación del líquido de conservación. A 25 °C aparecieron en el medio de cultivo colonias esféricas, con estrías radiales, de elevación considerable, aspecto aterciopelado y color gris de diferente intensidad según la zona. El reverso permaneció siempre gris oscuro a lo largo de todos los días de incubación. Las colonias no presentaron exudados, pero sí liberaron al medio un pigmento pardo.

Observaciones con microscopía óptica permitieron constatar la presencia de

hifas delgadas con largas fiálides y numerosos conidios. Se efectuó un microcultivo del hongo para asegurar su identificación taxonómica y nuevamente se puso de manifiesto la existencia de fiálides muy largas y delgadas que soportaron la presencia de grandes agregados de conidios dispuestos en varios planos difíciles de enfocar en su totalidad. Este tipo de micelio de *Gliomastix* sp recordó de forma sustancial al de *Acremonium* sp.

Morfología del hongo en las lentes de contacto

No se observó deterioro de la lente con microscopio estereoscópico. Se necesitó recurrir a la microscopía óptica para comprobar que ambas caras estaban invadidas por pequeñas hifas hialinas distribuidas aleatoriamente y que no formaron colonias compactas. El hongo colonizó la lente y penetró en su matriz adoptando una morfología helicoidal. Las características del micelio invasor fueron las mismas que las observadas con *Acremonium* sp.

Género-forma *Humicola*

La siembra y el cultivo del líquido de humectación de los lentes (312 y 316) permitió identificar al Hyphomycete *Humicola grisea* como la especie-forma colonizadora. No se dispuso de ningún dato sobre los usuarios de las lentes y únicamente pudimos conocer su contenido acuoso gracias al espectrofotómetro. Los valores del parámetro fueron en ambos casos inferiores al 50% (36 y 38% respectivamente). La detección de *Humicola grisea* constituye una nueva cita bibliográfica de microorganismo invasor de lentes de contacto hidrofílicas.

Características macro y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*

La incubación a 37 y 25 °C del líquido que baña cada una de las lentes dio

como resultado el crecimiento de colonias esféricas ligeramente aterciopeladas de anverso grisáceo y con tonalidades más pardas en la periferia. Asimismo, se observaron surcos radiales y concéntricos. Las colonias no difundieron pigmentos en el medio de cultivo ni presentaron gotas de exudado superficiales.

Al microscopio óptico las hifas eran hialinas con conidióforos pobremente diferenciados y no ramificados. Los conidios, esféricos, pigmentados y unicelulares se originaron de las hifas o de los conidióforos. Presentaron gemaciones y se agruparon en cortas cadenas, a veces ramificadas, constituidas generalmente por tres conidios. Ya que la identificación taxonómica del hongo colonizador de ambas lentes era difícil de confirmar, se efectuó un microcultivo (véase apartado 3.1.2.) y se procedió de nuevo a la observación microscópica del portaobjetos. Se comprobó la existencia de hifas hialinas, con fiálides piriformes (figura 4.1.8.) y cortas cadenas de oscuros conidios unicelulares en el extremo. Asimismo, la presencia de clamidosporas con una gota central de líquido contribuyó a identificar a *Humicola grisea* como el hongo colonizador.

Morfología del hongo en las lentes de contacto

A ojo desnudo se vió que las dos lentes indicadas mostraron una ligera coloración parda. Microscópicamente, multitud de pequeñas hifas, poco compactas, con morfología helicoidal habían invadido la matriz de las lentes por ambas caras. La iluminación con campo oscuro permitió observar que las hifas adoptaron una coloración ligeramente amarillenta.

Género-forma *Penicillium*

Penicillium sp, al igual que *Acremonium* y *Aspergillus* es un Hyphomycete del

orden-forma Moniliales, perteneciente a la familia-forma Moniliaceae. Se identificó como el hongo colonizador de la lente 339. Su contenido hídrico no se pudo determinar por causa de su rotura parcial producida con el espectrofotómetro. No se dispuso de más información sobre la lente y su usuario.

Características macro y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*

Se obtuvo el crecimiento óptimo de *Penicillium* sp a 25 °C con la aparición de colonias esféricas, blanquecinas, aterciopeladas y que se tornaron de color verde-azulado a medida que se desarrolló el micelio fértil. La densa producción de conidios condicionó el aspecto pulverulento de las colonias según transcurrieron los días de incubación. El número de pliegues radiales, más fácilmente observables por el reverso, también se fue incrementando paulatinamente. Pequeñas gotas de exudado aparecieron en el anverso de las distintas colonias.

Microscópicamente, las hifas eran hialinas y tabicadas. Los conidióforos, en forma de cepillo, semejantes a los dedos de una mano, presentaron mótulas ramificadas con fiálides de extremos terminales aserrados y romos de donde se originaron largas cadenas de conidios esféricos (2.5-5 μ m) y lisos.

Morfología del hongo en las lentes de contacto

A simple vista, sin necesidad de utilizar microscopio estereoscópico, se observaron cuatro manchas centrales ligeramente pardas. Con microscopio óptico se comprobó que eran gruesos depósitos químicos presentes en la cara externa de la lente. En la periferia de los mismos aparecieron hifas fúngicas hialinas que, en su mayoría, invadieron la matriz penetrando de forma helicoidal. Estuvieron también presentes fragmentos de hifas adheridas a la superficie lenticular.

Género-forma *Phoma*

Phoma sp es un miembro de la familia-forma Sphaeropsidaceae, Sphaeropsidal de la clase-forma Coelomycetes. En el estudio realizado colonizó dos lentes (301 y 302) de contenido hídrico inferior al 50% (38% según espectrofotómetro). El usuario de ambas hacía un mes que no las utilizaba y las guardaba cada noche en un estuche con dos celdillas, una para cada lente, inmersas en líquidos de suspensión separados. Se trató de un paciente con diagnóstico canceroso.

Según ha podido comprobarse, dicho género no ha sido citado anteriormente en la bibliografía como colonizador de lentes de contacto hidrofílicas, aunque sí como contaminante de estuches de lentes de contacto (Gray et al. 1995).

Características macro y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*

La siembra e incubación a 25 °C del líquido de humectación de ambas lentes condicionó el crecimiento de un hongo gris claro con un suave micelio blanquecino superficial y de aspecto aterciopelado. El reverso presentó un color gris oscuro a lo largo de los días de incubación. No aparecieron en las colonias surcos radiales ni concéntricos. Se observaron numerosos cuerpos fructíferos asexuales (picnidios), característicos del género. El hongo liberó al medio de cultivo un pigmento de color pardo y no excretó gotas de exudado superficiales.

Microscópicamente el hongo presentó hifas septadas y elípticos conidios hialinos, unicelulares. Los picnidios, con un diámetro comprendido entre las 70 y las 100 μm , eran receptáculos esféricos, huecos y estaban revestidos de conidióforos internos. Su color era pardo oscuro o negro y presentaron un ostiolo para liberar los conidios.

Morfología del hongo en las lentes de contacto

A simple vista, se observaron manchas circulares, prácticamente negras, en las dos caras de las lentes. Después de su agitación se liberaron las hifas menos adheridas y se comprobó que el hongo determinó la pérdida de brillo de la superficie de las lentes donde existió adherencia e invasión. Con microscopio óptico se observaron extensas zonas pardas constituidas por pequeñas colonias, muy próximas entre sí, formadas por hifas parduzcas que colonizaron las lentes adoptando una morfología en rosario (figura 4.1.9.). La iluminación de la lente con campo oscuro determinó la coloración amarillenta del micelio invasor.

4.1.3. MORFOLOGIA DE LOS HONGOS INVASORES DE LAS LENTES DE CONTACTO SIN CRECIMIENTO *IN VITRO*

Según se desprende de los resultados de colonización fúngica de las lentes analizadas (véase tabla 2), así como de los comentarios expuestos, no se pudo obtener el crecimiento *in vitro* de todos los hongos invasores de las lentes. Tal como se ha indicado, la falta de crecimiento colonial estuvo relacionada, posiblemente, con el tratamiento a que fueron sometidas las lentes por el contactólogo o por el usuario para intentar eliminar los depósitos presentes. No obstante, y a pesar que no se pudo proceder a su identificación taxonómica, se especifican a continuación las características morfológicas que presentaron los hongos invasores de 25 lentes de contacto hidrofílicas analizadas y que, como se ha mencionado en el apartado anterior, constituyeron el 64.10% del total de lentes colonizadas (18 con un contenido hídrico inferior al 50%, 4 con un grado de hidrofilia superior al 50% y 3 con un contenido acuoso sin determinar). Se distinguieron cuatro grupos principales de hongos, atendiendo a la morfología de sus colonias en las lentes y que, ordenados según su incidencia, fueron los siguientes: hongos con colonias compactas e hifas hialinas, hongos constituidos

por hifas hialinas que no constituyeron colonias compactas, hongos con colonias dematiáceas poco compactas y hongos con colonias dematiáceas muy compactas.

Colonias compactas con hifas hialinas

Los hongos con hifas hialinas fueron los más abundantes entre todos los invasores de las lentes analizadas. Un total de 9 lentes de contacto hidrofílicas (244, 245, 276, 296, 309, 310, 311, 320 y 321) aparecieron degradadas por compactas colonias hialinas.

- * Las lentes 244 y 245 pertenecieron al mismo usuario. Curiosamente, una de ellas tenía un contenido hídrico del 58% y la otra del 37%, según valores tomados con el espectrofotómetro. Las dos eran guardadas cada noche en un mismo estuche y compartían el líquido de suspensión. Cada una mostró dos colonias fúngicas, visibles con ojo desnudo, grandes y gruesas, que originaron un abultamiento en la cara externa de la lente (figura 4.1.10.). Las hifas adoptaron una clara disposición helicoidal, más difícilmente observable en la zona central de la colonia por la gran densidad de filamentos presentes. La lente 245 tenía además depósitos químicos asociados al hongo.

- * La lente 276 estaba constituida por un material cuyo grado de hidrofilia no se pudo establecer por producirse su rotura en el espectrofotómetro. El hongo colonizador se ubicó en la periferia de la zona óptica de la lente y fue observable a ojo desnudo como una pequeña mancha blanquecina. La observación con microscopio óptico reveló que las hifas, largas, finas y con morfología helicoidal, invadieron la lente. Las colonias hialinas y compactas dieron una coloración muy blanca y brillante sobre fondo negro cuando se iluminaron las lentes con campo oscuro.

-
- * Una colonia esférica, densamente ubicada en la zona central, invadió la lente 296 de contenido hídrico inferior al 50% (38% según espectrofotómetro). Observada con microscopio óptico e iluminada con campo oscuro mostró un color blanco brillante y un aspecto algodonoso (figura 4.1.11.). La invasión de la matriz se efectuó a partir de hifas que penetraron de forma helicoidal. La lente llegó al laboratorio acompañada de la ficha correspondiente y se pudo conocer que la usuaria era una señora de 50 años de edad, gozaba de buena salud, usaba las lentes de 10 a 12 horas al día, no era fumadora, no se maquillaba, vivía en un entorno rural y su actividad profesional estaba relacionada con la limpieza de pisos y despachos. Según indicó el contactólogo, la usuaria era poco aseada y reincidente en la colonización de lentes por hongos.

 - * El grado de hidrofilia del material de la lente 309, hallado experimentalmente, fue del 35%. Las colonias, observables a ojo desnudo, fueron numerosas, grandes, blancas y ocupaban parte de la cara interna de la lente. Se observaron con microscopía óptica y se comprobó la presencia de hifas hialinas agrupadas formando colonias compactas que adoptaron una coloración blanca al ser observadas con campo oscuro. El material estaba altamente deteriorado en las zonas de invasión.

 - * Las dos colonias de la lente 310 eran morfológicamente muy parecidas a las de la lente 309. Se observaron bien a simple vista, aunque la morfología helicoidal de las hifas invasoras sólo se puso de manifiesto mediante microscopía óptica. De nuevo la iluminación de la lente con campo oscuro permitió visualizar las colonias blancas sobre fondo negro. El grado de hidrofilia del polímero, hallado con el espectrofotómetro, fue del 37%.

 - * La lente 311, con contenido hídrico del 34%, según espectrofotómetro, fue colonizada por un hongo hialino que originó numerosas colonias muy

próximas entre sí y distribuidas por la superficie lenticular. Sólo fueron visibles con microscopio óptico, hecho que constató la presencia de hifas helicoidales que penetraron en la matriz de la lente y que fueron más fácilmente observables con el condensador de campo oscuro. Posteriormente, esta lente se procesó por congelación (véase apartado 3.1.2.) y se utilizó para realizar observaciones de las hifas invasoras (figura 4.1.12. y 4.1.13.) a través de la matriz lenticular.

- * Numerosas colonias, densas y muy pequeñas se visualizaron con microscopio óptico en la lente 320. Las hifas invasoras, hialinas y helicoidales, colonizaron la lente por ambas caras, hecho que se visualizó mejor cuando se observó con campo oscuro. El grado de hidrofilia de la lente hallado con el espectrofotómetro fue del 72% y cabe indicar que además de los depósitos fúngicos, también estuvieron presentes contaminantes químicos no asociados a los primeros. Esta lente fue sometida por el contactólogo al tratamiento Blalents de limpieza y desinfección (véase apartado 3.1.1.).

- * El contenido hídrico de la lente 321 fue de un 38%, según se estableció experimentalmente. A simple vista se observó la presencia de una colonia blanca situada próxima a la periferia. Con microscopía óptica se comprobó la existencia de hifas hialinas y helicoidales que penetraron en la matriz de la lente (figura 4.1.14. y 4.1.15.). Al igual que en las lentes anteriores, su observación mejoró gracias al condensador de campo oscuro. Cabe indicar que el estuche en el cual recibimos la lente y que era el mismo utilizado por el usuario, presentó un alto grado de suciedad superficial y adherida.

Hifas hialinas que no forman colonias compactas

Todos los hongos que no formaron colonias compactas en la matriz de las

lentes tenían hifas muy delgadas y aisladas. Por este motivo, no se observaron a ojo desnudo y se precisó del microscopio óptico para su detección. Dadas las características del micelio invasor, la iluminación con campo oscuro siempre facilitó su existencia. La morfología indicada se encontró en 9 de las lentes de contacto hidrofílicas estudiadas (11, 14, 33, 315, 322, 323, 327, 328 y 340).

- * La lente 11, con una hidratación del 36% según el espectrofotómetro, fue invadida por numerosas hifas hialinas, helicoidales, presentes únicamente en su cara externa (figura 4.1.16.). Se pudo detectar con microscopio estereoscópico en qué cara de la lente se encontraron los depósitos por la falta de brillo que le confirieron las hifas colonizadoras.

- * Se vieron en la lente 14 tres zonas de contaminación. En ellas, depósitos químicos esféricos estuvieron asociados a hifas fúngicas muy hialinas y de difícil enfoque al haber penetrado en el material de la lente con gran profundidad (figura 4.1.17.). Los diferentes sistemas de iluminación utilizados no permitieron descubrir cuál de las dos caras se vió afectada directamente por los contaminantes. Las hifas invasoras no adoptaron la morfología helicoidal característica sino que parecían constituidas por pequeñas esferas colocadas una a continuación de la otra formando cadenas mas o menos largas, a modo de rosario, cuyo origen estaba en un gran depósito químico esférico. El contenido hídrico de la lente, hallado con el espectrofotómetro, fue del 36%.

- * La lente 33 fue invadida por hifas finas, hialinas y helicoidales que, dispuestas de forma alineada, colonizaron su cara interna. El grado de hidrofilia del material de la lente establecido con el espectrofotómetro fue del 37%.

-
- * Numerosos depósitos químicos circulares, visibles a ojo desnudo, estuvieron presentes en la lente 315. Se precisó de las observaciones microscópicas para comprobar que, asociados a alguno de ellos, había delgados filamentos fúngicos muy hialinos. Las hifas invadieron la lente siguiendo una disposición helicoidal. Experimentalmente se halló el contenido hídrico de su material de fabricación que dio un valor del 55%.

 - * La observación de la lente 322 con microscopio óptico y con campo oscuro permitió comprobar la existencia de incontables hifas muy hialinas distribuidas por ambas superficies lenticulares. Adoptaron la morfología en rosario descrita en la lente 14 y penetraron ostensiblemente, hecho evidenciable por la gran profundidad de campo existente al intentar enfocar las hifas internas. El grado de hidrofilia del material de la lente fue hallado experimentalmente y dio un valor del 73 %. Se debe indicar que dicha lente fue sometida por el contactólogo al tratamiento de limpieza y desinfección Blalents (véase apartado 3.1.1.).

 - * Las características morfológicas del hongo colonizador de la lente 323 fueron prácticamente idénticas a la hifas presentes en la lente anterior. De nuevo se encontraron filamentos hialinos en forma de rosario que, en este caso, estaban asociados con depósitos químicos esféricos (figura 4.1.18.). Fueron fácilmente observables con microscopio óptico en la periferia de los mismos. El contenido hídrico del material de la lente establecido con el espectrofotómetro manual fue del 39%. Esta lente también fue tratada por el contactólogo con peróxido de hidrógeno al 3% y calor para intentar eliminar los depósitos existentes por su cara externa.

 - * Las lentes 327 y 328 correspondieron a un mismo usuario, el cual las desinfectaba cada noche y las guardaba en un estuche común. El contenido acuoso del material de fabricación de las dos lentes fue inferior al 50% (38%

según espectrofotómetro). La observación de las hifas con microscopio óptico y con campo oscuro permitió comprobar que los filamentos fúngicos estaban repartidos por toda la lente, de manera aleatoria y por ambas caras. Las hifas invasoras eran helicoidales.

- * La lente 340, observada a ojo desnudo, permitió comprobar la presencia de un gran depósito químico, grueso y prominente en el borde de su cara externa. La microscopía óptica, y principalmente la iluminación con campo oscuro, facilitó la identificación de finas hifas hialinas observables en la periferia del depósito químico y que invadían la lente adoptando una morfología helicoidal. Se intentó hallar el grado de hidrofilia de la lente con el espectrofotómetro, pero no fue posible ya que la lente se rompió durante el proceso.

Colonias dematiáceas poco compactas

La incidencia de hongos que formaron colonias dematiáceas poco compactas en las lentes fue inferior que la de los grupos anteriores. Tan sólo 4 lentes presentaron colonias con la morfología indicada (32, 35, 75, 313).

- * Se halló experimentalmente el contenido hídrico de la lente 32 dando un valor del 37%. Las pequeñas colonias fúngicas, a modo de filamentos dematiáceos, se repartieron aleatoriamente por ambas caras de la lente (figura 4.1.19.), hecho que fue más fácilmente constatado iluminándola con campo oscuro. Los hongos que adoptan en lente las características indicadas dan tonalidades amarillentas o anaranjadas, según el grosor de la pared de las hifas y el grado de asociación de las mismas. Las hifas invasoras mostraron morfología helicoidal.

-
- * A ojo desnudo pudo observarse que el hongo colonizador de la lente 35 se encontraba en su cara interna y ocupaba aproximadamente un cuarto de su zona periférica y óptica. El análisis microscópico permitió comprobar que las hifas dematiáceas eran anchas, de aspecto irregular a modo de rosario, cuyas cuentas podían ser esféricas o elípticas. Parecían estar adheridas a la superficie lenticular, ya que no se observó su penetración en la matriz (figura 4.1.20.). Los filamentos eran de longitud variable y, en ocasiones, presentaron roturas. Se frotó la lente con la mano utilizando surfactante y suero fisiológico, con el objetivo de eliminar las hifas superficiales. La observación microscópica reveló que el hongo debía estar muy fuertemente fijado a la lente, ya que la mayoría de las hifas permanecieron adheridas. Sus gruesas paredes condicionaron la coloración anaranjada al ser observadas con campo oscuro. El contenido acuoso del material fue inferior al 50% (39% según espectrofotómetro). Las características morfológicas del micelio colonizador de esta lente fueron muy parecidas a las descritas para *Aureobasidium pullulans*, invasor de las lentes 303 y 304.

 - * El microscopio estereoscópico no facilitó la observación del hongo colonizador de la lente 75, que presentaba un grado de hidrofilia del 40% hallado experimentalmente. Fue necesario el microscopio óptico para comprobar que las hifas, distribuidas aleatoriamente por ambas caras de la lente, formaban incontables colonias a modo de filamentos que se introducían en la matriz lenticular de forma helicoidal. Estas características morfológicas coinciden con las observadas en la lente 32.

 - * La lente 313, fue invadida por un hongo visible sólo con microscopio óptico. Morfológicamente no se diferenciaba su micelio del que alteró las lentes 32 y 75. El número de filamentos colonizadores fue ostensiblemente menor y, en general, no formaron colonias compactas (figura. 4.1.21.). El contenido hídrico del material de la lente fue establecido con el espectrofotómetro y dio un valor del 39%.

Colonias dematiáceas muy compactas

Los hongos que formaron colonias dematiáceas muy compactas en las lentes fueron los de menor incidencia de los cuatro grupos establecidos. Se incluyeron en él tan sólo 3 de las lentes de contacto hidrofílicas estudiadas (31, 314 y 326). La diferente pigmentación y grosor de las paredes de las hifas, así como la densidad de los filamentos que formaron las colonias, proporcionó al micelio invasor una coloración anaranjada o rojiza cuando se iluminaron las lentes con campo oscuro.

- * La lente 31 estaba altamente deteriorada por depósitos químicos y fúngicos no asociados a los primeros. A ojo desnudo se vió que los hongos se encontraban en la zona óptica de la lente. El microscopio óptico permitió observar que 4 colonias fúngicas dematiáceas, grandes y densas invadieron la lente. Al utilizar el condensador de campo oscuro las paredes gruesas y pigmentadas de las hifas dieron una coloración anaranjada en la periferia y rojiza en el centro (figura 4.1.22.). Las colonias invadieron la cara externa de la lente, adoptando sus hifas una morfología típicamente helicoidal. El contenido acuoso de la lente, hallado experimentalmente con el espectrofotómetro, fue del 36%. Posteriormente, esta lente se procesó por congelación (véase apartado 3.1.2.) y se utilizó para realizar observaciones de las hifas invasoras (figura 4.1.23. y 4.1.24.) a través de la matriz lenticular.

- * Colonias dematiáceas, pequeñas y poco numerosas, colonizaron la zona periférica de la lente 314 por su cara interna. A pesar de su reducido tamaño se pudieron observar a simple vista dado su elevado grado de pigmentación y la disposición tan compacta de sus hifas. La morfología helicoidal del micelio invasor también se apreció en esta lente. De nuevo se comprobó la presencia de un hongo rojizo cuando se observó iluminado con campo oscuro (figura 4.1.25.). El espectrofotómetro dio un valor del contenido hídrico del 38%.

-
- * A ojo desnudo se observó la existencia de 4 manchas pardas en la zona óptica de la cara externa de la lente 326. Con microscopio óptico y condensador de campo oscuro pudo apreciarse que se trataba de un hongo dematiáceo, de color rojizo en la zona central de la colonia y más anaranjado en su periferia. Hifas espiraladas invadieron la lente cuyo grado de hidrofilia no se pudo determinar al romperse mientras se establecía este parámetro. El usuario era un varón de 20 años que se encontraba cumpliendo su servicio militar y cuidaba muy poco la higiene de sus lentes.

4.1.4. ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LAS LENTES DE CONTACTO

Se explican a continuación los resultados obtenidos a partir de la observación de diferentes lentes hidrofílicas procedentes de usuarios mediante microscopía electrónica de barrido (véase apartado 3.1.2.).

Según se indicó en el apartado 4.1.2., la identificación taxonómica del hongo colonizador de las lentes 303 y 304 reveló la presencia de *Aureobasidium pullulans*. Por su parte, fue *Acremonium* sp el hongo invasor de las lentes 306 y 307. Las características macroscópicas y microscópicas de las colonias obtenidas *in vitro*, así como la morfología de los hongos en las lentes de contacto al ser observadas con microscopía óptica, fueron expuestas en el mismo apartado.

Las observaciones con el microscopio electrónico de barrido de las lentes colonizadas por los hongos indicados permitieron valorar el biodeterioro de la superficie de las lentes cuando se produjo su colonización, así como comprobar la presencia de formaciones filamentosas superficiales, más o menos ramificadas, que podían cubrir una gran parte de su superficie o, por el contrario, quedar circunscritas a un área reducida. Rodeando las mismas, quedaron patentes zonas con una densidad a los electrones distinta a la del propio micelio y a la existente en la superficie lenticular no colonizada, que parecían corresponder al glucocálix o matriz extracelular liberada por los microorganismos.

En general, el procedimiento utilizado para preparar las muestras y poder ser observadas microscópicamente y/o el lavado de las lentes mediante su fricción con los dedos para eliminar de forma mayoritaria el micelio superficial, originó la alteración y rotura de las colonias fúngicas, tal como se observa en la imágenes que a continuación se indican.

El micelio superficial de una colonia de *Acremonium*, así como cristales de cloruro sódico sobre la lente quedan patentes en la figura 4.1.26. Las hifas poco ramificadas del hongo se extienden por una de las caras y alteran de forma significativa el polímero (figura. 4.1.27.). El diámetro de las hifas superficiales del hongo colonizador fue variable, pudiendo estar presentes filamentos más o menos gruesos que no superaron en ningún caso los 3.5 μm y que en ocasiones conseguían invadir el material (figura 4.1.28.). Asimismo, aparecen en la misma fotografía una gran cantidad de bacterias adheridas al material que revelan la deficiente conservación de las lentes por parte de su usuario. En la figura 4.1.29. se muestra el espesor y parte de una de las caras de la lente de contacto 306. Pueden observarse numerosas evaginaciones de la superficie de la lente provocadas por las hifas internas. Por otra parte, procede indicar que al limpiar las lentes colonizadas por *Acremonium* con los dedos, previamente a ser procesadas para su observación con microscopía electrónica, se consiguió romper de forma prácticamente transversal, un gran número de hifas que habían conseguido invadir el material. Este hecho permitió obtener imágenes de la parte del micelio que, una vez en contacto con la superficie de la lente, ya se había introducido en ella. Se muestran en las figuras 4.1.30. y 4.1.31. los orificios que resultaron después del proceso indicado y que corresponden al interior y a la pared de las hifas invasoras. Asimismo, se observa la irregularidad y deterioro del material una vez que fue colonizado por el hongo y se insinúa parte del recorrido del micelio en la matriz de las lentes.

El aspecto morfológico que presentó el micelio de *Aureobasidium pullulans* fue muy distinto al observado en el caso de *Acremonium*. Según se indicó en el apartado 4.1.2., la observación con microscopía óptica de las lentes colonizadas por aquel permitió comprobar que las hifas fueron siempre superficiales y no

penetraron en el material de las lentes. Se cotejaron dichas observaciones con las efectuadas con microscopía electrónica de barrido a pocos aumentos y se corroboraron las características del micelio colonizador (figura 4.1.32.). Estaban presentes en las lentes diferentes tipos de hifas que seguían una disposición más o menos rectilínea y que podían entrecruzarse, pero en ningún caso formaron colonias compactas. Debían estar fuertemente adheridas a la superficie del material ya que la acción mecánica de los dedos al limpiar las lentes con el surfactante no fue suficiente para eliminar el micelio adherido.

El análisis de las lentes colonizadas por esta especie permitió además observar un gran número de bacterias indicadoras del deficiente mantenimiento de las mismas llevado a cabo por su usuario. Asimismo, se observaron tanto en la superficie de las lentes como en la del hongo, pequeñas estructuras helicoidales y rectilíneas con un radio de curvatura constante. En este último caso, podía comprobarse su posible génesis en las propias hifas desde donde, generalmente, emergían perpendiculares a su superficie (figura 4.1.33.). Su diámetro adoptó en todas las estructuras valores muy similares (0.25 μm de media) y una longitud variable que osciló entre 1 y 2 μm . Según se ha indicado, en ocasiones, estructuras helicoidales más cortas aparecían dispersas en la superficie de la lente, como si emergieran del polímero, sin asociación aparente con las hifas (figura 4.1.34.). En estos casos, únicamente se observó su parte distal y no su posible origen en el micelio.

En las figuras 4.1.35. y 4.1.36. se muestran dos pares estereoscópicos en los que, mediante un estereoprisma, pueden observarse en tres dimensiones las hélices cilíndricas asociadas al hongo y la relación espacial que ayuda a determinar la distancia existente entre ellas y el microorganismo colonizador de las lentes. En este sentido, la asociación fue íntima ya que no se apreció separación entre las estructuras y las hifas fúngicas. La generación de los pares estereoscópicos fue expuesta en el apartado 3.1.2. de la memoria.

La morfología de las hélices cilíndricas podría, en principio, recordar a la que poseen las bacterias helicoidales, o quizás tratarse de una estructura de anclaje

de algunas cepas o hifas de especies fúngicas ante determinados tipos de polímeros. Para intentar asegurar la posible presencia de dichos microorganismos se repitió el cultivo del líquido de suspensión de las lentes, así como de fragmentos de las mismas, según se especifica en el apartado 3.1.2. y nunca se obtuvo el crecimiento de dichos microorganismos. Ambas hipótesis serán comentadas en la discusión de los resultados (véase apartado 5.3.).

Iconografía 4.1.

Figura 4.1.1.- Depósitos químicos esféricos asociados con hifas de *Alternaria alternata* en la lente 324. (Microscopía óptica, campo oscuro, 50 x).

Figura 4.1.2.- Filamentos dematiáceos de *A. alternata* sobre la lente de contacto 324 y disposición helicoidal del extremo de una hifa invasora (flecha). (Microscopía óptica, 500 x).

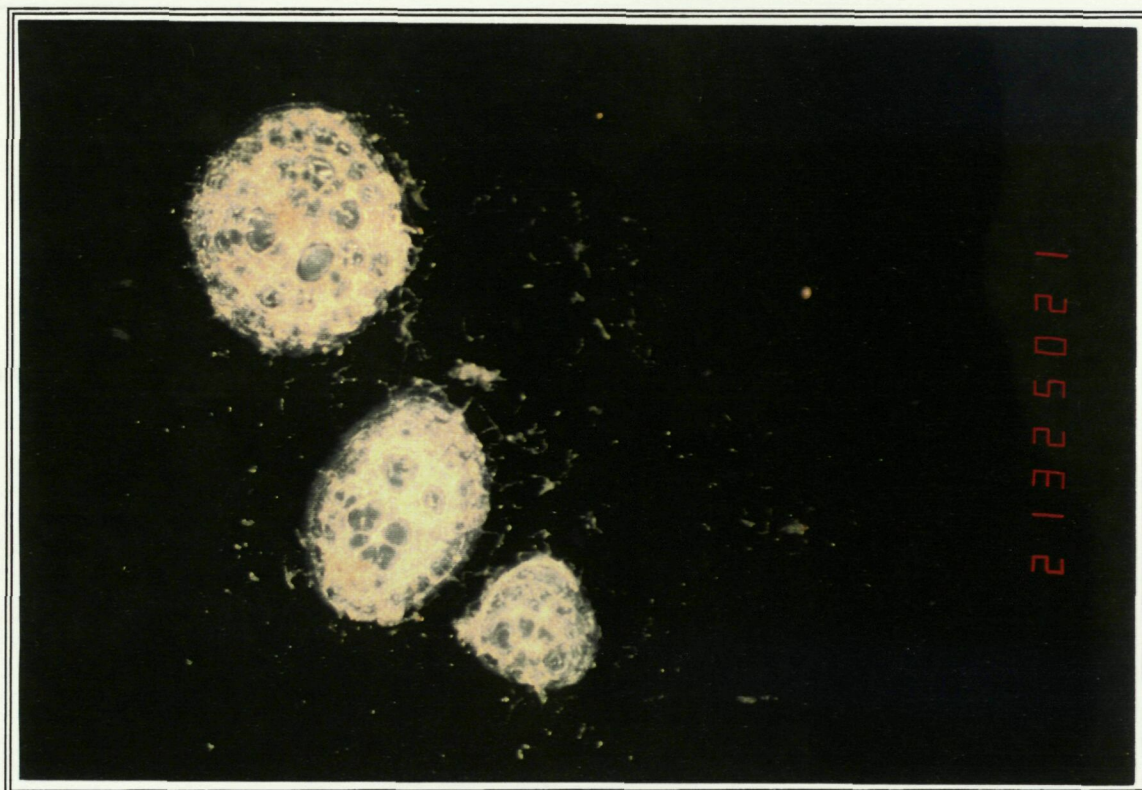


Figura 4.1.3.- Cabezas conidiales de *Aspergillus niger*. (Microscopio estereoscópico, 63 x).

Figura 4.1.4.- Micelio de *A. niger* invasor de la lente de contacto hidrofílica 319. (Microscopía óptica, 125 x).

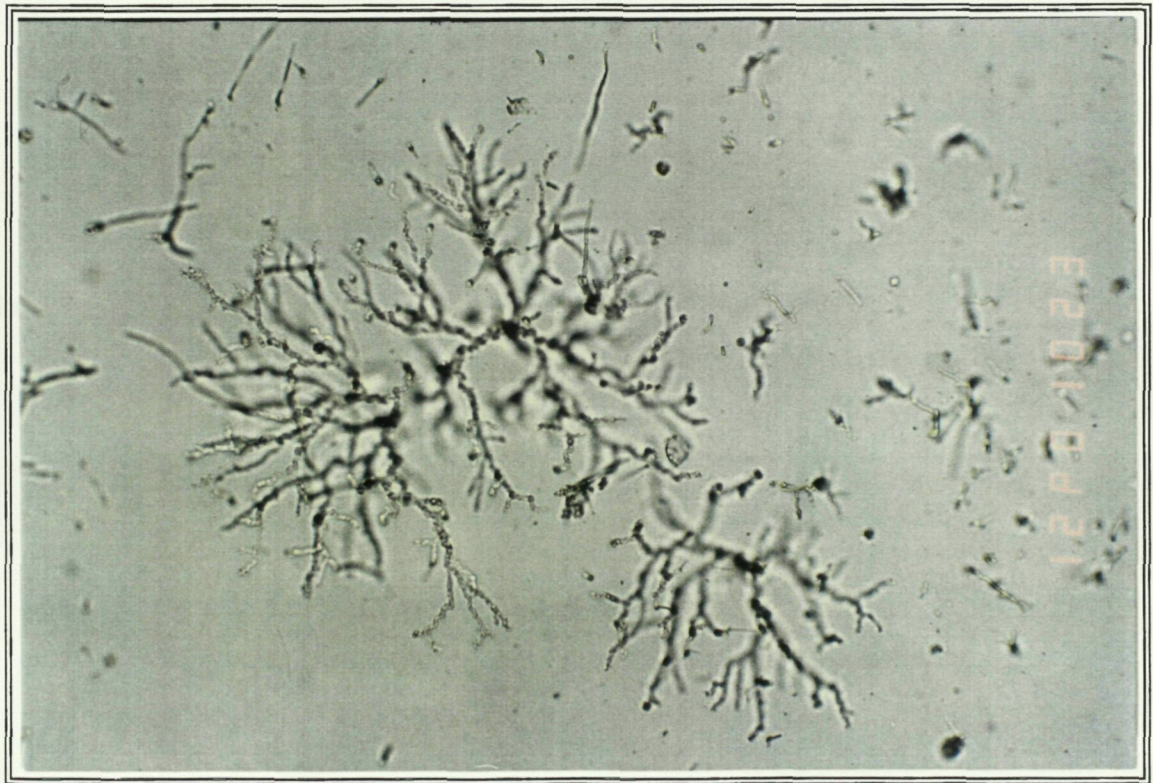
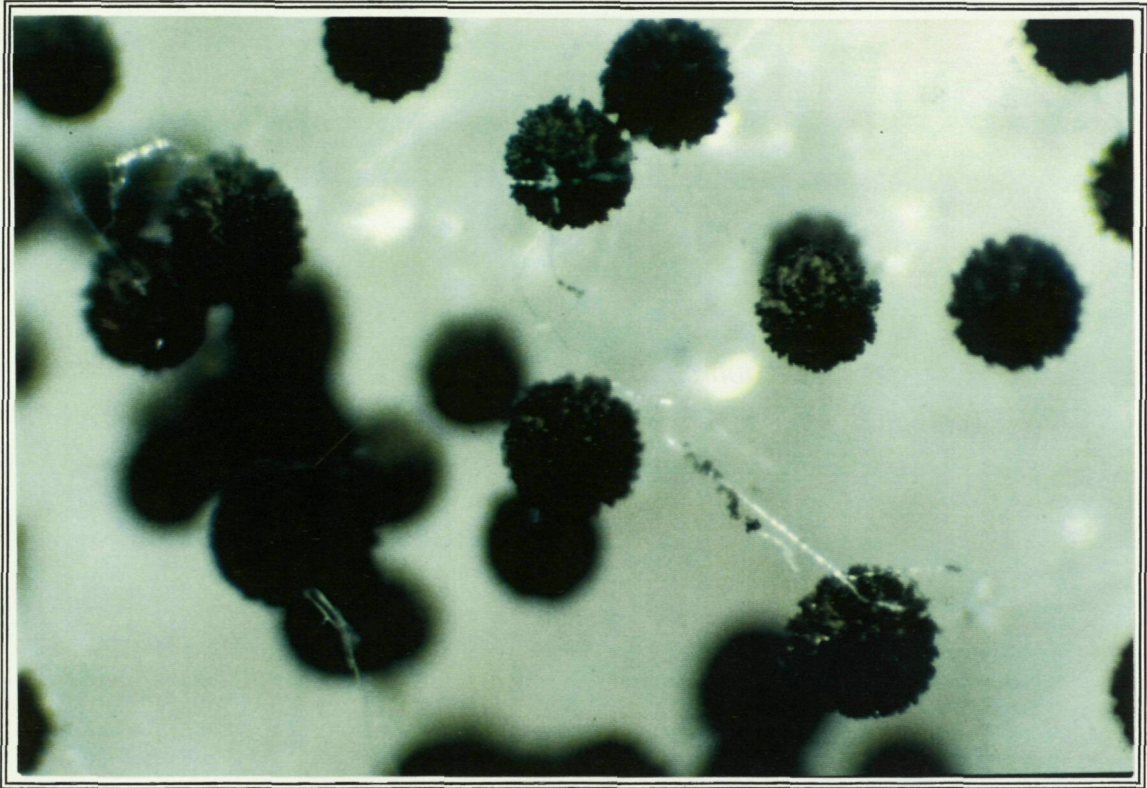


Figura 4.1.5.- *Colonia levaduriforme, rosada, brillante y cremosa de Aureobasidium pullulans obtenida después de 5 días de incubación. (Microscopio estereoscópico, 63 x).*

Figura 4.1.6.- *Hifas dematiáceas de A. pullulans en la lente de contacto 303. (Microscopía óptica, 500 x).*

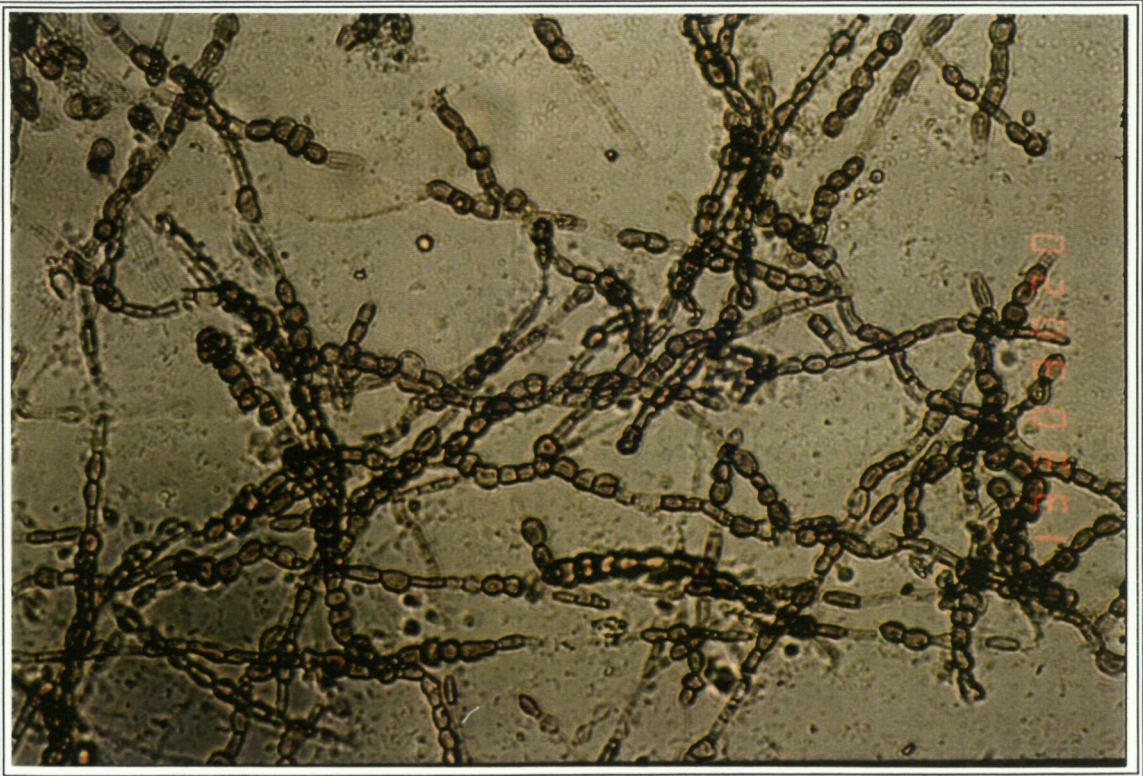


Figura 4.1.7.- Sección de la lente de contacto 303 mediante micrótomo de congelación, colonizada por *A. pullulans*, con las hifas dematiáceas adheridas a la superficie de la lente. (Microscopía óptica, 1250 x).

Figura 4.1.8.- Microcultivo de *Humicola grisea* procedente de la lente 312. (Microscopía óptica, 1250 x).

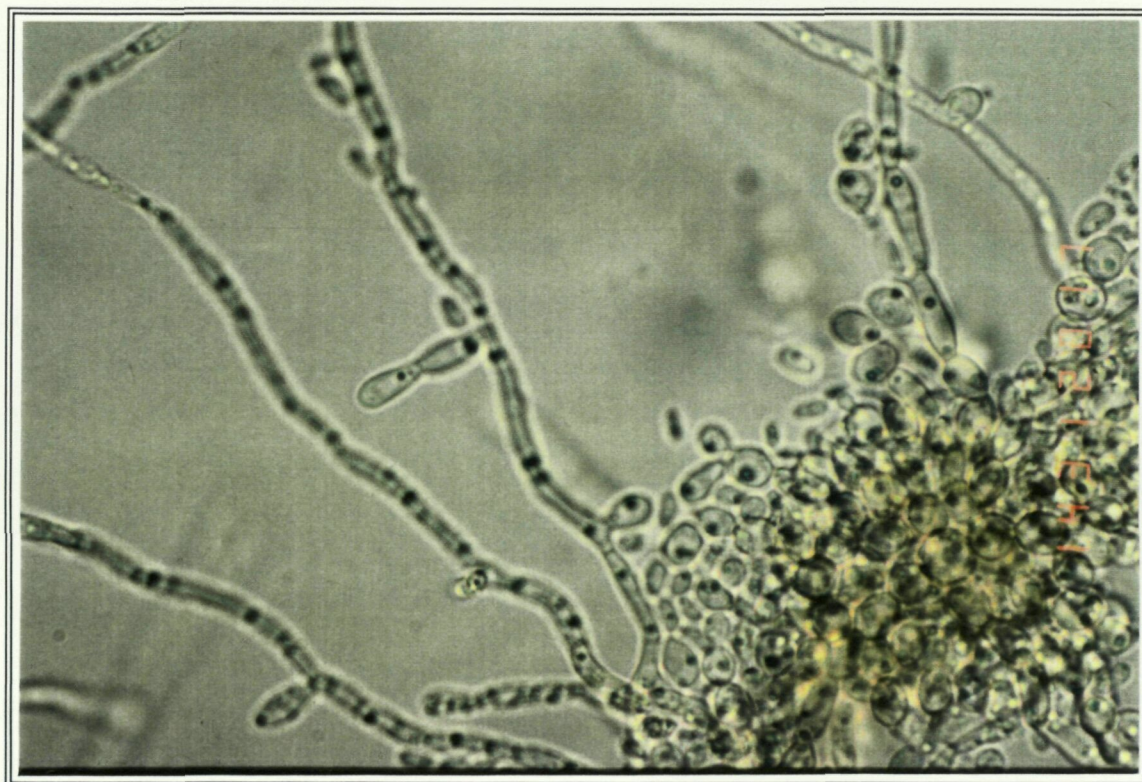


Figura 4.1.9.- Pequeñas colonias pigmentadas de *Phoma* invasoras de la lente hidrofílica 302. (Microscopía óptica, 500 x).

Figura 4.1.10.- Gran colonia fúngica invasora de la lente 244. (Microscopía óptica, 50 x).

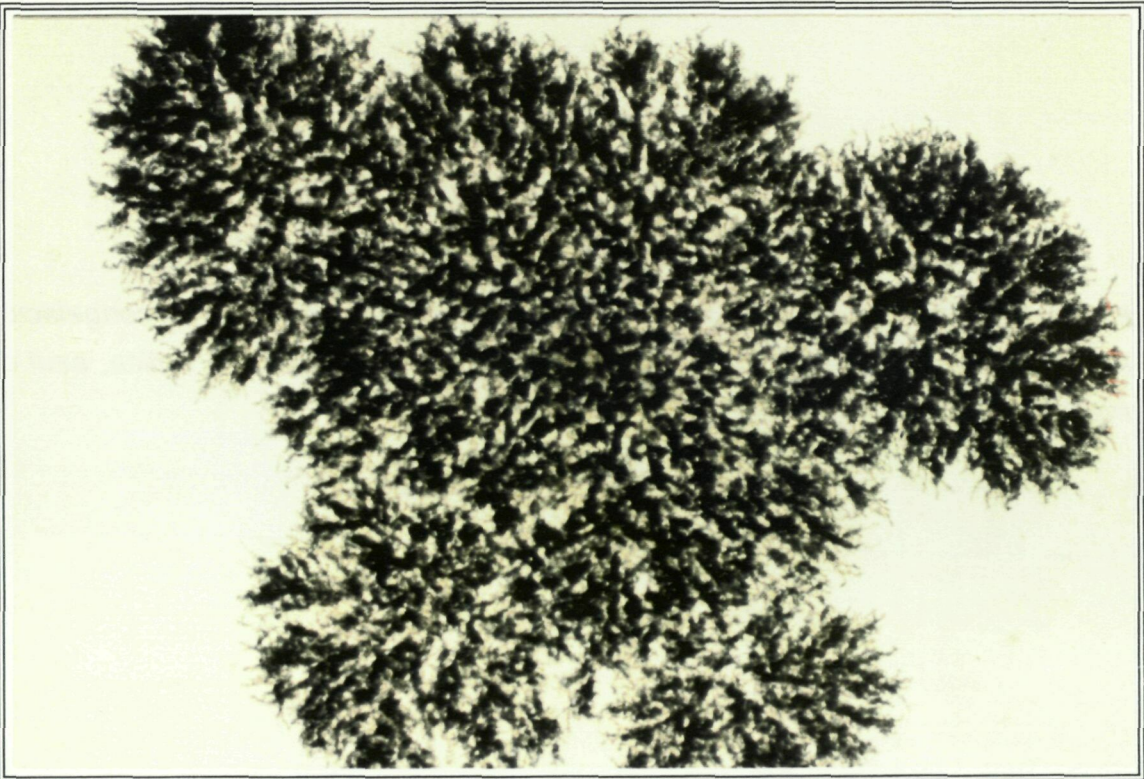
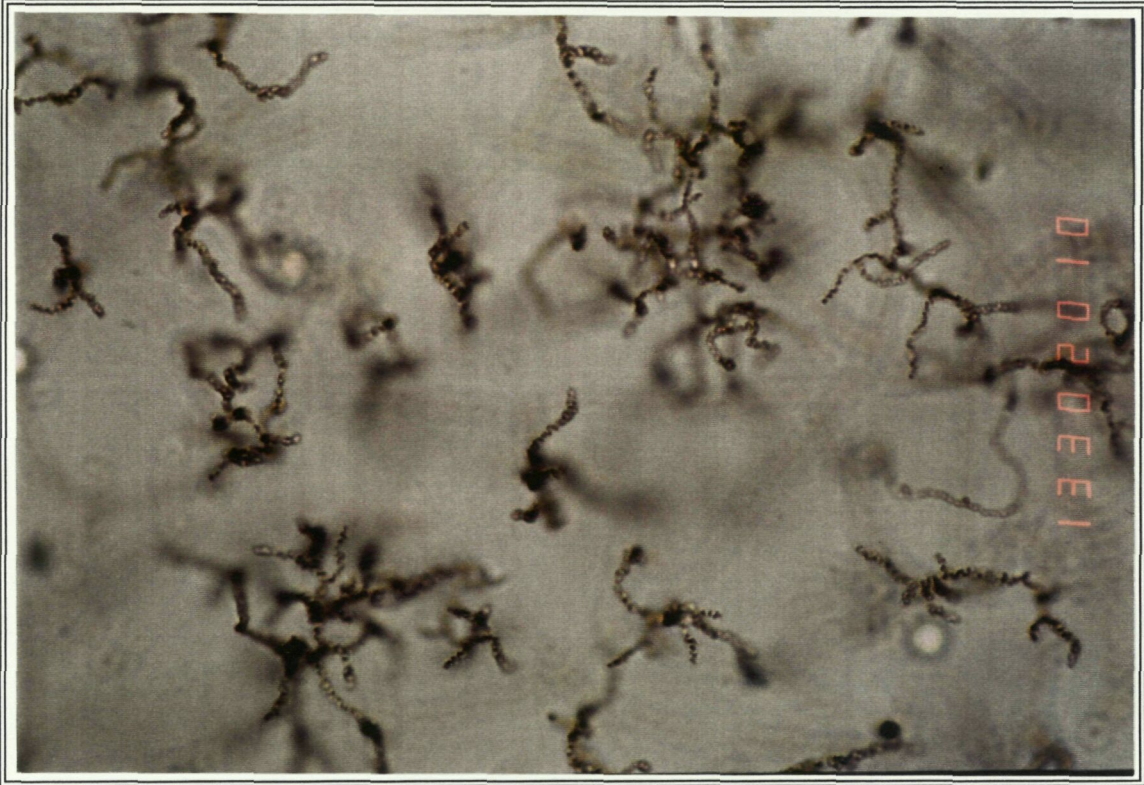


Figura 4.1.11.- Densa colonia esférica de un hongo ubicada en el centro de la lente de contacto 296. (Microscopía óptica, campo oscuro, 125 x).

Figura 4.1.12.- Sección de la lente de contacto 311 con micrótopo de congelación en la que se observan las hifas hialinas invasoras. (Microscopía óptica, azul de metileno, 500 x).

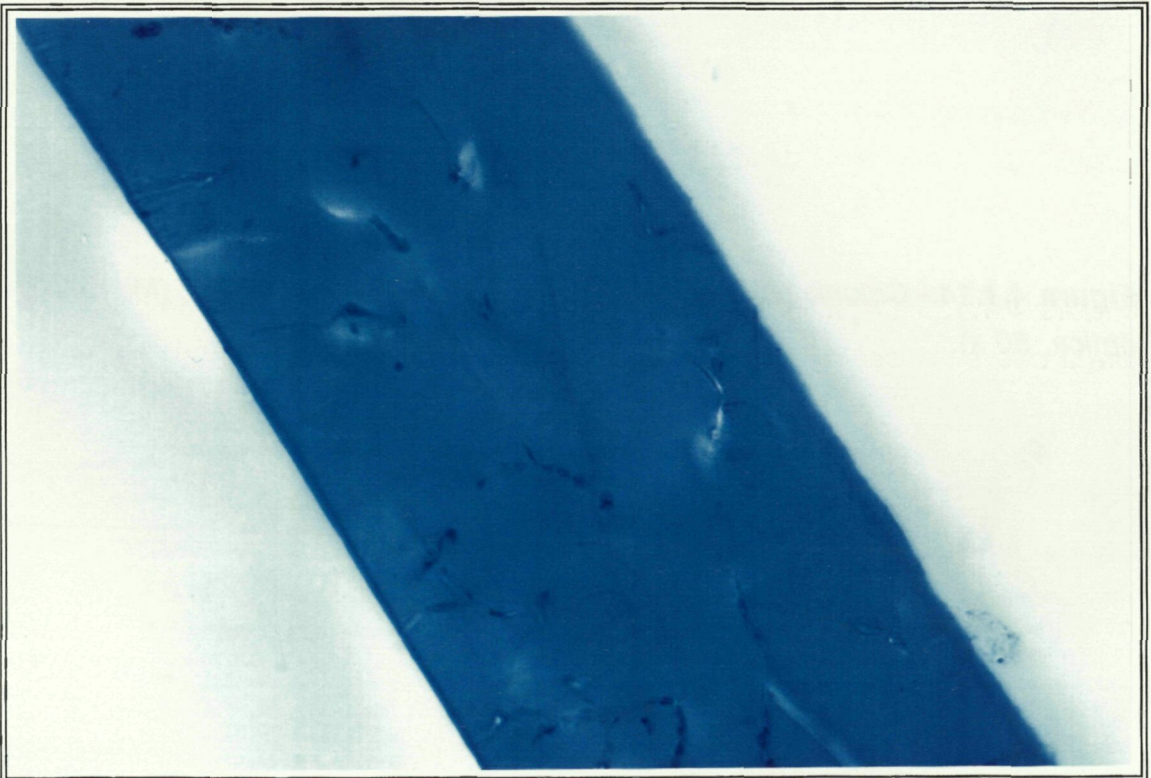


Figura 4.1.13.- *Detalle del micelio fúngico invasor de la lente 311, a mayor aumento que la figura anterior. (Microscopía óptica, azul de metileno, 1250 x).*

Figura 4.1.14.- *Colonia esférica próxima a la periferia de la lente 321. (Microscopía óptica, 50 x).*

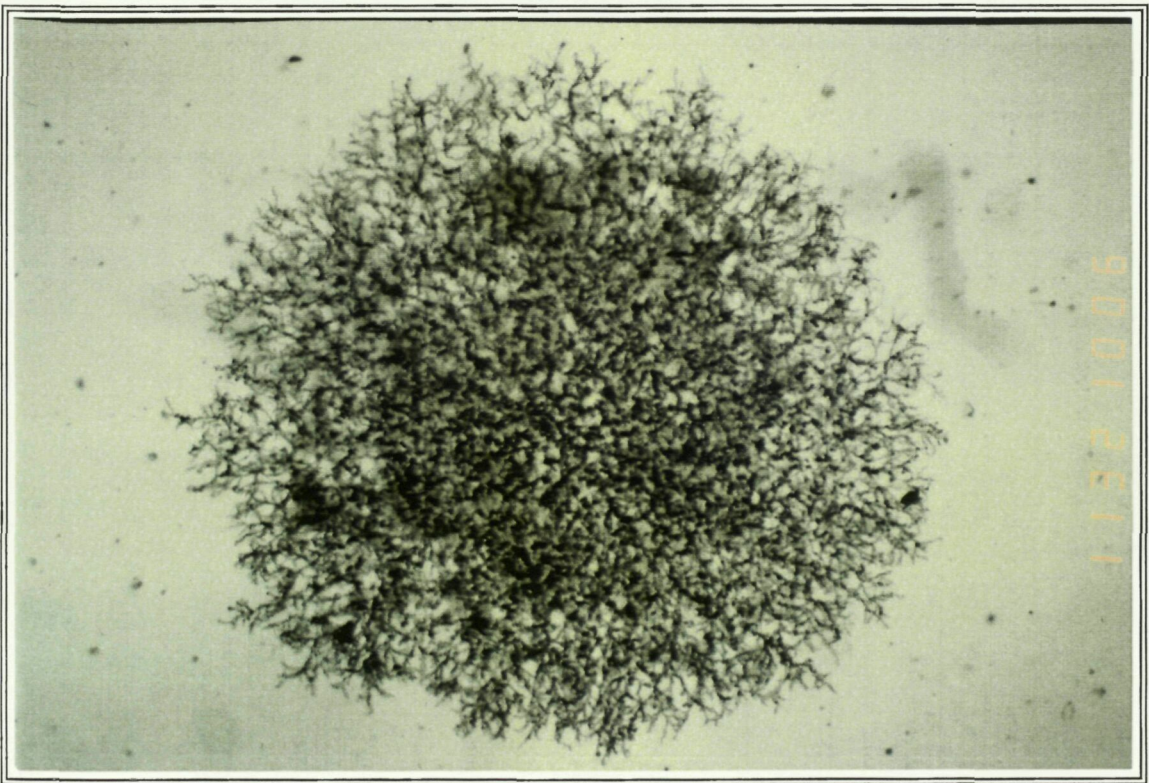
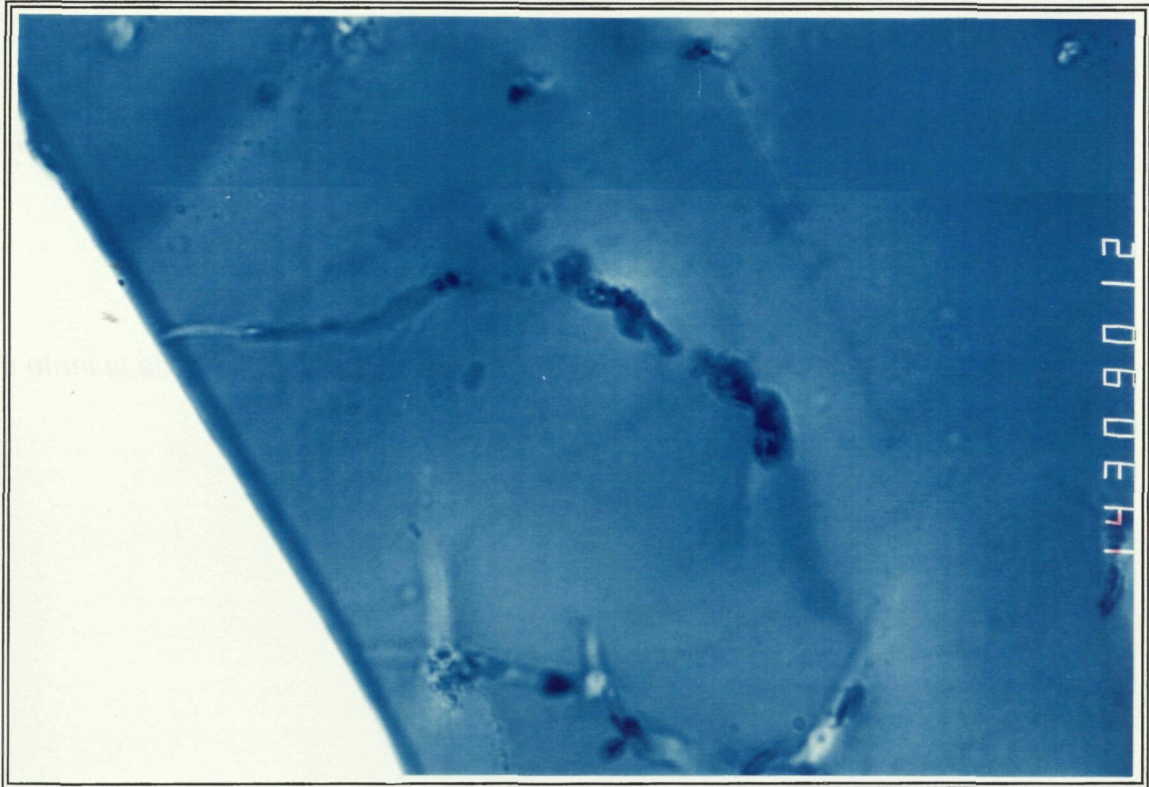


Figura 4.1.15.- *Hifas hialinas con disposición helicoidal en la matriz de la lente de contacto 321. (Microscopía óptica, 500 x).*

Figura 4.1.16.- *Colonia fúngica que invadió el borde de la lente 11. (Microscopía óptica, contraste de fase, 125 x).*

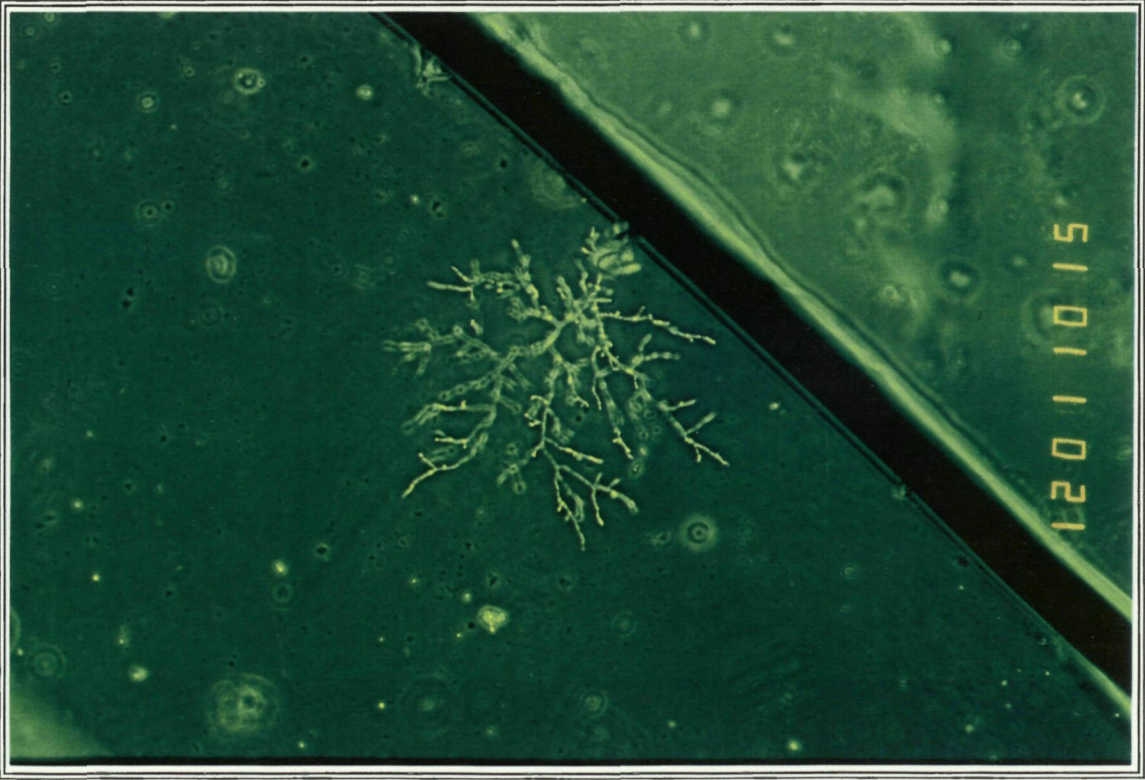
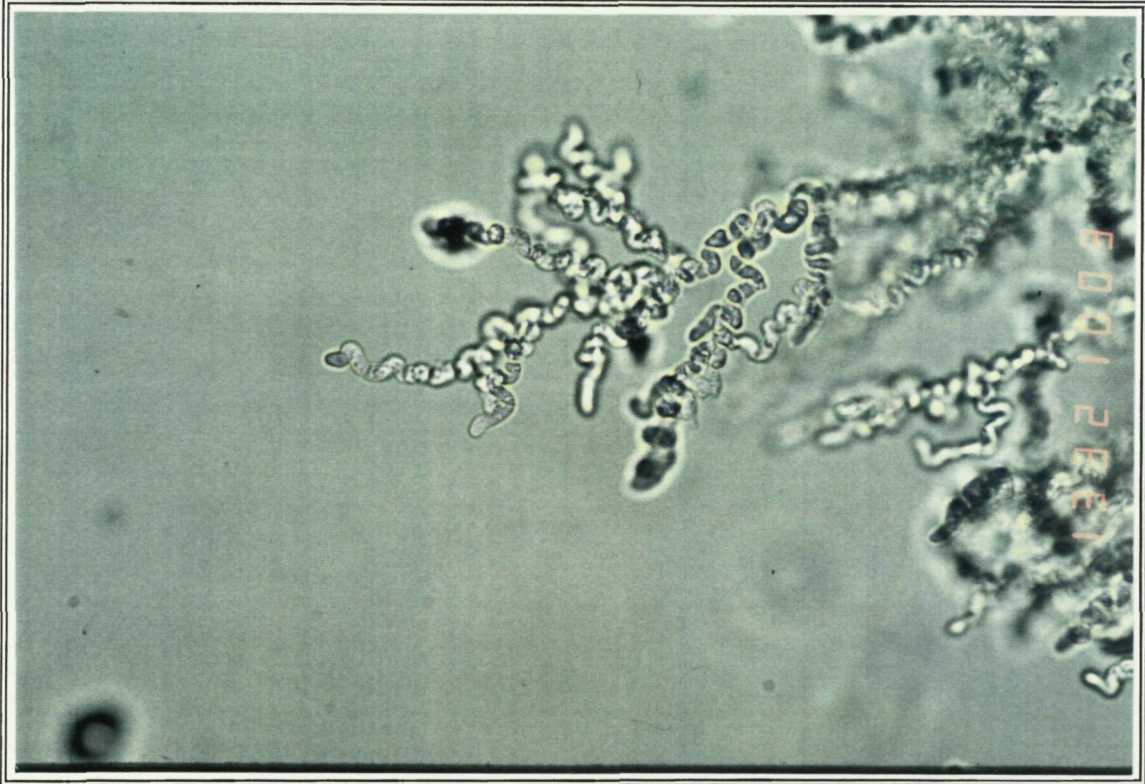


Figura 4.1.17.- Depósito esférico de tipo químico asociado con hifas hialinas degradaron el material de la lente 14. (Microscopía óptica, 500 x).

Figura 4.1.18.- Filamentos fúngicos hialinos acompañando un depósito químico presente en la lente 323. (Microscopía óptica, 500 x).

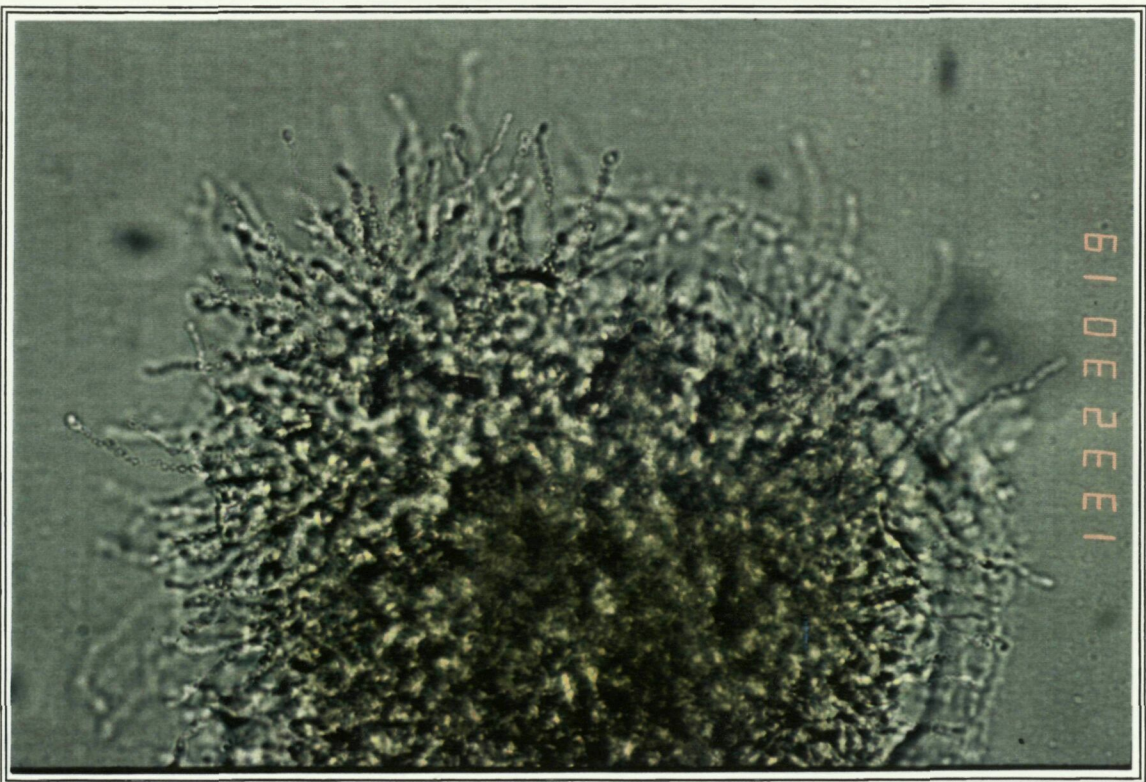
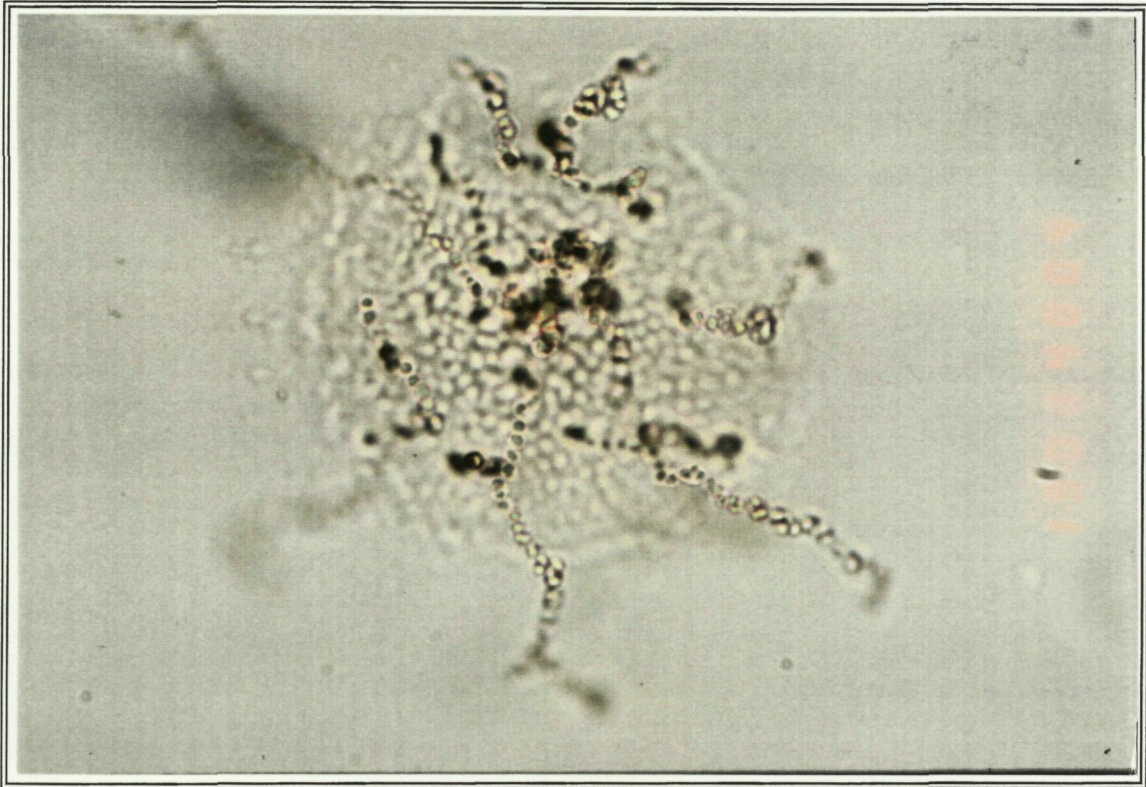


Figura 4.1.19.- Micelio dematiáceo invasor de la lente hidrofílica 32. (Microscopía óptica, 500 x).

Figura 4.1.20.- Hifas pigmentadas, irregulares y fragmentadas, fuertemente adheridas a la lente 35. (Microscopía óptica, 1250 x).

