



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

Figura 4.2.29.- Sección óptica según el plano vertical x-z, paralelo al eje óptico del microscopio, a través de la zona de origen de la colonia invasora anterior. (Microscopía confocal).

Figura 4.2.30.- Reconstrucción tridimensional y en proyección de la colonia anterior de *A. niger* 2700 invasora de una lente hidrofílica de vifilcon A (grupo IV). (Microscopía confocal, 630 x).

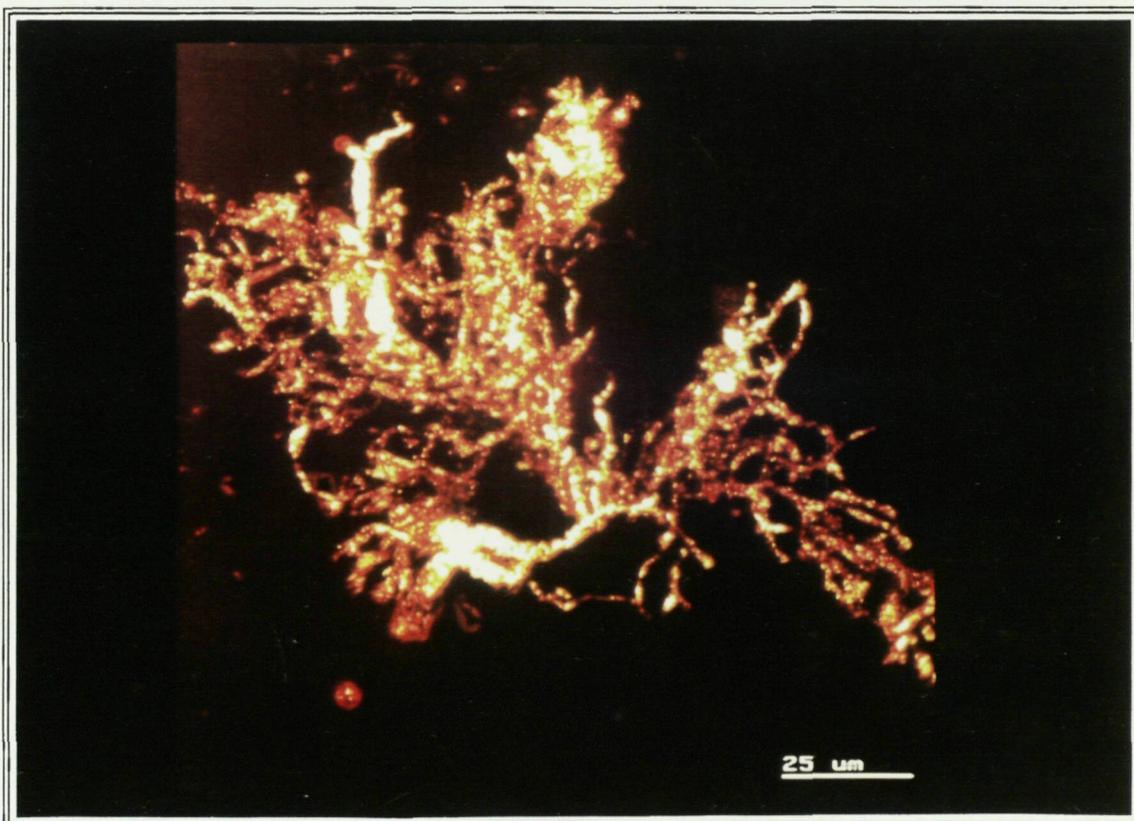
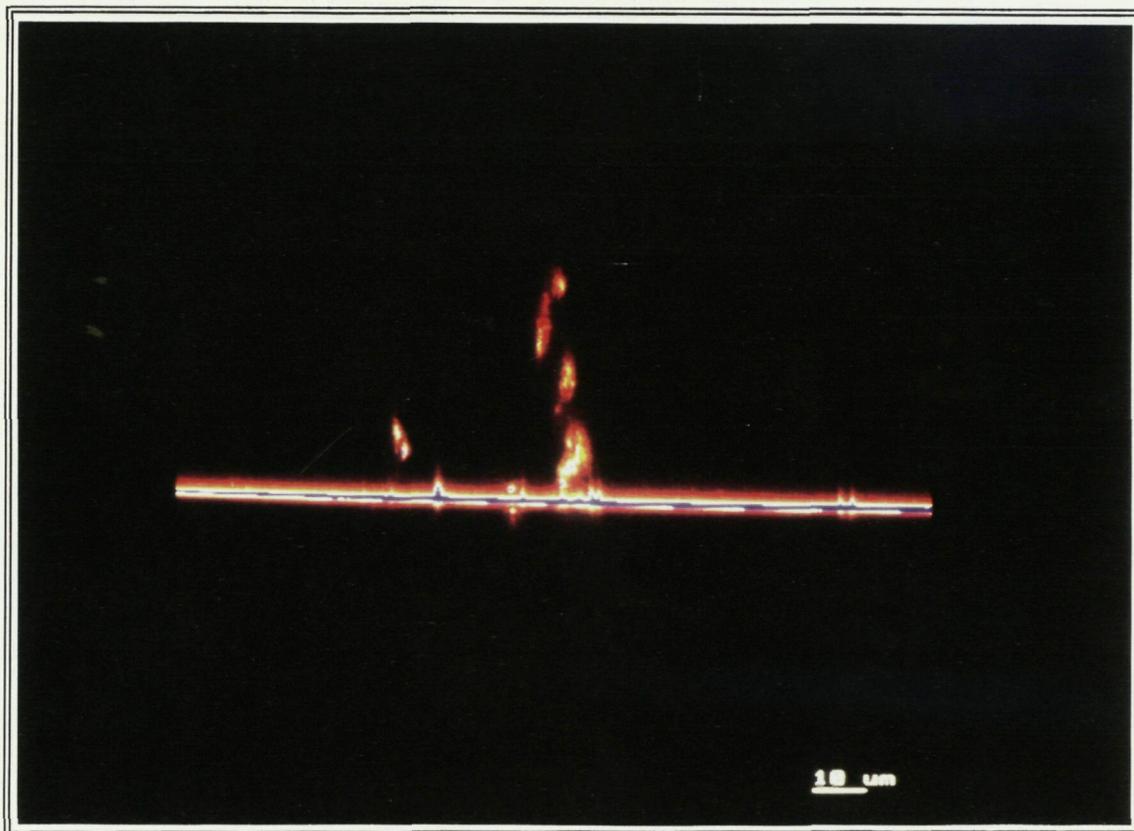


Figura 4.2.31.- Escala que determina la profundidad de penetración (en micrómetros) del micelio fúngico de *A. niger* 2700 en una lente de contacto de vifilcon A (grupo IV). (Microscopía confocal).

Figura 4.2.32.- Serie de 25 secciones ópticas en el plano horizontal x-y de la colonia fúngica de *A. niger* 2700 invasora de una lente hidrofílica de scafilcon A (grupo II), después de 21 días de incubación en medio de Sabouraud. El ángulo superior izquierdo corresponde a la zona más interna de la colonia y el inferior derecho, a la más externa. (Microscopía confocal, 630 x).

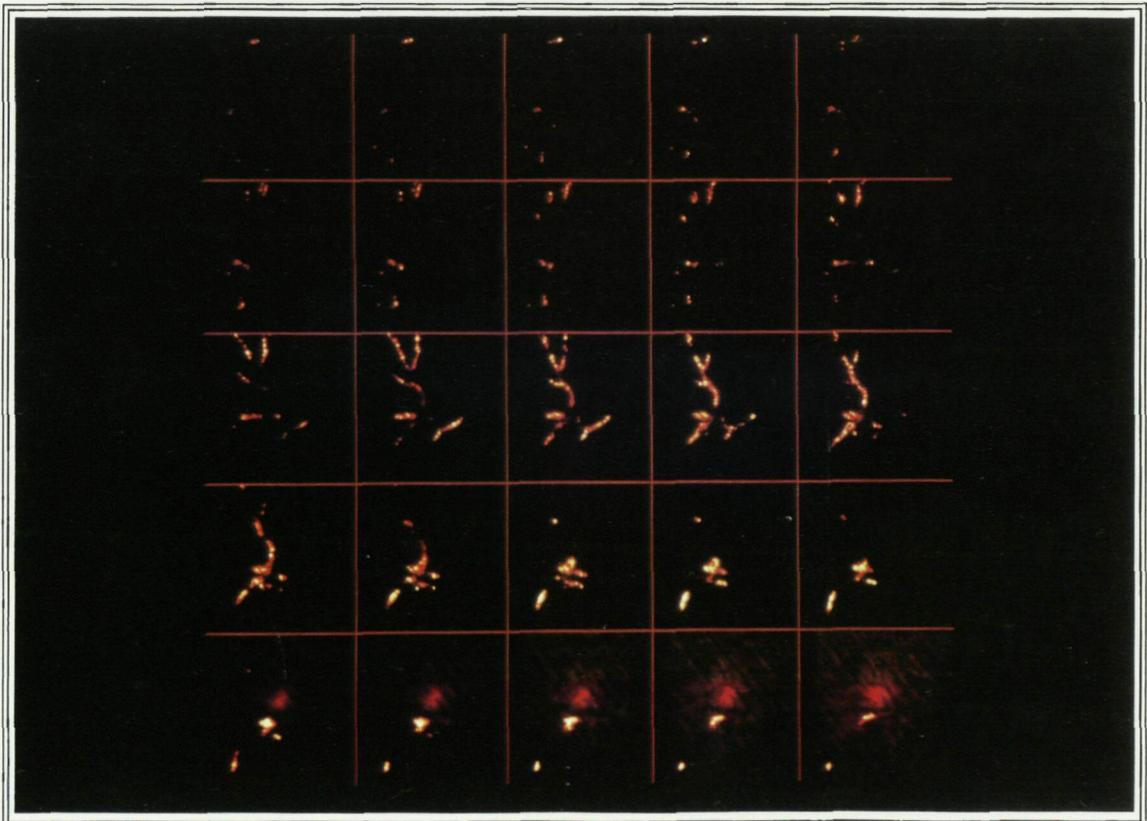
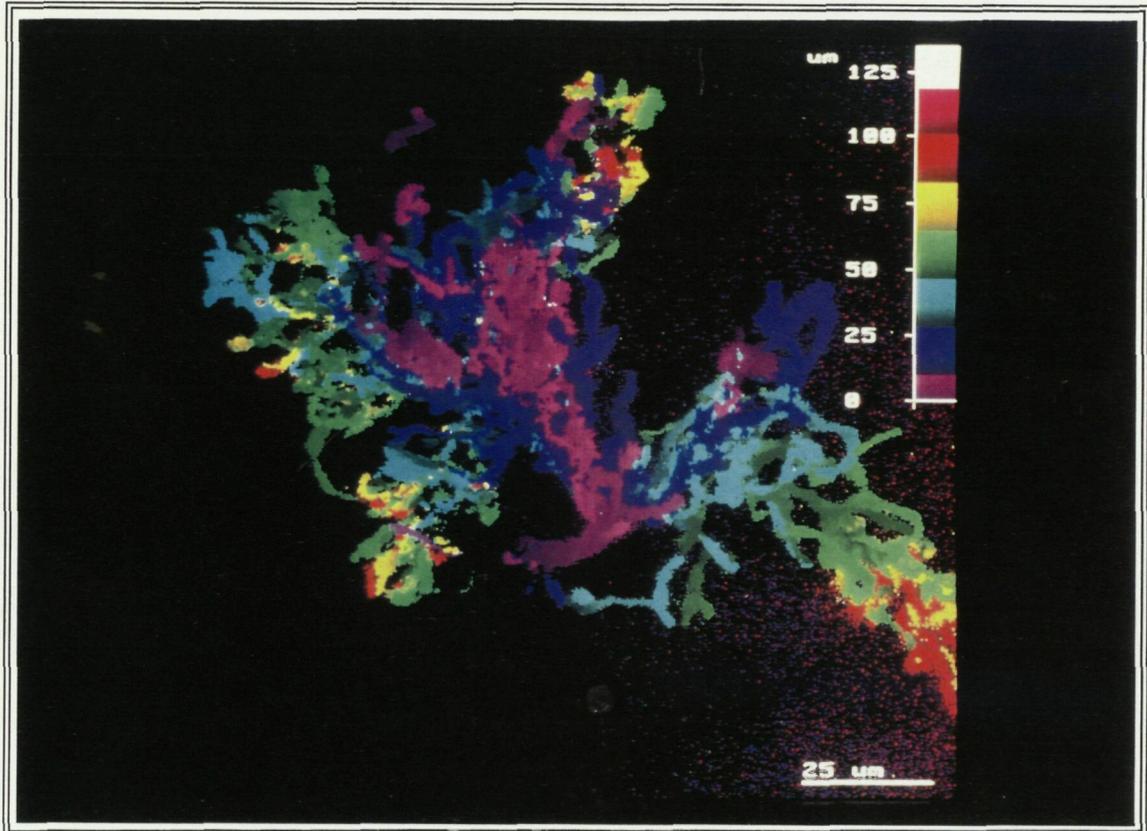


Figura 4.2.33.- Composición de la colonia anterior de *A. niger* 2700 invasora de una lente de scafilcon A (grupo II). Imagen superior izquierda: reconstrucción tridimensional y en proyección de la colonia en la que se señalan las dos secciones efectuadas según el plano x-z. Imagen superior derecha: sección óptica número 12 de figura 4.2.32. Imagen inferior izquierda: sección A efectuada por el origen de la colonia. Imagen inferior derecha: sección B realizada a través de dos hifas. (Microscopía confocal).

Figura 4.2.34.- Reconstrucción tridimensional y en proyección de la misma colonia anterior de *A. niger* obtenida a partir de las 25 imágenes. (Microscopía confocal).

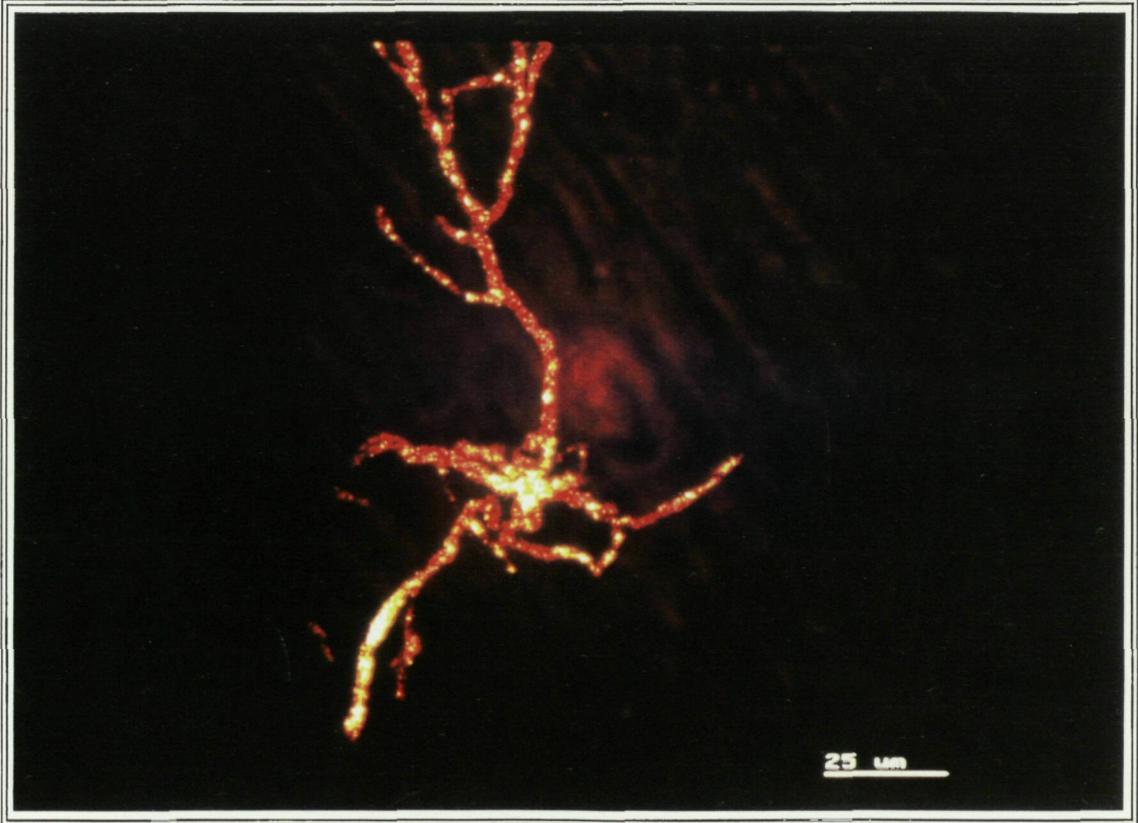
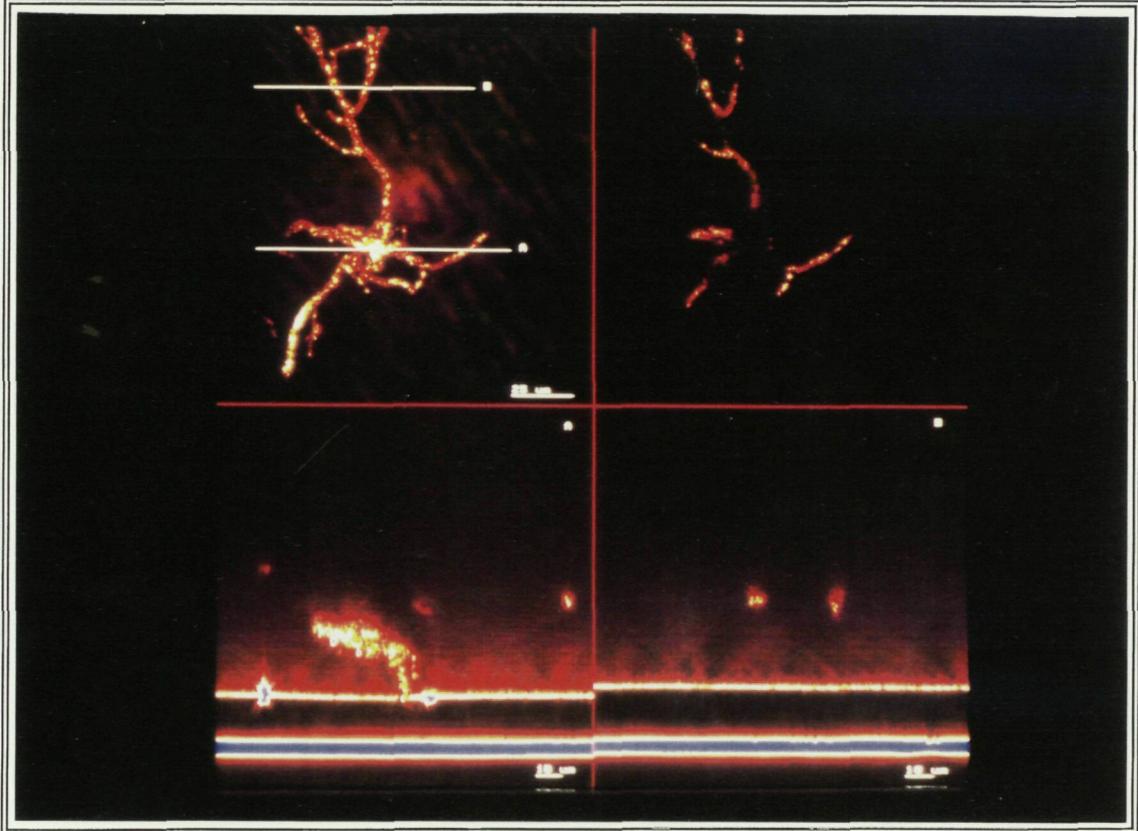


Figura 4.2.35.- La misma colonia de la figura anterior en blanco y negro. (Microscopía confocal).

Figura 4.2.36.- Escala que determina la profundidad de penetración (en micrómetros) del micelio fúngico de *A. niger* 2700 en la lente de contacto de scafilcon A (grupo II). (Microscopía confocal).

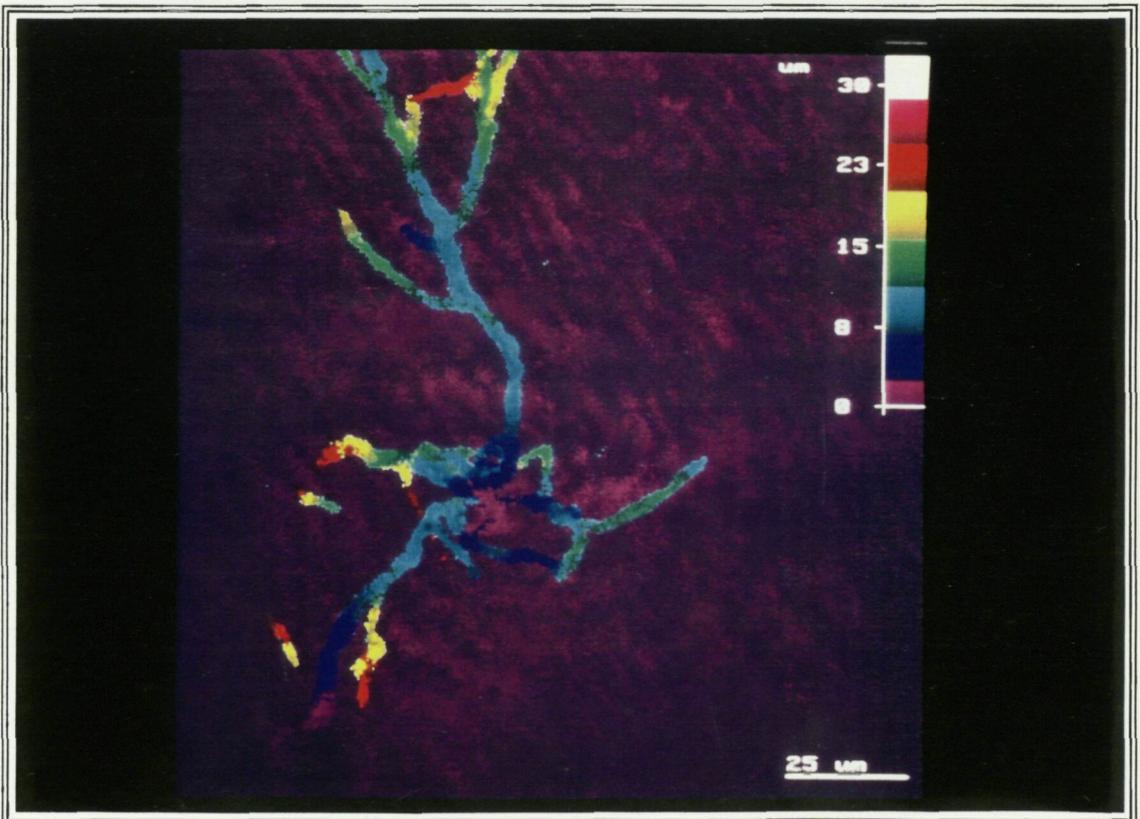
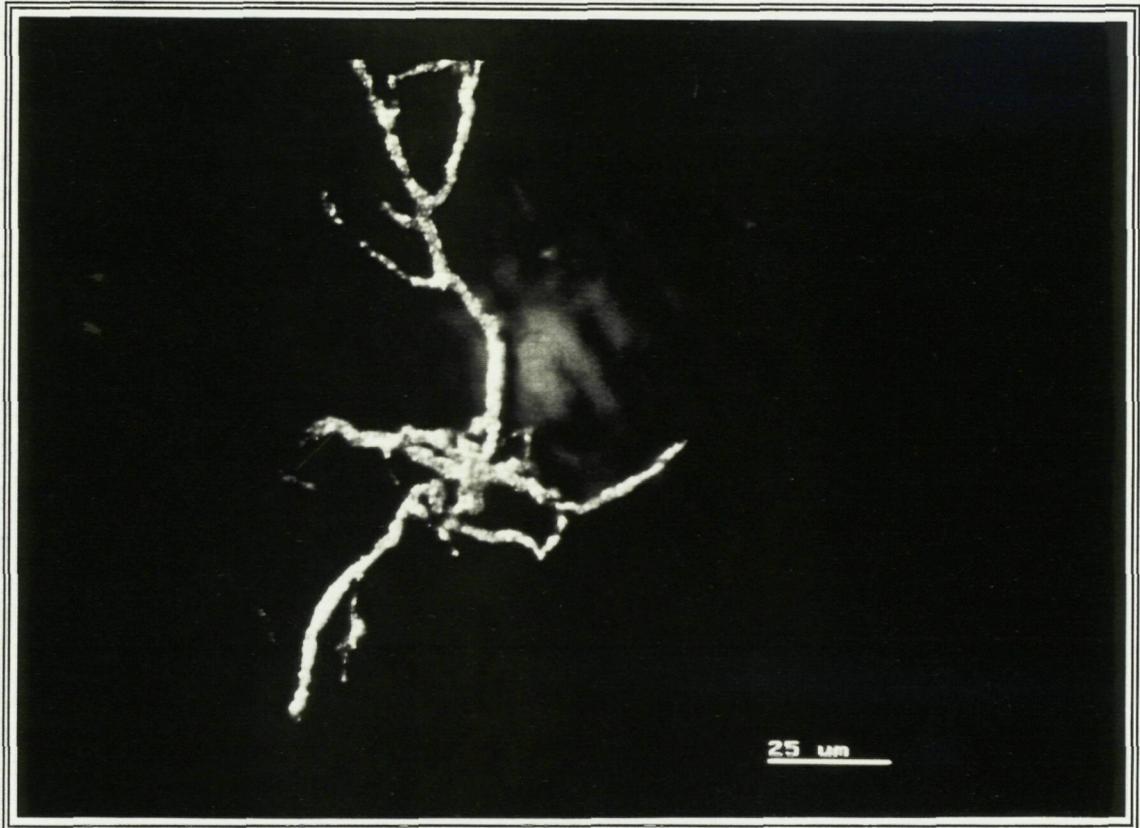
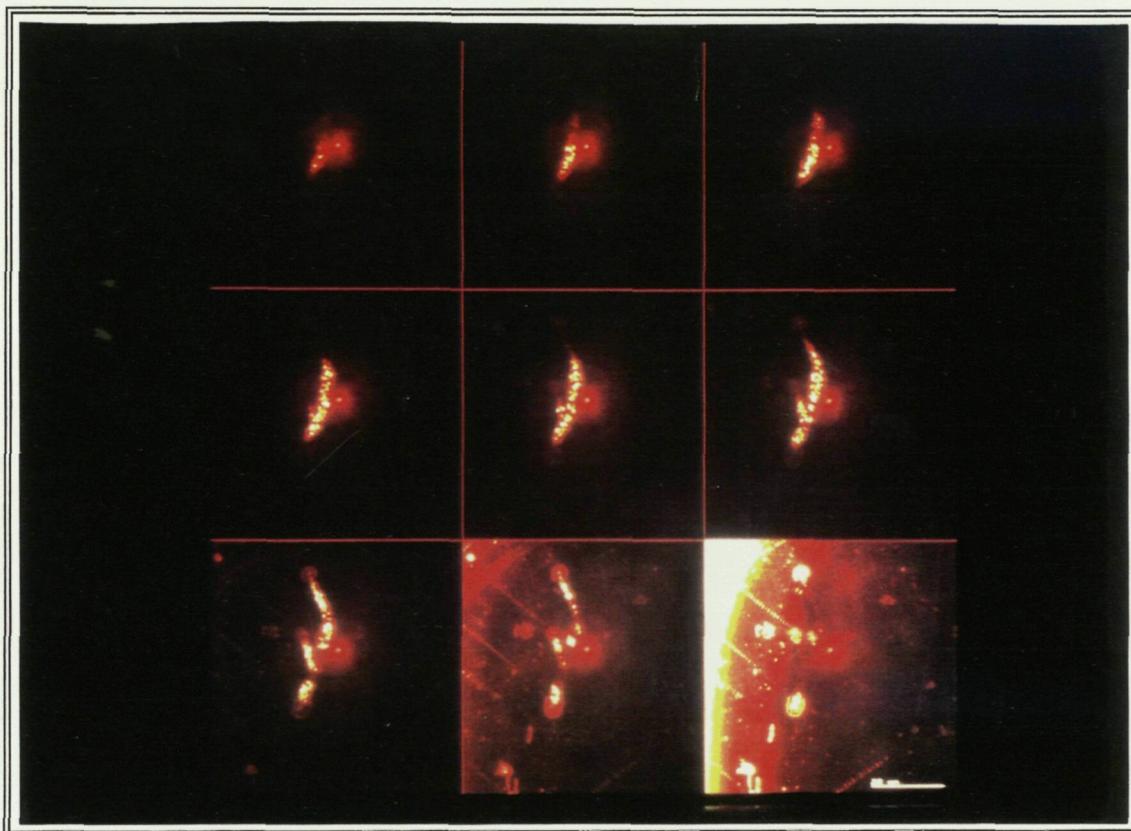


Figura 4.2.37.- Serie de 9 secciones ópticas en el plano horizontal x-y de una colonia fúngica de *Candida albicans* 93150 invasora de una lente hidrofílica de vifilcon A (grupo IV), después de 21 días de incubación en medio de Sabouraud. La imagen superior izquierda corresponde a la zona más interna de la colonia y la inferior derecha, a la más externa. (Microscopía confocal, 1000 x).

Figura 4.2.38.- Degradación superficial del material de una lente de contacto rígida permeable a los gases después de 7 días de incubación con *A. niger* 2700 y medio de Sabouraud. (Microscopía confocal).



5. DISCUSSION

5. DISCUSION

5.1. COLONIZACION FUNGICA DE LAS LENTES HIDROFILICAS PROCEDENTES DE USUARIOS

Bernstein (1973) fue el primer investigador que publicó la presencia de un hongo, *Rhodotorula* sp, como organismo colonizador de una lente de contacto hidrofílica. Desde entonces, numerosos trabajos han puesto de manifiesto la colonización fúngica de lentes de contacto, aportando datos e información general con vistas a solucionar esta problemática (Berger & Streeten 1981, Liotet & Warnet 1981, Simitzis-Le Flohic et al. 1983, Churner & Cunningham 1983, Alfonso et al. 1986, Wilhelmus et al. 1988, Wilson et al. 1990, Elander et al. 1992, Clark et al. 1994).

En relación a la incidencia de colonización de las lentes hidrofílicas, es posible encontrar en la literatura valores diversos. Wilson & Ahearn (1986) indican que la invasión fúngica de este tipo de lentes es relativamente inusual y dan unos porcentajes comprendidos entre el 2 y el 5% en el sudeste de los Estados Unidos para una muestra escogida de forma aleatoria entre usuarios de lentes de contacto de uso continuado. Por su parte, Simitzis-Le Flohic et al. (1986) analizaron lentes hidrofílicas que dejaron de ser utilizadas por sus usuarios por la presencia de algún tipo de depósito. En este caso, las tasas de colonización fueron muy elevadas, del orden del 41%, resultados que contrastan con los obtenidos por Wilson y Ahearn (1986). El material y la metodología utilizada en el presente estudio es muy similar a la empleada por Simitzis-Le Flohic et al. (1986), si bien, el porcentaje de colonización obtenido fue ostensiblemente menor (11.82%). Nuestros valores se sitúan entre los publicados por Pitts & Krachmer (1979), que obtuvieron un 14% de colonización, y los de Donzis et al. (1987) los cuales determinaron que un 8% de lentes hidrofílicas estaban contaminadas por hongos. Como puede observarse, los porcentajes obtenidos en los distintos estudios pueden ser sensiblemente diferentes. Una de

las causas responsables de este hecho podría encontrarse en el origen de las muestras. Factores como la selección de las muestras, el origen de las mismas, la época del año en que se realiza el análisis, etc. deberían tenerse en cuenta en el momento de efectuar comparaciones. Asimismo, el desconocimiento de datos concretos sobre las lentes (material, horas de utilización, etc.), sobre su usuario (flora fúngica habitual, patologías, entorno habitual, etc.) y sobre sus hábitos de limpieza y desinfección de las lentes y de sus estuches impiden efectuar valoraciones precisas de carácter comparativo.

Como ya se ha indicado en el apartado 4.1.2., el cultivo en el laboratorio de los hongos invasores de las lentes no siempre fue posible y, sólo un 35.90% de la lentes colonizadas generaron colonias *in vitro* que permitieron identificar taxonómicamente el microorganismo contaminante. Esta circunstancia ya ha sido puesta de manifiesto repetidamente en la bibliografía (Liotet & Warnet 1981, Simitzis-Le Flohic et al. 1986, Kirsch & Brownstein 1993). Es difícil obtener cultivos de los agentes contaminantes de las lentes de contacto hidrofílicas, aunque microscópicamente sea posible detectar fácilmente su presencia (Simitzis-Le Flohic et al. 1983). Liotet & Warnet (1981) citan un estudio efectuado por un laboratorio de contactología en el cual se menciona que el 2.05% de las lentes de contacto con contaminación fúngica dieron cultivos positivos en el laboratorio. No obstante, estos resultados son muy distintos de los obtenidos por los propios Liotet & Warnet (1981), en los que el 95.4% de las lentes analizadas y colonizadas por hongos generaron colonias *in vitro*. Por su parte, Kirsch & Brownstein (1993) observaron que de un total de 6 lentes contaminadas el crecimiento fúngico tuvo lugar en 3 y comentan que una posible explicación para la discrepancia entre los resultados radica en el tiempo de incubación de las lentes contaminadas. Así, por ejemplo, mientras estos últimos autores las mantienen durante una semana bajo condiciones establecidas, Liotet & Warnet (1981) consideran que los cultivos son negativos cuando no existe formación de colonias en el medio utilizado después de 3 semanas. Atendiendo a estas consideraciones y a tenor de los resultados obtenidos, en el presente estudio se estima que, posiblemente 7 días sea un periodo de incubación limitado pero, en general, el crecimiento *in vitro* se inicia antes de finalizar dicho intervalo de

tiempo.

Se cree que la falta de crecimiento al cultivar el líquido de suspensión de las lentes o las propias lentes está relacionada principalmente con los tratamientos de limpieza y desinfección a los que son sometidas las lentes por el propio usuario o por el contactólogo, una vez que el hongo las ha colonizado. Sistemas como Blalents (véase apartado 3.1.1.) son muy potentes y efectivos y parece difícil que puedan ser resistidos por los microorganismos. De este modo, el tipo de tratamiento influye sin duda sobre la mortalidad fúngica, aunque su micelio permanezca en la matriz de la lente. En definitiva, el número de cultivos positivos será más o menos elevado según cual sea el hongo colonizador y el tratamiento utilizado para su destrucción.

En numerosos trabajos publicados sobre el tema, se desconoce el número de usuarios de lentes de contacto con invasión fúngica que desarrolla algún tipo de patología corneal o conjuntival asociada al microorganismo. En general, la presencia de los hongos en las lentes no parece inducir patología ocular, lo cual confirma el limitado efecto que provoca su inoculación continua en el ojo (Liotet & Warnet 1981, Berger & Streeten 1981). En los diversos trabajos publicados se citan numerosos hongos invasores de lentes de contacto hidrofílicas, pero que no producen alteraciones en el segmento externo ocular de sus usuarios. En la literatura los hongos filamentosos son mencionados con mayor frecuencia que las levaduras. Así, *Acremonium*, *Alternaria*, *Aspergillus*, *Beauveria*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Botrytis*, *Scopulariopsis*, *Dermatophilus*, *Aureobasidium*, *Curvularia*, *Exophiala*, *Fusarium*, *Nocardia*, *Paecilomyces*, *Trichosporum*, *Rhinocladiella*, *Sclerotium*, *Scytalidium*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Cryptococcus* son algunos ejemplos de géneros citados frecuentemente en la bibliografía. Cabe tener en cuenta que los hongos invasores de las lentes son patógenos oportunistas que según las condiciones del entorno pueden provocar desde irritación corneal y conjuntival a los usuarios de las lentes, hasta queratitis micóticas graves. *Fusarium*, *Acremonium*, *Paecilomyces*, *Candida*, *Curvularia*, *Alternaria*, *Helminthosporium*, *Aspergillus* son algunos de los hongos aislados de queratitis ulcerativas en usuarios de lentes de contacto. Mientras un 3% de las

queratitis fúngicas aparecen asociadas a lentes de contacto afáquicas o cosméticas y se atribuyen a hongos filamentosos como *Fusarium*, un 12% de las infecciones se relacionan con lentes terapéuticas y se atribuyen a levaduras como *Candida* (Wilhelmus et al. 1988). La utilización de lentes terapéuticas está relacionada con el tratamiento con antibióticos y/o corticoesteroides. La aparición de queratopatías fúngicas puede ser la consecuencia de la colonización de las lentes por estos microorganismos.

Se desconoce si en el presente estudio existió algún proceso patológico entre los usuarios de lentes analizadas. Según se indicará a continuación, la mayoría de los hongos identificados taxonómicamente ya han sido citados en la bibliografía como colonizadores de lentes hidrofílicas de usuarios que pueden manifestar alteraciones en el segmento externo ocular (*Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Aureobasidium*). *Phoma* figura como contaminante de estuches de lentes de contacto (Gray et al. 1995), aunque no se ha descrito como colonizador de las propias lentes. Según la bibliografía consultada, *Gliomastix* y *Humicola grisea* tampoco se han relacionado con la contaminación de las mismas.

Acremonium es un hongo muy común en cualquier hábitat relacionado con el hombre como por ejemplo, en el suelo, en la vegetación marchita y en los productos alimenticios. En este sentido, se ha descrito recientemente, de manera conjunta con *Geotrichum*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Phoma*, como contaminante de muestras de leche sin cocer (Skrinjar et al. 1995). Asimismo, es un agente causal de hialohifomicosis, denominación debida a Ajello & McGinnis (1984) para definir las infecciones micóticas en las cuales el agente etiológico posee hifas septadas con paredes no pigmentadas. También se encuentra frecuentemente en laboratorios clínicos como saprótrofo. Aunque comúnmente no está asociado con enfermedades humanas, ha sido identificado como patógeno en micetomas, queratomicosis (Forster 1975), endoftalmitis postoperatorias (Green et al. 1965), peritonitis, micosis subcutáneas, onicomycosis (Zaias 1972), etc. Recientemente han sido identificados *Acremonium kiliense* y *A. falciforme* como agentes etiológicos de micetomas (Venugopal & Venugopal 1995). La primera especie ha

sido citada también como el hongo causante de endoftalmitis y de queratitis en cuatro pacientes, después de ser operados de cataratas (Weissgold et al. 1996). Asimismo, *A. kiliense* originó peritonitis en dos pacientes que recibían un tratamiento de diálisis peritoneal continuada (Lopes et al. 1995). Micosis subcutáneas también han sido causadas por *A. recifei* (Zaitz et al. 1995). Esta especie se ha aislado también del jugo gástrico, líquido pleural, etc. y como contaminante de lentes de contacto asociadas (Krachmer et al. 1978; Yamamoto et al. 1979; Liesegang & Forster 1980) o no (Simmons et al. 1986; Wilson & Ahearn 1986; Batellier et al. 1992) a patologías corneales. Por tanto, y debido principalmente a su ubicuidad, no es extraño que pueda ser aislado de este tipo de sustratos, confirmando en el presente estudio los resultados obtenidos por los autores indicados.

Por su parte, *Alternaria* es un saprófito del suelo muy común y patógeno de plantas. En este sentido, diversas especies como *A. brassicae*, atacan las coles y coliflores; *A. dianthi* y *A. dianthicola* parasita los claveles; los cultivos de tomates patatas, pimientos, etc. son destruidos por *A. solani* que produce un antibiótico de alto poder fitotóxico (Calvo et al. 1991). A menudo sus conidios, dispersos por el aire, están implicados en procesos asmáticos en humanos. No obstante, es raro que se establezca como causa de enfermedad infecciosa. Es un agente de faeohifomicosis, término propuesto por Ajello et al. (1974) para cubrir las infecciones cutáneas, subcutáneas y sistémicas causadas por Hyphomycetes y que se desarrollan en el huésped en forma de elementos miceliales septados y dematiáceos. Puede colonizar la piel desnuda o lesionada, de donde se ha aislado, aunque no se tiene certeza de que este microorganismo contribuya a la patología (Botticher 1966; Higashi 1973). También se han registrado algunas infecciones auténticas causadas por diferentes especies de *Alternaria* (Galgoczy et al. 1986; Viviani 1986). Ultimamente, se ha descrito como el agente causal de alternariosis en un paciente tratado con corticoesteroides intrarectales locales (Machet et al. 1995), así como en pacientes inmunosuprimidos (Chaidemenos et al. 1995) y no inmunosuprimidos (Saenz-Santamaría et al. 1995). *Alternaria alternata* es la especie más comunmente aislada y se encuentra en sustratos orgánicos, paredes húmedas, suelo,

alimento, atmósfera, etc. También ha sido citada como una especie que origina necrosis *in vitro*, en la corteza de los manzanos (Blechtova 1995). Asimismo, y al igual que ha ocurrido en el estudio realizado, se ha aislado de lentes de contacto hidrofílicas (Liotet & Warnet 1981; Brooks et al. 1984; Simmons et al. 1986; Simitzis-Le Flohic et al. 1986; Batellier et al. 1992), posiblemente por ser una especie cuyos conidios se encuentran en numerosos lugares y con gran poder de colonización de sustratos diferentes.

La localización y características de *Aspergillus* y concretamente de *A. niger* han sido descritas en el apartado 3.2.1.1.3.b. Tal como se expone en el mismo, es difícil encontrar un material que contenga un poco de materia orgánica y algo de humedad sobre el que *Aspergillus* no pueda crecer. La especie indicada también ha sido citada como contaminante de lentes de contacto hidrofílicas (Liotet & Warnet 1981; Brooks et al. 1984; Simmons et al. 1986; Simitzis-Le Flohic et al. 1986; Batellier et al. 1992). Por tanto, y al igual que ocurre con *Acremonium* y *Alternaria*, con el estudio efectuado se confirma la colonización de las lentes de contacto hidrofílicas por el hongo indicado, posiblemente a causa de su ubicuidad y características fisiológicas.

Aureobasidium es un hongo que se encuentra en el medio ambiente como contaminante habitual. La especie *A. pullulans* puede aislarse de plantas vivas y todo tipo de restos orgánicos, incluso de la arena de la playa. Se ha asociado con casos de faeohifomicosis diseminadas en pacientes inmunodeprimidos. Provoca lesiones cutáneas en diversas zonas del cuerpo con fibrosis extensa y reacción granulomatosa (Vermeil 1971). Recientemente se ha aislado también de ambientes naturales, concretamente del lodo y del agua (Mehdi 1996). Asimismo, esta especie, conjuntamente con la levadura roja *Sporobolomyces roseus* representó el 70% de la población de levaduras aisladas en otoño de tres estanques de peces en Lowland Zahorie, Eslovaquia (Slavikova & Vadkertiova 1995). Es un organismo interesante desde el punto de vista biotecnológico, por la producción de determinados enzimas. Asimismo, se ha aislado de lentes de contacto hidrofílicas (Simitzis-Le Flohic et al. 1986; Wilson y Ahearn 1986; Batellier et al. 1992). Precisamente por ser un contaminante habitual que se

encuentra, entre otros lugares, en el medio ambiente tiene capacidad para colonizar lentes de contacto hidrofílicas, según se ha podido constatar en el estudio realizado.

Gliomastix vive sobre restos vegetales, pero puede aparecer en el suelo (Mishra 1995), en las playas y atacar a la piel. En México se ha citado, por primera vez, como un hongo saprófito asociado con plantas (Mercado-Sierra & Heredia 1994). Por otra parte, *Humicola* es un género-forma que se encuentra preferentemente en el suelo (Volz et al. 1994, Chen & Chen 1995) y de la arena de algunas playas bañadas por el océano Atlántico (Jose et al. 1994). La especie *H. grisea* es un contaminante que recientemente se ha aislado, además, de distintas muestras de basuras urbanas mostrando su crecimiento máximo y esporulación a los 43 °C (Mehra & Jaitly 1995). Quizás el hecho de que ninguno de los dos hongos ocasione patologías importantes en el hombre ni en los vegetales condicione el escaso interés que presenta *Gliomastix* y *Humicola* para ser analizado con mayor profundidad. En consecuencia, existe una escasa información sobre los mismos. No obstante, la falta de información también podría ser debida al escaso poder de colonización de ambos géneros-forma y, por tanto, a la elevada especificidad de los sustratos colonizables. Independientemente de la causa, y ya que en la bibliografía consultada no se han indicado como agentes colonizadores de lentes de contacto hidrofílicas, la identificación de estos géneros-forma como agentes contaminantes de las mismas en el estudio realizado, constituye la primera cita conocida que se posee al respecto.

Penicillium es uno de los hongos más ubicuos y se considera un contaminante ambiental común. Muchas especies se encuentran entre las más abundantes del suelo, restos orgánicos, alimentos, polvo y aire. Son saprófitos, pero también invasores de frutas almacenadas como por ejemplo cítricos (*P. digitatum*, *P. italicum*, *P. glaucum*), manzanas (*P. expansum*), gladiolos (*P. gladioli*), etc. Muchos alimentos guardados en la nevera se enmohecen por especies de este género capaces de vivir a bajas temperaturas y sobre sustratos salados. Un número importante de especies pueden sintetizar metabolitos con

efectos tóxicos, así como antibióticos (Calvo et al. 1991). En general, no parece ser agente etiológico de los procesos patológicos de los que es aislado. Rara vez causa infecciones humanas, aunque se ha relacionado con queratitis, endoftalmitis, infecciones del oído externo, afecciones del pulmón, cerebro, invasión vascular, endocarditis, etc. Posiblemente, *P. marneffeii* sea la única especie conocida patógena primaria del hombre y de los animales (Jayanetra et al. 1984). En numerosos estudios, al igual que en el presente, se ha aislado el género de lentes de contacto hidrofílicas (Krachmer et al. 1978; Liesegang & Forster 1980; Liotet y Warnet 1981; Simitzis-Le Flohic et al. 1986), pudiendo producir queratitis (Ormerod & Smith 1986). Kirsch y Brownstein (1993) publicaron asimismo que tres lentes de contacto hidrofílicas fueron colonizadas por *Penicillium*, proporcionando a sus usuarios irritación y visión borrosa.

Phoma se aísla del suelo y generalmente se considera saprófito aunque también puede ser patógeno de plantas. *Phoma* y otros hongos filamentosos como *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Mucor* y *Ulocladium*, se han identificado como agentes responsables del deterioro de fachadas por originar cavidades y fisuras (Gómez-Alarcón et al. 1995). Por otra parte, es un inusual agente etiológico de enfermedades humanas, aunque diversas especies (*P. hibernica*, *P. eupyrena*, *P. cava*) provocan lesiones tanto en el hombre como en animales (Bakerspigel 1970, 1981; Gordon 1975). Se han descrito recientemente micosis faciales producidas, posiblemente, por el contacto continuo de los pacientes con el suelo infectado con *Phoma* conjuntamente con la aplicación tópica de corticoesteroides (Rosen et al. 1996). Asimismo, han sido provocadas por este género micosis subcutáneas (Hirsh & Schiff 1996). Según la bibliografía consultada, el estudio realizado ha servido para aislar por primera vez este género-forma de lentes de contacto hidrofílicas, aunque sí se ha identificado como agente contaminante de los portales (Gray et al. 1995). En consecuencia, los comentarios efectuados para *Gliomastix* y *Humicola* también son válidos para *Phoma*.

Según se ha expuesto en relación a la localización y aislamiento de la mayoría de los hongos identificados en el estudio realizado como invasores de

las lentes hidrofílicas, en general son cosmopolitas y sus conidios están dispersos en el aire. Por ello, es fácil que pueda producirse su adhesión a las lentes, así como la contaminación de los estuches, si las condiciones higiénicas no son las adecuadas. Al aislar los géneros *Phoma*, *Gliomastix* y *Humicola* de lentes hidrofílicas se confirma su presencia en la flora fúngica ambiental, su poder de colonización de polímeros hidrofílicos y, por tanto, constituyen nuevas citas de hongos contaminantes de lentes de contacto.

Resulta pertinente indicar que, aunque en el presente estudio no se cultivaron levaduras invasoras, ello no significa que estos microorganismos no hubiesen podido colonizar alguna de las lentes analizadas. Podría ser que estos hongos hubiesen invadido alguna lente, aunque este hecho no ha podido ser demostrado al no haber existido crecimiento en el medio de cultivo. En los estudios citados anteriormente (Berger & Streeten 1981; Liotet & Warnet 1981; Churner & Cunningham 1983; Simitzis-Le Flohic et al. 1983; Wilson et al. 1990), el cultivo de este tipo de hongos a partir de las lentes contaminadas también se ha llevado a cabo de manera esporádica. Como ejemplo, valga comentar que Liotet & Batellier (1985) indican que sólo un 4.2% de las lentes analizadas fueron invadidas por levaduras.

Dentro de los hongos filamentosos, e independientemente de la morfología de sus colonias originadas en las lentes, los hialinos son los que de forma mayoritaria invadieron las lentes analizadas en el presente estudio. Por su parte, Wilson & Ahearn (1986) identifican hongos dematiáceos en 6 de las 11 lentes de contacto contaminadas por hongos. Kirsh & Brownstein (1993) observan que 5 de las 7 lentes estudiadas están invadidas por este tipo de hongos que, en general, están presentes en el suelo, restos orgánicos y son saprófitos de plantas. Los hongos dematiáceos se han descrito como agentes causales de queratitis, incluyendo usuarios de lentes hidrofílicas (Forster et al. 1975; Wilson & Ahearn 1986; Adams et al. 1983). En este sentido, *Bipolaris specifera* fue aislado de una lente de contacto terapéutica de un usuario con úlcera de Mooren e inyección conjuntival (Sankaridurg et al. 1993).

La relación de hongos colonizadores de lentes hidrofílicas podrá ser ampliada en estudios posteriores ya que, en principio, cualquier especie que tenga las condiciones fisiológicas y ambientales que le permitan adherirse al material y posteriormente degradarlo, es una invasora potencial. Por tanto, en la invasión de las lentes cabe pensar en la intervención de factores intrínsecos del hongo (exopolímeros que faciliten la adhesión y enzimas metabólicos que alteren el material de las lentes), factores relacionados con el usuario (flora conjuntival, posibles procesos patológicos que alteren el segmento externo y la lágrima, toma de antibióticos y corticoides, etc.), factores relacionados con la lente (grado de hidrofilia e ionicidad el material, tipo de uso, etc.) y factores relacionados con la limpieza y desinfección de las lentes y de sus estuches (tratamiento y frecuencia). El abanico de posibles causas de colonización de las lentes es tan amplio y complejo que es muy difícil conocer el factor o factores de riesgo principales de cada usuario. Con el objeto de poder determinar los factores implicados se confeccionó un formulario que debía ser remitido al laboratorio conjuntamente con la lente correspondiente. No obstante, en la mayoría de los casos dicho cuestionario no fue cumplimentado y, en consecuencia, la falta de datos sólo nos ha permitido emitir hipótesis sobre la invasión.

Seguidamente se pasa a comentar algunos factores que pueden originar la colonización fúngica de las lentes de contacto hidrofílicas y que están relacionados concretamente con el usuario, la lente, su sistema de mantenimiento y con el propio hongo.

5.1.1. FACTORES RELACIONADOS CON EL USUARIO

Las lentes de contacto pueden estar contaminadas por los hongos presentes en la conjuntiva (Batellier et al. 1992). Por ello es interesante conocer que microorganismos forman parte de dicha flora. Mitsui & Hanabusa (1955) describen la presencia de flora fúngica en el saco conjuntival de individuos sanos con una incidencia del 18%, indicando asimismo que el porcentaje de hongos en

la conjuntiva aumenta después de una corticoterapia. Los estudios realizados por Wilson et al. (1969) sobre la flora fúngica conjuntival revelan que, usualmente, los hongos no forman parte de la misma aunque pueden estar presentes, aproximadamente, en un 5% de usuarios de lentes de contacto. La adaptación de las lentes no altera la flora conjuntival (Smolin et al. 1979; Elander et al. 1992). Según McBride (1979), el ojo no tiene por sí mismo una flora real, sino transeúnte procedente del medio ambiente, de los párpados y de las mucosas. Liotet y Warnet (1981) estiman también que la contaminación fúngica conjuntival es escasa, señalándola en un 3.92% de la muestra analizada. Ando & Takatori (1982) publican que el 15.4% de las conjuntivas estudiadas poseen flora fúngica en un ojo y el 1.8% en ambos. Cabe indicar no obstante que, el 63% de ellos son diabéticos graves. Estos valores se relacionan con la cantidad de conidios presentes en el aire, factor condicionado por el área geográfica donde se realiza el estudio y la estación del año.

En ocasiones no existe concordancia entre las especies aisladas de la conjuntiva y de las lentes de contacto, hecho que indica que probablemente haya una selección de especies. Liotet & Warnet (1981) indican que sobre las lentes se deposita una cantidad apreciable de esporas y levaduras procedentes del entorno (piel, aire) y de la conjuntiva. En general, el desarrollo aborta porque el aporte nutritivo es insuficiente y las defensas inmunitarias son eficaces. No debe olvidarse que los hongos saprófitos son patógenos oportunistas que bajo ciertas condiciones favorables pueden provocar una infección local.

Candida, *Rhodotorula*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium* son algunos de los hongos aislados de la conjuntiva (Nema et al. 1966; Liotet et al. 1980; Wilson & Ahearn 1986). No obstante, su presencia no implica necesariamente la existencia de alteraciones en el segmento externo ocular. La flora fúngica depende de la eficacia de las defensas inmunitarias locales (Liotet & Warnet 1981). La respuesta humoral y celular están estimuladas durante la infección fúngica. La importancia evidente de la reacción celular inmune incluye el hecho que las infecciones son más frecuentes en pacientes con inmunidad celular deprimida y los tejidos infectados por hongos muestran reacciones

mononucleares y granulomatosas (Abdel Rehim & Samy 1988). Pueden existir también infecciones oportunistas, especialmente en casos de traumatismos o de disminución de las defensas inmunitarias locales y generales (Batellier et al. 1992).

El análisis comparado de los resultados obtenidos por los distintos autores resulta muy difícil de efectuar debido a las diferencias existentes a nivel de las técnicas de aislamiento, la selección de la muestra y las condiciones ambientales locales. En el presente estudio se desconoce la presencia de hongos en la conjuntiva de los usuarios. Por ello, no se puede comprobar la posible relación existente entre el hongo presente en el saco conjuntival y la colonización de las lentes. No obstante, hay que remarcar la existencia de hongos como *Acremonium*, uno de los principales invasores de lentes de contacto hidrofílicas y que no ha sido nunca aislado de la conjuntiva. Por lo tanto, además de la posible presencia de hongos en la flora conjuntival, deben existir otras causas que contribuyan a provocar la invasión de las lentes.

La fuente principal de hongos en las lentes de contacto está relacionada con la higiene poco minuciosa efectuada por sus usuarios. En la experiencia llevada a cabo por Churner & Cunningham (1983) los usuarios no se lavaban las manos para manipular las lentes demostrándose que la desinfección efectuada era insuficiente. En el estudio realizado por Hart & Shih (1987) se comprueba que la manipulación de las lentes es su fuente principal de contaminación microbiana, si bien los microorganismos no sobreviven permanentemente sobre las lentes si el ojo está sano. En principio, se puede evitar la manipulación de las lentes utilizando las de uso continuado desechables. No obstante, Abdel Rehim & Samy (1988) detectan, en una muestra de 25 usuarios de lentes hidrofílicas de uso continuado, 25 de lentes hidrofílicas de uso diario y 25 de lentes rígidas, que los hongos están presentes en el 7.8% de las lentes de las primeras, en el 4% de las segundas y en ninguna lente rígida. Estos valores concuerdan con los obtenidos anteriormente por Ando & Takatori (1982). Además, estudios epidemiológicos indican que el riesgo a desarrollar úlceras corneales es diez veces superior en lentes desechables que en hidrofílicas de uso diario (Galentine

et al. 1984; Lemp & Gold 1986; Alfonso et al. 1986) ya que los usuarios alargan el tiempo de utilización de las lentes recomendado por el contactólogo.

Los cosméticos también pueden ser una fuente de contaminación de las lentes de contacto. Diversas especies fúngicas utilizan determinados componentes de los productos de maquillaje para su aporte nutritivo. *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Aureobasidium pullulans* y *Rhodotorula* son los hongos que con mayor incidencia han sido aislados de cosméticos oculares. *Fusarium solani* y *Candida parapsilosis* se cultivó a partir de los párpados y la conjuntiva de ambos ojos de una mujer no usuaria de lentes de contacto, así como de su máscara, sombra y perfilador de ojos. Es muy raro que un cosmético posea microorganismos antes de ser utilizado y por tanto, la contaminación se produce con el uso. En general, estos productos poseen conservantes como ésteres del ácido parahidroxibenzoico (parabens) que son efectivos contra algunos microorganismos, aunque ciertos hongos los hidrolizan. Este es el caso de *C. resinae* que utiliza el metil-parabens para su aporte nutritivo (Wilson et al. 1971). No obstante, y a pesar de que los hongos puedan colonizar los cosméticos, este hecho no parece intervenir de manera significativa en la contaminación de las lentes (Liotet & Warnet 1981).

Los procesos patológicos generales o localizados en el segmento externo ocular también pueden originar la colonización de hongos en las lentes de contacto. En condiciones normales, el ojo posee un sistema antimicrobiano capaz de mantener la lente estéril *in situ*. Hart & Shih (1987) demostraron que los microorganismos procedentes de la manipulación de las lentes hidrofílicas pueden persistir en la flora ocular más de 6 horas en la mayoría de casos, pero nunca este periodo de tiempo supera las 24 horas. Las inmunoproteínas lagrimales y la mucina cubren la lente y matan o inhiben algún patógeno potencial cuando el usuario no presenta patologías. Posiblemente, el parpadeo ofrezca un efecto beneficioso para eliminar los microorganismos introducidos con la manipulación y que consumen un exceso de nutrientes. Su crecimiento podría ser inhibido por la flora conjuntival normal.

Otros factores que contribuyen a mantener la esterilidad de las lentes y la salud ocular afectan, entre otros, a la barrera epitelial, exposición a la luz y al oxígeno y composición de la lágrima. Problemas corneales, oclusión palpebral y la inmunodepresión predisponen a los usuarios de lentes de contacto a la infección microbiana (Hart & Shih 1987). La queratitis microbiana puede deberse a traumatismos y patologías corneales intrínsecas que facilitan la entrada de patógenos potenciales en el estroma corneal. En los últimos años se ha visto un aumento del uso de lentes de contacto y la aparición de queratitis, patología que afecta en el 65% de los portadores de lentes según el estudio efectuado por Dart et al. (1991). En queratitis asociadas con traumatismo o enfermedad corneal anterior, los organismos responsables son bacilos gram negativos y *Acanthamoeba*. Los gram positivos se aíslan de queratitis asociadas con trauma o alteración corneal previa. Posiblemente se adhieren a las lentes durante el proceso de manipulación y son posteriormente inoculadas en el ojo. Bajo condiciones de relativa hipoxia corneal o microtrauma, el microorganismo puede atravesar el epitelio y alterar el estroma (Clark et al. 1994). La presencia de condiciones patológicas corneales con un defecto crónico epitelial, así como la medicación con antibióticos y corticoesteroides son un riesgo adicional para la queratomicosis con uso terapéutico de las lentes (Wilhelmus et al. 1988). Asimismo, una mala limpieza y desinfección de las lentes predisponen a los usuarios de lentes hidrofílicas no terapéuticas a la queratitis microbiana (Wilhelmus et al. 1988).

5.1.2. FACTORES RELACIONADOS CON LALENTE

El material de la lente parece condicionar también la colonización fúngica. Al igual que ocurre con la contaminación bacteriana, las lentes hidrofílicas son colonizadas por hongos más frecuentemente que las rígidas (Batellier et al. 1992). Liotet et al. (1983) observa que un 25% de las lentes hidrofílicas analizadas presentaban depósitos químicos en un periodo de tiempo más o menos largo. Se trataba de diferentes componentes lagrimales: orgánicos

(proteínas, mucopolisacáridos y lípidos) y minerales (cristalización de distintos iones como el calcio, fosfatos, carbonatos, etc). El tipo de depósito varía considerablemente de un usuario a otro en función de la composición de la lágrima. Los depósitos químicos permitirán el desarrollo del hongo y la aparición de una colonia macroscópicamente visible. Por el contrario, una lente limpia exenta de partículas orgánicas, en particular proteicas, dificultará el crecimiento del hongo, que utilizará sus propias reservas nutritivas y al poco tiempo morirá. Debemos indicar que la incidencia de depósitos químicos asociados con hongos ha sido baja en nuestro estudio (2.12% de las lentes analizadas y el 17.94% de las colonizadas). Los bajos valores porcentuales obtenidos nos hacen pensar que quizás la presencia de contaminantes químicos no facilite la colonización fúngica de las lentes. Posiblemente, la ubicación del microorganismo se efectúe al azar, ya que hemos comprobado también que colonias fúngicas se han desarrollado en la lente con independencia de los depósitos químicos presentes. Este es el caso de las lentes 31 y 320 (véase apartado 4.1.3.).

El grado de hidrofilia de las lentes es un factor que ha sido objeto de análisis repetidamente. Yamamoto et al. (1979), Churner & Cunningham (1983) y Simmons et al. (1986) muestran que los hongos tienen una gran habilidad para adherirse y penetrar en las lentes de contacto hidrofílicas, especialmente aquellas con alto contenido hídrico. También indican que las lentes con un grado de hidrofilia más elevado son más susceptibles de ser invadidas por hongos. Deberíamos preguntarnos qué se entiende por ser más susceptible. ¿Indica que el parámetro condiciona la invasión?, ¿implica que el número de colonias invasoras es mayor que en las lentes con bajo contenido hídrico?, o que ¿las colonias son de mayor tamaño?, quizás ¿las hifas internas tienen un diámetro superior?. Buffington et al. (1988) apuntan que el tipo de polímero y la especie del hongo afectan también al grado de penetración en la lente. En relación a este parámetro, se debe indicar que en el presente estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los porcentajes de colonización de las lentes con contenido hídrico menor y mayor al 50%. Es probable que el grado de hidrofilia del material sea importante según el tipo de hongo que ha de colonizar la lente. Tal como se comenta en el apartado 3.2., en relación a la

siembra e incubación de las lentes con especies conocidas y condiciones de cultivo controladas, el tipo de hongo y el aporte nutritivo juegan un papel transcendental en la colonización de los distintos materiales de lentes de contacto hidrofílicas.

Por otra parte, las alteraciones mecánicas (rayas, orificios, defectos de pulido, etc.) favorecen indirectamente el desarrollo de los hongos ya que provocan el acúmulo de proteínas necesarias para su metabolismo (Liotet & Warnet 1981; Batellier et al. 1992). En relación a este factor el presente estudio no permite aportar información precisa al respecto, ya que no se revisaron las lentes antes de su colonización y por tanto, no es posible confirmar si las irregularidades en la superficie de las lentes facilitan la invasión fúngica. No obstante, microscópicamente no se observaron irregularidades de la superficie lenticular en las zonas de colonización del hongo.

5.1.3. FACTORES RELACIONADOS CON EL SISTEMA DE MANTENIMIENTO

Se entiende por sistema de mantenimiento de las lentes el conjunto de procesos de limpieza y desinfección que debe efectuar su usuario para eliminar los posibles componentes químicos adheridos y los microorganismos presentes. Es importante la utilización de surfactantes para proceder a la limpieza de las lentes. Por su parte, las pastillas enzimáticas contribuyen a alterar las proteínas depositadas en la superficie lenticular y, por tanto, son eliminadas con mayor facilidad. La desinfección térmica o las diferentes soluciones con agentes antimicrobianos permiten reducir o eliminar los microorganismos presentes en las lentes. La limpieza y desinfección inadecuadas de las mismas contribuye al acúmulo de componentes lagrimales y al incremento de bacterias y hongos que pueden provocar el deterioro acelerado de las lentes y posibles alteraciones en el segmento externo ocular. En el presente estudio, los líquidos de conservación de las lentes que fueron analizadas no eran, en ocasiones, totalmente transparentes y presentaron finos filamentos más o menos blanquecinos que nos

permitieron presuponer la existencia de hongos invasores en las lentes. La presunción se corroboró en todos los casos mediante su cultivo en el laboratorio. Por el contrario, cuando el líquido de conservación era perfectamente transparente no obtuvimos el crecimiento del hongo en el medio de cultivo ni a partir de su siembra, ni de la propia lente y, en consecuencia, no se pudo realizar su identificación taxonómica.

La incorrecta higiene de las lentes determina su probable contaminación con microorganismos potencialmente patógenos, siendo los estuches de las lentes una importante reserva de los mismos. Clark et al. (1994), señalan que la contaminación de los portales estuvo presente entre el 19 y el 54% de los estuches analizados. Los mismos autores indican que el método de desinfección, la edad de las lentes y la utilización del agua del grifo en el cuidado de las lentes, están directamente asociados con la contaminación microbiana de los estuches. Gray et al. (1995) indican que el 81% de los portales por ellos examinados estaban contaminados por microorganismos y, de este porcentaje, el 24% presentaban hongos. En dicho estudio se identificaron los géneros *Cladosporium*, *Candida*, *Fusarium solani*, *Aspergillus versicolor*, *Exophiala* y *Phoma*. Muchos portales presentaron biofilms adheridos a la superficie. Todos los contaminantes microbianos aislados de los estuches contenían el enzima catalasa que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno al 3% es uno de los productos químicos más adecuados contra el desarrollo de los hongos. Según los mismos autores, el uso prolongado de este desinfectante puede seleccionar una población de microorganismos resistentes adaptados para sobrevivir a una exposición repetida del mismo. Resultados similares pueden obtenerse cuando se analizan otros desinfectantes de las lentes de contacto. Estudios *in vitro* demuestran que no todas las soluciones de desinfección poseen la misma eficacia frente a los microorganismos.

En el presente estudio no pudo conocerse el método de limpieza y desinfección empleado por cada usuario, así como la periodicidad de su utilización. Posiblemente, en la mayoría de los casos se aplicó una desinfección química, ya que la térmica está actualmente en desuso. Por tanto, no es posible

conocer si el método de mantenimiento de las lentes ha sido la causa principal de su colonización por hongos. No obstante, cabe pensar que la metodología utilizada por los usuarios o por los contactólogos una vez colonizadas las lentes fue, en general, la adecuada para provocar la muerte del microorganismo invasor, ya que el crecimiento de los hongos en el laboratorio pudo obtenerse sólo en el 35.90% del total de lentes colonizadas (véase apartado 4.1.2.). Por tanto, la mayoría de los hongos fueron susceptibles a los tratamientos a los que habían sido sometidos.

5.1.4. FACTORES RELACIONADOS CON EL HONGO

Para que tenga lugar la colonización de una lente por un hongo es necesario que el microorganismo se adhiera a su superficie. Determinados componentes lagrimales y, en particular, algunas proteínas adsorbidas a la superficie lenticular favorecen este mecanismo. Posteriormente, la liberación de exoenzimas fúngicos es el factor condicionante de la despolimerización del material. Algunos polímeros serán más resistentes que otros tanto a la adhesión como a la invasión. Asimismo, es conocido que los hongos filamentosos poseen, en general, una mayor variedad de enzimas metabólicos que las levaduras. Este hecho actuaría en favor de los primeros al colonizar los materiales de fabricación de las lentes de contacto (Batellier et al. 1992). La discusión sobre adhesión e invasión de las lentes será tratada más ampliamente en el apartado 5.2. de la memoria. Después de la adhesión, los enzimas fúngicos han de ser capaces de degradar los polímeros hidrofílicos permitiendo la invasión y proliferación por la matriz (Simmons et al. 1986).

La capacidad de adhesión de los hongos depende de factores genéticos, ambientales y de factores relacionados con el tipo de material de la lente (hidrofilia e ionicidad). Por su parte, la invasión de la lente comporta la despolimerización del material gracias a la acción de los enzimas liberados por el hongo. Algunos polímeros pueden constituir una fuente de carbono para el

desarrollo del micelio. Un tiempo de contacto suficientemente largo entre el hongo y la superficie de la lente puede condicionar el inicio de la despolimerización enzimática local y penetrar en su interior. Tripathi & Ruben (1980) muestran que el material HEMA o PVP son susceptibles de ser la fuente de carbono para *Acremonium*. Se estima que si este hecho fuese así, un hongo concreto invadiría siempre cualquier tipo de lente de contacto, independientemente de las condiciones nutricionales del entorno. Posiblemente algunas especies puedan realizar el proceso indicado, no obstante, las experiencias llevadas a cabo en el presente estudio con *Candida albicans*, y que serán expuestas en el apartado 5.2., permiten afirmar la incapacidad de esta levadura para poder utilizar el material de las lentes como fuente de carbono cuando se incubaba con suero fisiológico, mientras que sí puede hacerlo cuando se incubaba en un medio con fuente de carbono y nitrógeno. Por tanto, cabe considerar las condiciones nutricionales como uno de los factores limitantes que permiten la adhesión del hongo y la invasión de los materiales de las lentes de contacto hidrofílicas

Según Batellier et al. (1992) la morfología de las colonias en la matriz de las lentes depende de la especie invasora. Quizás no sea éste el único factor que condiciona la forma, y también se deba tener en cuenta el origen de la contaminación y el tipo de lente al establecer el modelo de penetración. Si un conidio se adhiere a la lente de contacto parece lógico pensar que se desarrolle adecuadamente una única colonia cuando las condiciones son favorables. Por el contrario, si el líquido de conservación de las lentes está altamente contaminado, es fácil que la invasión se produzca de forma masiva y se originen colonias menos ramificadas por la limitación de nutrientes. Este modelo es el que se ha encontrado de forma mayoritaria en el estudio realizado y en el cual, el hongo coloniza indistintamente la cara externa o la interna de la lente. En algún caso se comprobó que el extremo terminal de las hifas superficiales penetró en la matriz y colonizó una nueva zona de la lente. Es evidente que para poder observar este hecho, las hifas han de estar bastantes días en contacto con la lente.

Ya que en el presente estudio se han considerado tres modelos básicos de invasión fúngica de las lentes (véase apartado 4.1.1.) y no se ha dispuesto, en general, de información sobre el material de las lentes, el usuario de las mismas y sus sistemas de mantenimiento, no es posible relacionar la causa de la colonización con la morfología de las colonias invasoras observadas. Asimismo, se ha comprobado que diferentes especies adoptan la misma forma cuando ya han invadido las lentes (por ejemplo *Acremonium* sp y *Aspergillus niger*). Por todo ello, no se puede establecer un modelo que permita identificar al hongo invasor según la morfología adoptada y se ha debido recurrir al cultivo *in vitro* con medios adecuados para efectuar su identificación taxonómica.

Es importante que el contactólogo sepa reconocer la presencia de hongos en las lentes cuando el usuario desea efectuar una revisión. En este sentido, los biomicroscopios utilizados por estos profesionales ofrecen un número de aumentos comprendido entre 10 y 40, hecho que puede imposibilitar la observación de las pequeñas colonias hialinas y poco compactas que invaden las lentes y que pueden llegar a alterar el segmento externo ocular. Sería recomendable que los biomicroscopios estuvieran dotados de lentes de mayor aumento que permitieran paliar dicho inconveniente.

Por otra parte, se debe indicar que los diferentes hongos resisten la desinfección de forma variable. En general, la desinfección térmica es un método adecuado para prevenir la contaminación fúngica de las lentes aunque, frecuentemente, las esporas sobrevivan al ciclo de desinfección (Busschaert et al. 1978). Es mejor utilizarla después de una cuidada desproteinización. Cuando se trata de desinfección química, resulta importante poner de manifiesto que la eficacia de los productos comercializados frente a los hongos es relativa. Pocos son fungicidas, la mayoría son fungistáticos poco o nada efectivos.

Según lo expuesto, cabe proponer toda una serie de recomendaciones para prevenir la colonización de las lentes por hongos:

- * Educación de los usuarios en relación a la higiene de las lentes.

- * Higiene correcta de las manos previa a la manipulación.
- * Higiene de los párpados y las pestañas.
- * Limpieza regular y eficaz de las lentes.
- * Utilización de surfactantes adecuados para las lentes.
- * Desproteinización regular y eficaz de las lentes.
- * Elección de un desinfectante eficaz para los microorganismos presentes en las lentes.
- * Renovación frecuente de las soluciones de conservación de las lentes.
- * Renovación periódica de las lentes hidrofílicas.
- * Utilización de portales con celdas independientes para cada lente.
- * Limpieza regular y eficaz de los portales.
- * Renovación periódica de los portales.

5.2. COLONIZACION FUNGICA DE LAS LENTES HIDROFILICAS NUEVAS

La colonización de cualquier tipo de sustrato por parte de los hongos implica la adhesión del microorganismo a su superficie y la posterior ocupación o invasión de su matriz. Así pues, la adhesión y la invasión son los procesos necesarios para que tenga lugar la colonización de las lentes de contacto por parte de dichos microorganismos (véase apartados 3.2. y 4.2.). En la colonización intervienen numerosos factores que serán comentados seguidamente, siendo necesario el contacto íntimo del microorganismo con el sustrato, pero además, ha de tener lugar la liberación de exoenzimas que permitan la utilización del mismo, originando productos metabólicos asimilables por el hongo. La reacción química que acontece durante el proceso de invasión es la hidrólisis catalizada por diferentes hidrolasas liberadas por el microorganismo.

Atendiendo a los resultados sobre la colonización de levaduras y de hongos

filamentosos a las lentes de contacto, valga recordar que *Candida albicans* 93150 y *Aspergillus niger* 2700 fueron las únicas cepas que se adhirieron e invadieron las lentes hidrofílicas de uso continuado (véase apartados 4.2.1.1. y 4.2.1.2.) y, por tanto, se eliminaron del estudio. Asimismo, se pusieron de manifiesto diferencias más o menos importantes tanto en la adhesión como en la invasión en función de la especie fúngica, de las condiciones de cultivo y del tipo de polímero de las lentes. La influencia que puede ejercer cada uno de los factores indicados en el proceso de colonización se discuten seguidamente de forma conjunta para cada tipo de lente.

5.2.1. INFLUENCIA DEL HONGO

ADHESION

Los resultados sobre la adhesión fúngica a los polímeros de las lentes utilizadas fueron distintos en función de la especie considerada. Así, *C. albicans* y *A. niger* mostraron frecuencias y densidades de adhesión significativamente distintas, independientemente del medio de cultivo y del tipo de material de las lentes hidrofílicas, siendo siempre mayores las del hongo filamentoso. Posiblemente, este hecho se deba a que las condiciones de cultivo y la presencia de materiales hidrofílicos favorecieron la asociación entre el microorganismo y la superficie lenticular. En general, la pared de los hongos juega un papel muy importante en el proceso de adhesión a cualquier tipo de superficie, ya que es el primer lugar de interacción entre las células fúngicas y el sustrato a colonizar. La determinación de su composición química, desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, contribuye a esclarecer la influencia de los distintos componentes en el complejo proceso de la adhesión (véase apartado 1.2.). Además de los polisacáridos, las glucoproteínas, especialmente las manoproteínas (galacto y xilomanoproteínas) son los principales constituyentes de la matriz de muchas paredes fúngicas (Gow & Gadd 1995). En

ellas coexisten los componentes químicos que aumentan su hidrofobicidad y los que la disminuyen. Por ello, la concentración relativa de los mismos, su distribución, configuración y yuxtaposición deben determinar la tendencia de la célula a mostrar sus propiedades superficiales. Así, por ejemplo, proyecciones de la superficie celular (proteínas hidrofóbicas) pueden penetrar a través de las fuerzas repulsivas electrostáticas existentes entre la superficie del microorganismo y del sustrato e incrementar la adhesión entre ambos.

No obstante, la pared del hongo no posee una composición química estática e invariable y tanto dicha composición como la proporción de sus componentes estructurales pueden variar atendiendo a las condiciones de cultivo, a la presencia de blastoconidios o de pseudohifas/hifas, en el caso de las levaduras y de conidios o de hifas, en el de un hongo filamentoso. En consecuencia, el cambio de la composición química de la pared celular posiblemente debe modificar las características hidrofóbicas del microorganismo, hecho que ha de influir sobre la capacidad de adhesión a cualquier superficie y, en particular, a las lentes de contacto. Según Holmes et al. (1992), los cambios de la pared celular se ponen de manifiesto, por ejemplo, cuando se observa un cultivo de células levaduriformes de *C. albicans* que no forma agregados; no obstante, éstos se originan masivamente cuando se induce la formación de hifas. Gracias a la manipulación con cationes divalentes y los tratamientos con agentes que provocan la alteración de las proteínas, dichos autores concluyen que la agregación es causada por dichos cationes al colocarse de forma sinérgica entre zonas de carácter aniónico y las proteínas. Asimismo, las manoproteínas de *C. albicans* cambian drásticamente durante la conversión de blastoconidio a hifa, por tanto, la capacidad de adhesión de la pared celular está relacionada con la composición y proporción de las manoproteínas, que puede variar con las condiciones de cultivo (Gow & Gadd 1995). Desde un punto de vista químico, los blastoconidios y el micelio de *C. albicans* tienen una composición cualitativa similar y las diferencias son principalmente cuantitativas. En este sentido, los polisacáridos fibrilares (β -glucano y quitina) están siempre presentes así como el material amorfo (manano). No obstante, éste es más abundante en estructuras levaduriformes (Takahashi et al. 1991). Dado que en el presente estudio fueron

las estructuras filamentosas las que se adhieren mayoritariamente a las lentes de contacto, cabe pensar que sea principalmente el material fibrilar el que esté más desarrollado y ejerza una acción directa sobre la adhesión.

No existe información sobre la posible existencia de cambios estructurales de la pared de *A. niger* cuando se forma el tubo germinativo y se originan las hifas. No obstante, al igual que acontece en *C. albicans* durante la conversión de blastoconidio a hifa, es posible que dichos cambios también estén presentes en el hongo filamentosos y determinadas secreciones externas de las hifas actúen como responsables de la adhesión a diferentes superficies. Así, por ejemplo, los conidios hidrofóbicos de *A. niger* poseen proteínas, lípidos y glúcidos además de una capa externa amorfa responsable de su hidrofobicidad y adhesión (Cole et al. 1979). Sin embargo, en el presente estudio el análisis microscópico de las lentes de contacto hidrofílicas no permitió distinguir de manera precisa la presencia de conidios del hongo filamentosos adheridos a su superficie; cuando existió adhesión de los microorganismos a los polímeros, ésta corrió a cargo principalmente de las hifas. Posiblemente, la presencia de filamentos fúngicos de *C. albicans* y de *A. niger* adheridos a los materiales de las lentes fuese debida a que la pared del pseudomicelio o del micelio era hidrofílica o relativamente hidrofílica bajo determinadas condiciones de cultivo. Por su parte, la adhesión de los conidios hidrofóbicos no pudo llevarse a cabo posiblemente porque los polímeros sobre los que debían adherirse eran hidrofílicos.

En consecuencia y según lo expuesto, la pared de las cepas 93150 de *C. albicans* y 2700 de *A. niger* capaces de adherirse a los polímeros de las lentes, deberían tener en algún momento del periodo de incubación una composición química a base de polisacáridos fibrilares, manoproteínas y secreciones externas en una proporción adecuada para que su superficie fuera hidrofílica o parcialmente hidrofílica facilitando, por tanto, la adhesión del hongo a los hidrogeles. Paralelamente, las cepas que no pudieron adherirse a las lentes a lo largo del periodo de estudio, presentaron en la pared unos componentes o una proporción de los mismos que les confirieron unas características superficiales excesivamente hidrofóbicas, incompatibles con la adhesión a los polímeros

hidrofílicos. Por otra parte, las diferencias de adhesión entre ambas especies a los polímeros de las lentes cabe buscarlas posiblemente en la mayor proporción de componentes químicos hidrofílicos presentes en *A. niger* o en una distribución de los mismos en la pared celular que pueda conducir a una mayor densidad de hifas adheridas.

INVASION

Al contrario de lo que acontece con la adhesión, los trabajos publicados sobre invasión efectuados *in vitro* con levaduras son muy escasos, siendo más numerosos los estudios que han tratado aspectos relacionados con la colonización de lentes de contacto con hongos filamentosos. Posiblemente este hecho se deba a que son los primeros los que contaminan con mayor frecuencia las lentes de uso diario y uso continuado no terapéuticas, es decir, las más ampliamente utilizadas.

La formación de hifas permite a los hongos potenciar su crecimiento invasivo y, por tanto, la colonización de sustratos (Gimeno et al. 1992). Bajo condiciones de cultivo menos específicas, los hongos filamentosos forman micelio más fácilmente que las levaduras, siendo además capaces de sintetizar y liberar una variedad de enzimas hidrolíticos más amplia que ellas. La secreción de enzimas fúngicos es un hecho importante en su tipo de vida, crecimiento saprofítico o patogenicidad. El hongo es capaz de colonizar determinados hábitats mediante la liberación de enzimas particulares en respuesta a condicionantes ambientales (Gow & Gadd 1995). En consecuencia, tanto la facultad de formar micelio como el tipo y la cantidad de enzimas hidrolíticos sintetizados determinan un mayor poder invasivo por parte de los hongos filamentosos, hecho que debe actuar en favor de los primeros en el momento de colonizar los materiales de las lentes de contacto. Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman esta suposición, de manera que el porcentaje de lentes hidrofílicas con colonias internas, así como la densidad y tamaño de las mismas fue siempre superior en los cultivos de *A. niger* que en los de *C.*

albicans. Por otro lado, se consiguió provocar la penetración *in vitro* de la levadura en algunos materiales de las lentes de contacto analizadas, fenómeno que, a tenor de los datos existentes en la bibliografía, no parece ser frecuente. Así por ejemplo, Simitzis-Le Flohic et al. (1983) indican que no es posible llevar a cabo la colonización de las lentes hidrofílicas con levaduras ya que son totalmente superficiales y no aparecen nunca en la matriz.

Valga indicar que no fue posible distinguir la especie invasora de las lentes de contacto hidrofílicas mediante el análisis microscópico de las mismas. Las colonias internas de *C. albicans* y de *A. niger* mostraron siempre una disposición helicoidal con una mayor o menor densidad de hifas en función del material, del medio de cultivo utilizado y de los días de incubación. En general, el hongo filamentoso originó colonias de mayores dimensiones, pero dado que también aparecían otras de menor tamaño, únicamente mediante el análisis microscópico no fue posible determinar si la especie colonizadora era una levadura o un hongo filamentoso.

5.2.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO

MEDIO DE CULTIVO

Adhesión

El grado de adhesión de las células fúngicas a una superficie depende, entre otros factores, de las condiciones de cultivo establecidas. Según las consideraciones expuestas en el apartado precedente y atendiendo a los resultados obtenidos, posiblemente, el medio de cultivo en el que se incuba el inóculo con las lentes de contacto debe condicionar la composición cualitativa y cuantitativa específica de la pared fúngica así como su metabolismo,

determinando las características superficiales del microorganismo y, por tanto, condicionando su posible adhesión. Así por ejemplo, según Loeb et al. (1993), si el medio de cultivo es agua o un tampón, la adhesión a una superficie sólida es directamente proporcional a la hidrofobicidad de la misma; si la suspensión es más compleja, la colonización del sustrato dependerá del microorganismo y de su mecanismo de anclaje. La presencia de proteínas en solución torna el material más hidrofílico y, por tanto, modificará la adhesión microbiana de forma particular para cada organismo, aumentándola o disminuyéndola (Loeb et al. 1993).

En el presente estudio se utilizaron tres medios de cultivo de composición química muy distinta: suero fisiológico, caldo dextrosado de Sabouraud al 2% y lágrima sintética para el cultivo de las lentes hidrofílicas de uso continuado (véase apartado 3.2.1.1.2.). Procede comentar, en primer lugar, que la observación microscópica de los cultivos con suero fisiológico permitió apreciar que tanto en *C. albicans* como en *A. niger* la proliferación de micelio o de pseudomicelio y el diámetro de las hifas o de las pseudohifas fue inferior a la obtenida con el caldo de Sabouraud y con la lágrima sintética. Probablemente, esta circunstancia esté relacionada con la composición química de dicho medio en la que figura exclusivamente el cloruro sódico, sin la presencia de una fuente de carbono y de nitrógeno que facilite el buen desarrollo de los hongos. El empleo del medio de Sabouraud permitió observar a ojo desnudo una formación muy elevada de conidios en el lugar de incubación de las lentes, es decir, las cámaras y los viales. Asimismo, microscópicamente se puso de manifiesto la presencia de un micelio abundante y bien desarrollado. Teniendo en cuenta que la composición química de la pared fúngica varía en función del medio de cultivo (Loeb et al. 1993), el mayor desarrollo de los hongos con Sabouraud líquido y, en menor grado con lágrima sintética, parece probable que fuese debido a que los componentes químicos de dichos medios fueron los más adecuados para permitir la adhesión de los microorganismos a la superficie de las lentes.

Efectivamente, los resultados sobre la adhesión de *C. albicans* 93150 y de *A. niger* 2700 a las lentes difirieron en función del medio de cultivo utilizado en

la incubación de los polímeros (véase apartado 4.2.1.3.). Por tanto, se puede indicar que la adhesión de ambos hongos a las lentes hidrofílicas y la densidad de la misma está condicionada por el medio de cultivo. Según Corner et al. (1986) y Odds (1988), el suero fisiológico induce la formación de hifas de *C. albicans*. En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, y aunque este hecho sea así, la pared de las hifas de dicha especie generadas al ser cultivada con el medio indicado debía presentar una composición química que no le permitió su adhesión a los polímeros de las lentes de contacto. En este sentido, Hazen et al. (1986) y Kennedy & Sandin (1988) publicaron que *C. albicans* posee una hidrofobicidad más elevada cuando se cultiva con suero fisiológico a 37 °C que cuando se hace en un medio complejo como el caldo de Sabouraud. Esta elevada hidrofobicidad podría conducir a una adhesión nula de la levadura a determinados polímeros hidrofílicos de las lentes de contacto, como es el caso del polymacon, el tefilcon, y el bufilcon A, siendo débil en el resto de materiales. Por su parte, *A. niger* 2700 se adhirió a todos los polímeros al ser incubados con suero fisiológico. Posiblemente, dicho medio no condujo en este hongo a la aparición de superficies tan hidrofóbicas como en el caso de *C. albicans* 93150 y, por tanto, permitió su adhesión, en mayor o menor medida, a todos los materiales utilizados.

Mientras en las incubaciones de *A. niger*, los mayores porcentajes de adhesión se registraron en los cultivos con lágrima sintética, en *C. albicans* los valores más elevados se obtuvieron con el medio de Sabouraud, si bien la lágrima permitió también una adhesión relativamente importante. Procede recordar que la lágrima utilizada en el estudio poseía principalmente proteínas, lípidos y sales; entre éstas figura el cloruro de potasio, de calcio y de magnesio las cuales parecen aumentar la adhesión de *C. albicans* (McCourtie & Douglas 1981). En general, los iones divalentes disminuyen las fuerzas de repulsión electrostáticas que operan en la superficie de los sustratos, afectando a su hidrofobicidad y aumentando la adhesión. Posiblemente, estos iones ejercieron el mismo efecto sobre *A. niger* y, por tanto, fue el medio de cultivo que condujo a frecuencias de adhesión más elevadas. El hecho de que en *C. albicans* el porcentaje de lentes con adhesión fuese mayor con Sabouraud líquido que con

lágrima sintética puede ser debido a que la levadura, de forma más sustancial que el hongo filamentoso, precise de los componentes químicos presentes en el medio de Sabouraud y ausentes en la lágrima sintética (peptona y glucosa) que le permitan llevar a cabo un buen desarrollo celular y la síntesis de los componentes estructurales de la pared que le faciliten su adhesión a los polímeros hidrofílicos.

En relación a las proteínas presentes en la lágrima natural, Butrus & Klotz (1986) indican que la adhesión de *C. albicans* a las lentes de contacto rígidas aumenta con la presencia de albúmina, lactoferrina, lisozima y fibronectina. Probablemente, tenga lugar la adsorción de las proteínas a la superficie de las lentes tornándolas más hidrofílicas, pero además esta levadura posee receptores específicos para la albúmina y la fibronectina que contribuyen a incrementar su adhesión. Dicha especie también se adhiere mejor a lentes hidrofílicas utilizadas por usuarios que a lentes nuevas. En base a los resultados obtenidos en el presente estudio y según se ha indicado anteriormente, la cepa 93150 de la levadura y en menor grado la 2700 del hongo filamentoso, se adhirieron a la superficie de las lentes hidrofílicas en un porcentaje elevado al ser incubadas en lágrima sintética, medio de cultivo que, además de los iones divalentes mencionados, también posee lisozima, lactoferrina y albúmina. Las dos primeras, conjuntamente con la β -lisina, la ceruloplasmina, las inmunoglobulinas, el complemento y la transferrina protegen la superficie ocular contra la invasión de los microorganismos. Takahashi et al. (1991) indican que la lisozima es una proteína básica activa contra *Cryptococcus neoformans*; no obstante, no está definida la acción que puede ejercer sobre *C. albicans* ni sobre *A. niger*. Por su parte, la lactoferrina inhibe el crecimiento de determinados hongos al quelar los iones hierro próximos al microorganismo. En la lágrima sintética utilizada no se añadió hierro y por tanto, ésta no pudo actuar como molécula quelante. Se desconoce, por tanto, si las dos sustancias antimicrobianas ejercen alguna acción en la adhesión de ambos hongos a las lentes y, si dicho proceso existe, cómo podrían influir en ella. Para determinar la importancia de ambas proteínas en la adhesión sería necesario comparar los resultados obtenidos con aquéllos resultantes del cultivo de los microorganismos con una lágrima sintética carente

de las proteínas indicadas.

Según los resultados obtenidos en los cultivos de las lentes hidrofílicas de uso diario, la adhesión de *C. albicans* 93150 y de *A. niger* 2700 fue mayor cuando se utilizó caldo de Sabouraud, independientemente del material de las lentes utilizadas. Dicho medio provocó en ambos hongos mayores porcentajes de lentes con hifas adheridas y grados de adhesión más elevados que el suero fisiológico. Es conocido que la galactosa y, en menor grado, la glucosa presentes en cualquier medio de cultivo provocan una elevada síntesis de manoproteínas de la capa más externa de la pared de los hongos determinando, en consecuencia, que aumente su adhesión (Torres-Rodríguez y Carceller 1993). De los dos medios utilizados en la incubación de las lentes de uso diario, la glucosa sólo se encuentra en el medio de Sabouraud y quizás este hecho contribuya a que la adhesión de ambos hongos a las lentes sea superior al cultivarlas en él que al hacerlo en suero fisiológico, un medio que exclusivamente posee cloruro sódico. Por tanto, la glucosa y la peptona presentes en el primer medio suministran a los hongos la fuente de carbono y de nitrógeno que necesitan para desarrollarse y realizar sus procesos metabólicos de forma adecuada, al mismo tiempo que permiten la síntesis de los componentes químicos de la pared relacionados con la adhesión a los polímeros de las lentes.

Por último procede indicar que, cuando existió adhesión de ambos hongos a las lentes de uso continuado, los porcentajes fueron inferiores a los que acontecieron con las lentes de uso diario del mismo grupo después de 7 días de incubación con las mismas condiciones de cultivo. Por tanto, además de la influencia que ejerce el medio de cultivo en la adhesión a los materiales, la composición química de los mismos también ha de jugar un papel importante en el proceso, según se comentará más adelante.

Invasión

Al igual que en el caso de la adhesión las características del medio de

cultivo influyen en la frecuencia y la intensidad de la invasión fúngica. De hecho, el medio debe permitir el desarrollo adecuado del microorganismo, es decir, tanto la realización de sus procesos metabólicos vitales como la secreción de los enzimas hidrolíticos capaces de facilitar su penetración en los polímeros de las lentes. Así, *C. albicans* nunca invadió las lentes hidrofílicas cuando se incubó con suero fisiológico o con lágrima sintética; solamente lo consiguió en los cultivos en medio de Sabouraud y en un número de lentes relativamente bajo. Por su parte, *A. niger* pudo penetrar en todos los materiales con cualquiera de los tres medios, si bien las frecuencias más elevadas de lentes colonizadas así como densidades superiores se alcanzaron con el Sabouraud líquido. Curiosamente, la lágrima sintética que facilitó la adhesión de *A. niger* a un número elevado de lentes permitió solamente una escasa invasión de las mismas. Posiblemente este medio facilite la adhesión fúngica por la presencia de proteínas, lípidos y sales, pero dichos componentes sólo permiten la síntesis de una reducida cantidad de enzimas que otorgan al hongo la capacidad de colonizar los diferentes materiales. De aquí se desprende que existen marcadas diferencias, tanto en lo que concierne a las frecuencias de invasión como a la densidad de la misma, según el hongo y el medio considerado. Una posible explicación a estos resultados podría encontrarse en los nutrientes que cada tipo de hongo requiere para poder sintetizar los enzimas que deben despolimerizar los materiales. Así, mientras los cultivos en suero y en lágrima no permitieron que *C. albicans* pudiera sintetizar dichos enzimas, sí lo hicieron en el caso de *A. niger*. Por su parte, el medio de Sabouraud aportó las sustancias nutritivas necesarias para que ambos hongos pudiesen invadir las lentes, mientras que la lágrima sintética sólo fue utilizada por el hongo filamentoso. Por tanto, cabe asumir que cada hongo necesita un aporte de nutriente diferente para colonizar un mismo material.

Posiblemente, la levadura precise de condiciones de cultivo distintas a las establecidas en el estudio para penetrar más fácilmente en las lentes de contacto. No obstante, no debe olvidarse que el poder de colonización de sustratos por una levadura es inferior que el de los hongos filamentosos y, en consecuencia, es posible que condiciones óptimas de cultivo tampoco hubiesen

permitido que *C. albicans* invadiese con tanta profusión como *A. niger* las lentes estudiadas. En concordancia con estas observaciones cabe citar el trabajo de Batellier et al. (1992), quienes indican que la contaminación de las lentes de contacto necesita un aporte nutritivo, en particular de péptidos y de hidratos de carbono, sin los cuales el desarrollo del hongo no se puede efectuar. Bisignano et al. (1988) exponen que la inoculación de las lentillas en suero fisiológico con una suspensión de *A. niger*, aislado de lentes contaminadas, no permite el desarrollo del micelio; este hecho pone en evidencia la importancia que tienen las sustancias nutritivas para que se produzca la colonización. Simmons et al. (1986) efectuaron estudios experimentales de colonización de lentes de contacto hidrofílicas con cultivos puros de hongos filamentosos incubados en una solución salina balanceada, observando claramente la penetración del micelio. Por tanto, en este caso, el medio utilizado permitió que las cepas fúngicas liberaran los enzimas necesarios para penetrar en la matriz de las lentes. Es decir que, al igual que ocurre con la adhesión de los hongos a las lentes de contacto, una fuente de carbono y de nitrógeno aportada por el Sabouraud líquido es muy importante para que tenga lugar, en mayor o menor medida, la invasión de los polímeros. Valga precisar, no obstante, que no significa que otros medios de cultivo, como el suero fisiológico y la lágrima sintética, no permitan la penetración fúngica pero, según los resultados obtenidos en el presente estudio, mediante aquéllos la densidad de colonias internas y el porcentaje de lentes colonizadas resulta ser sensiblemente menor.

PERIODO DE INCUBACION

Adhesión

En párrafos precedentes ya se ha indicado que las condiciones de cultivo influyen de manera importante sobre las características de la pared fúngica y por tanto, sobre su capacidad de adhesión a determinadas superficies. Atendiendo

al periodo de incubación de las lentes hidrofílicas de uso diario los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que mientras la adhesión de la levadura prácticamente no se vió incrementada a lo largo del periodo de estudio, en el hongo filamentoso se registró un aumento significativo de la frecuencia y de la densidad de hifas adheridas. Según Klotz (1990), el tiempo de permanencia de los microorganismos con un polímero afecta a su adhesión, de manera que cuanto mayor sea el periodo de incubación mayor posibilidad tendrán las células de elaborar polímeros extracelulares que faciliten la adhesión. Tunlid et al. (1992) señalan que la unión inicial puede inducir a un aumento de secreción de glucocálix, principalmente de glucoproteínas. Asimismo, estos autores indican que cuando *C. albicans* crece en medio líquido puede segregar una cubierta cuyo grosor aumenta con la edad del cultivo. No obstante, según los resultados obtenidos en el presente estudio, este fenómeno solamente se registró en el caso de *A. niger*. Posiblemente, la diferencia de resultados entre ambos hongos sea debida a que determinadas condiciones de cultivo no favorezcan la síntesis de los componentes químicos superficiales de *C. albicans*, responsables de la adhesión a las lentes. Quizás un aporte de medio fresco, un cambio de la temperatura de incubación, del pH, etc. podrían conducir a modificar cualitativa y cuantitativamente la composición y el metabolismo de las capas más externas de la pared fúngica, facilitando la adhesión. Atendiendo a los resultados obtenidos, las condiciones de cultivo establecidas para *A. niger* sí fueron adecuadas para que tuviese lugar su adhesión a los diferentes polímeros, independientemente de los días de incubación.

Invasión

Las lentes hidrofílicas de uso diario junto con los hongos fueron sometidas a un periodo de incubación variable. Según indican Batellier et al. (1992), los tiempos necesarios para que tenga lugar la colonización son variables en función de las condiciones de cultivo; la temperatura, la humedad y la presión osmótica influyen en el ritmo de crecimiento del hongo. Bisignano et al. (1988) exponen que son necesarios tiempos largos de incubación comprendidos entre 15 y 20

días para conseguir la invasión de lentes de contacto hidrofílicas de HEMA con un 38% de contenido hídrico. Por otra parte, Simmons et al. (1986) indican que *Curvularia lunata* germina y penetra en lentes de contenido hídrico del 55% en un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 7 días de incubación, aunque dicho periodo depende del microorganismo considerado. Los resultados de invasión de los polímeros en base a su hidrofilia y carácter iónico obtenidos en el presente estudio serán comentados más adelante. No obstante, en relación al periodo de incubación valga indicar que *C. albicans* penetró prácticamente en todos los polímeros cuando se cultivó en Sabouraud líquido y el incremento de días de cultivo de la levadura con los diferentes materiales no implicó una variación de la frecuencia de lentes invadidas, ni de la densidad del micelio invasor. Su incubación con suero fisiológico no permitió la invasión de ningún polímero aunque se incrementase el número de días. Estos resultados coinciden con los de adhesión. Por el contrario, *A. niger* consiguió invadir las lentes independientemente del medio de cultivo, aumentando siempre el porcentaje de lentes colonizadas y el grado de penetración de las hifas con los días de incubación. También en este caso, los resultados son semejantes a los obtenidos en el caso de la adhesión. Así pues, se registraron también aquí diferencias ostensibles entre los resultados de la levadura y del hongo filamentoso. Posiblemente, estas diferencias puedan encontrarse en las condiciones de cultivo, menos favorables para la levadura y que no facilitaron el desarrollo óptimo del micelio/pseudomicelio ni aún incrementando el número de días de incubación.

Por otro lado, quizás la disminución del aporte nutritivo que tiene lugar al aumentar los días de incubación y el acúmulo de productos metabólicos celulares puedan ser factores que afecten al buen desarrollo de la levadura influyendo, por tanto, sobre la colonización de los distintos materiales; por su parte, *A. niger* 2700 no sería tan dependiente de las condiciones indicadas.

Procede indicar que, a pesar de que se registraron diferencias de invasión de los polímeros entre ambos hongos según el periodo de incubación, cuando existió penetración del micelio en cualquiera de los materiales estudiados, ésta

se produjo generalmente ya al tercer día de cultivo. Si la invasión no tuvo lugar en este periodo, ésta ya no se produjo por mucho que se aumentase el número de días de incubación. Es decir, que si las condiciones de cultivo, la composición química del polímero y el tipo de hongo son adecuados para colonizar un material, la invasión se efectúa siempre en cortos periodos de tiempo. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Buffington et al. (1988) quienes indican que la invasión de las lentes de bufilcon A y de vifilcon A por *Curvularia lunata* a las 72 horas no varían ostensiblemente de los obtenidos a las 120-168 horas y a las 192-240 horas.

LUGAR DE INCUBACION

Adhesión

Por lo que respecta a los dos lugares donde tuvo lugar la incubación de las lentes hidrofílicas de uso continuado, las frecuencias de adhesión de ambos hongos fueron mayores cuando aquéllas se incubaron en cámara. Estos resultados cabe interpretarlos como lógicos dado que la evaporación del medio que tuvo lugar a través de la tapa de la cámara facilitó la adhesión de los filamentos fúngicos a la superficie de los polímeros. Con la elección de dos lugares de incubación distintos en los que el grado de evaporación también fuera diferente, se pretendía constatar que un hongo es capaz de desarrollarse en sitios donde hay poca disponibilidad de líquido. Este es el caso de las tapas o paredes de los portales destinados a guardar las lentes de contacto hidrofílicas. Según los resultados obtenidos cabe asumir que dichos estuches pueden constituir, si las condiciones son favorables, una reserva importante de diferentes tipos de microorganismos colonizadores potenciales de las lentes (véase apartado 5.1.3.).

Invasión

En relación al lugar de incubación de las lentes de uso continuado cabe recordar que, la frecuencia de lentes que presentaron adhesión fúngica fue siempre superior en cámara; resultados similares se obtuvieron al atender la invasión de los polímeros. Por tanto, de aquí se deduce la importancia que tiene la adhesión de un hongo a una superficie, concretamente a una lente de contacto, en el proceso posterior de penetración. Esto no quiere decir que cuando exista adhesión fúngica a un material tenga lugar la invasión del mismo, sino que cuando ésta se produce, debe haber tenido que existir previamente la adhesión del microorganismo. Así por ejemplo, *A. niger* invadió las lentes de polýmacon cuando se incubaron en cámara con suero fisiológico registrándose previamente el proceso de adhesión (véase figura 4.2.1.). En cambio, no hubo invasión después de su cultivo en vial con el medio indicado, ya que tampoco tuvo lugar su adhesión al polímero. Por tanto, con la cámara de incubación se consiguen frecuencias de invasión fúngica algo más elevadas que con el vial porque facilitan la evaporación del medio y la adhesión de los hongos a la superficie a colonizar. No obstante, si las condiciones de cultivo como la temperatura, humedad, medio de cultivo, pH, etc. no son adecuadas y el hongo no puede sintetizar los enzimas hidrolíticos que le permitan invadir las lentes, la colonización no se produce, a pesar de que el microorganismo se encuentre adherido al polímero.

5.2.3. INFLUENCIA DEL TIPO DE MATERIAL DE LAS LENTES

ADHESION

Es evidente que el tipo de superficie influye de manera transcendental en los fenómenos de adhesión fúngica existiendo una relación directa entre éstos y la hidrofobicidad del material. Así, por ejemplo, Minagi et al. (1986) al estudiar

la adhesión de *C. albicans* y *C. tropicalis* a varias resinas de dentaduras, demostraron que el grado de implicación depende de las características del polímero y del estado hidrofóbico de la pared del microorganismo. La adhesión de levaduras hidrofílicas a las resinas estuvo asociada con el grado de hidrofilia del material. Asimismo, determinadas cepas uropatógenicas de *C. albicans* se adhieren débilmente a la superficie de polímeros hidrofílicos, mientras que su adhesión es superior cuando se tratan materiales hidrofóbicos (Kiremitci-Gumisdereloglu & Pesmen 1996). En el presente estudio se eligió, entre otras, la cepa 93189 de *Torulopsis glabrata* por su elevada adhesión al material hidrofóbico de un catéter intravenoso implantado en un paciente, de donde fue aislada. Posiblemente, fue la composición química de la superficie de la pared de dicha cepa la que facilitó su adhesión al material hidrofóbico del catéter intravenoso y, por tanto, parece lógico que fuera nula su adhesión a las lentes hidrofílicas de uso continuado. No obstante, y ya que las condiciones de cultivo fueron diferentes, se deseó conocer si dicha cepa era capaz de adherirse también a los materiales de las lentes.

Se debe tener en cuenta que las lentes de contacto utilizadas están constituidas total o parcialmente por materiales hidrofílicos; incluso las lentes rígidas permeables a los gases, que están fabricadas con componentes químicos hidrofóbicos, poseen un tratamiento superficial con objeto de presentar la máxima hidrofilia y de esta forma hacer posible su humectabilidad. Por tanto, la superficie de todas las lentes es hidrofílica y la pared de los hongos ha de presentar un cierto grado de hidrofilia para que tenga lugar la adhesión de los mismos. El porcentaje de agua de cada polímero es variable, así como sus características iónicas (véase apartado 3.2.1.2.1.). Tanto los componentes químicos presentes en un material como la proporción en la que figuren determinarán sus características hidrofílicas y su ionicidad influyendo sobre la capacidad e intensidad de la adhesión fúngica.

Para dar explicación a los resultados de adhesión obtenidos en el presente estudio se debe conocer la composición química de los distintos materiales. Este proceso no es fácil de llevar a cabo ya que dichos polímeros poseen marcas

registradas con fórmulas celosamente protegidas, hecho que imposibilita conocer en su totalidad la composición cualitativa y cuantitativa de los mismos. Así por ejemplo, a pesar de que en principio y según la información disponible, el scafilcon A no posee poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (p-HEMA), la caracterización química efectuada permitió determinar que si este polímero no está presente, cosa que parece altamente improbable, debe existir otro similar y en proporciones parecidas, dotado de un elevado número de grupos hidroxilo; en el espectro IR efectuado dicho polímero provocó la aparición de una banda ancha con una vibración de tensión centrada aproximadamente en la frecuencia de los 3450 cm^{-1} (véase apartado 4.2.1.), es decir, la misma posición que corresponde a los grupos indicados (Hummel 1991). Además, el scafilcon A al igual que el resto de materiales, debe poseer un agente reticulante que le confiere su estructura tridimensional y que tampoco figura en la información disponible sobre el mismo (véase apartado 3.2.1.2.1.). Por tanto, se puede indicar que los cuatro materiales utilizados parecen poseer una composición química similar y exceptuando determinados monómeros como el ácido metacrílico (MA) o la N-vinilpirrolidona (NVP) que únicamente están presentes en determinados materiales, las diferencias estructurales entre ellos son más de tipo cuantitativo que cualitativo.

Según indican los resultados obtenidos, el grado de adhesión de los hongos fue dependiente del tipo de material de las lentes. Así, por ejemplo, el vifilcon A fue más susceptible a la adhesión por *C. albicans* que el resto de materiales cuando se cultivó con suero fisiológico. El mismo polímero y el bufilcon A, es decir, los más iónicos, presentaron siempre los mayores porcentajes de adhesión por parte de la levadura al ser incubada con medio de Sabouraud. Así pues cabe asumir que los materiales más iónicos son más susceptibles a sufrir la adhesión de la levadura. En los cultivos con *A. niger* se obtuvieron resultados algo distintos, porque tanto con suero fisiológico como con medio de Sabouraud fueron los materiales más hidrofílicos los que mostraron porcentajes de adhesión más elevados. En principio cabría pensar que la ionicidad de los polímeros debe influir en la adhesión fúngica, aumentándola o disminuyéndola. Así, el MA es el responsable del carácter iónico de los polímeros a pH fisiológico. No obstante,

se desconoce en qué proporción se encuentra en el bufilcon A y en el vifilcon A y, por tanto, no se puede establecer su relación con la adhesión. Sin embargo, se debe indicar que los medios de cultivo utilizados se van acidificando como resultado de la actividad metabólica de los hongos y, en consecuencia, el grado de ionización del MA debe variar en función de dicho parámetro. Cuanto más ácido sea el medio de cultivo, menos ionizado se encontrará el monómero y menor importancia tendrá el carácter iónico de los materiales. Por tanto, es posible que en algunos de los cultivos realizados, especialmente en aquéllos que el valor del pH fue menor, la ionicidad del material tuvo una relativa importancia en la adhesión. Ya que, en términos generales, la acidificación de los medios de cultivo con *C. albicans* fue menor a la que tuvo lugar con *A. niger*, la cantidad de grupos carboxilo ionizados presentes en los cultivos de los polímeros iónicos debía ser más elevada en el primer caso y, en consecuencia, la influencia de la ionicidad fue más patente. Así, y tal como ocurrió, la levadura se adhirió mejor a los polímeros iónicos (butilcon A y vifilcon A) que el hongo filamentoso. Este, por su parte, prefirió adherirse a los materiales con mayor grado de hidrofilia (scafilcon A y vifilcon A); ambos poseen NVP, monómero que incrementa la hidratación de los polímeros. En principio, se desconoce en qué proporción se encuentra este constituyente en cada material, pero el espectro IR efectuado permitió determinar que es más abundante en el scafilcon A, lo cual coincide con el hecho de poseer un grado de hidrofilia superior al vifilcon A (71 y 55% respectivamente). Por tanto, se puede asumir que la presencia de NVP parece facilitar la adhesión de *A. niger*. Posiblemente, de nuevo se deba buscar una explicación en el valor del pH de los medios de cultivo durante la incubación de los polímeros. Tal como se ha indicado, al ser más ácidos con *A. niger* que con *C. albicans*, el papel que desempeñaría la ionicidad de los materiales en la adhesión sería poco relevante ya que el MA se encontraría en forma ácida, adquiriendo mayor importancia en la adhesión su grado de hidrofilia.

Según lo expuesto se comprende que el tefilcon, al ser un material no iónico y con un contenido hídrico inferior al 50% es decir carente de MA y de NVP, fuese el polímero que mostró siempre menores frecuencias de lentes con adhesión fúngica y densidades más baja de filamentos adheridos,

independientemente del hongo considerado y de las condiciones de cultivo.

INVASION

Respecto a la influencia de los distintos tipos de materiales en el proceso de invasión, valga comentar en primer lugar que todas las lentes rígidas permeables a los gases presentaron deterioro ocasionado por *A. niger* a los 7 días de cultivo con medio de Sabouraud, mientras que no todas las lentes hidrofílicas fueron invadidas por el hongo bajo las mismas condiciones de cultivo. De aquí se desprende que, el hongo libera los enzimas hidrolíticos necesarios para alterar la superficie lenticular, no pudiendo penetrar en el material, posiblemente a causa de la estructura molecular compacta propia de este tipo de materiales. Sin embargo, la disposición de los componentes químicos de un polímero hidrofílico en forma reticulada permitió, en mayor o menor medida, la invasión de los hongos.

Cabe indicar que todos los materiales hidrofílicos se comportaron de manera semejante en relación a su invasión por *C. albicans* de manera que se puede aceptar que el tipo de polímero no influye en la invasión por la levadura. Los porcentajes de lentes invadidas y la densidad de colonias internas siempre fue nula después del cultivo con suero fisiológico y débil al considerar el caldo de Sabouraud. Por tanto, parece que el factor limitante para que tenga lugar la invasión sea el propio hongo o las condiciones de cultivo, más que la composición química de los distintos polímeros. Los resultados obtenidos referentes a la levadura no permiten determinar la importancia que tiene el tipo de material de las lentes en el proceso de penetración del hongo. Para poder explicar dicha relación deben ser analizados los resultados de invasión correspondientes a *A. niger*. En este caso fue posible comprobar que el tipo de polímero condicionó la frecuencia de lentes con penetración del micelio fúngico e influyó sobre el grado de invasión de las mismas. Fueron precisamente los materiales más hidrofílicos (scafilcon A y vifilcon A) los que manifestaron densidades más elevadas de hifas internas, independientemente del medio de

cultivo utilizado y de los días de incubación. Por el contrario, el tefilcon se separó claramente de los otros polímeros por mostrar menores valores porcentuales de lentes invadidas y densidad de colonias internas más baja. Por tanto, parece estar claro que en el proceso de invasión de las lentes por *A. niger*, la hidrofilia de un material es más importante que su ionicidad. Así, por ejemplo, dentro de los materiales iónicos, el bufilcon A y el vifilcon A poseen porcentajes de agua similares (45 y 55% respectivamente), sin embargo, los resultados de invasión del vifilcon A fueron más parecidos a los que se registraron con el scafilcon A (no iónico y grado de hidrofilia del 71%) que con el bufilcon A. También es cierto que los dos materiales con mayor grado de hidrofilia mostraron un comportamiento semejante en relación a la adhesión del hongo, lo cual vuelve a demostrar la importancia de la misma como primer proceso necesario para conseguir la colonización de un sustrato.

Ya se ha comentado en el apartado referente a la influencia del tipo de material de las lentes en la adhesión, la importancia de conocer la composición química de los polímeros y lo difícil que resulta conseguirlo. Según la información que se ha podido obtener, el scafilcon A y vifilcon A son los únicos polímeros que poseen NVP, monómero que permite incrementar su hidratación. Por tanto, se puede indicar que la presencia de NVP parece facilitar la invasión de *A. niger*. De todos los monómeros que en principio forman parte de los materiales estudiados, sólo poseen nitrógeno la NVP, presente sólo en los dos materiales indicados, y la diacetona acrilamida (DAA), constituyente del bufilcon A. El nitrógeno de la NVP se encuentra en anillos de carbono que se disponen en grupos laterales; según los resultados obtenidos en el estudio, el nitrógeno de dicho monómero sería utilizado por el microorganismo siendo más fácilmente accesible al ataque enzimático del hongo que el nitrógeno de la DAA, incluido en los grupos amida. Ahora bien, si la NVP fuera el único monómero responsable de las diferencias de invasión entre los materiales, cabría esperar que el scafilcon A fuera el polímero más susceptible a la invasión del hongo, lo cual no es del todo cierto. Con el suero fisiológico como medio de cultivo las frecuencias de lentes colonizadas fueron mayores en el vifilcon A, independientemente de los días de incubación. El empleo del Sabouraud líquido

determinó la aparición de diferencias de invasión más ostensibles entre ambos polímeros al tercer y al séptimo día de cultivo, desapareciendo prácticamente aquéllos en días sucesivos. Es decir, que un alto grado de hidrofilia es muy importante para obtener frecuencias y grados de invasión elevados. Asimismo, cabe pensar en la posible influencia de la carga en los polímeros iónicos, de la cual es responsable el MA. Este se encuentra ionizado en forma de sal sódica cuando las lentes nuevas se extraen del líquido de suspensión, es decir, al principio de la fase experimental llevada a cabo. A medida que transcurren los días de incubación va disminuyendo el pH como consecuencia de la actividad metabólica del hongo y se va perdiendo el carácter iónico del material. El sodio va siendo liberado al tiempo que el medio se acidifica y es utilizado por el hongo hasta que se agota. Este hecho explicaría por qué la invasión del vifilcon A se produce de forma más rápida que la del scafilcon A, para igualarse posteriormente. De esta manera, la proporción de agua, algo inferior en el vifilcon A que en el scafilcon A (55% y 71% respectivamente) quedaría compensada por ser el primero un material iónico. Si la ionicidad juega su papel principal cuando se inicia el cultivo de las lentes, lógicamente aquellas fabricadas con materiales menos hidrofílicos (sin NVP) y no iónicas (sin MA) deberían presentar menores frecuencias de invasión. Según lo expuesto, y de acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio el tefilcon, al ser un polímero no iónico y con un porcentaje hídrico de tan sólo el 37.5%, es el material que presentó, en general, menores frecuencias de lentes invadidas e inferiores grados de invasión.

De manera general, los resultados obtenidos coinciden con la información bibliográfica existente sobre el tema y en la que se indica que los hongos tienen más capacidad para adherirse y penetrar en las lentes blandas con alto contenido hídrico (Wilhelmus et al. 1988; Batellier et al. 1992). En el presente estudio se ha podido constatar que existe una relación directa entre el grado de hidrofilia de las lentes y el desarrollo del hongo en su interior, de forma que la invasión aumenta al incrementarse el contenido hídrico. La mayor frecuencia de lentes invadidas, la incidencia más elevada de colonias internas, así como sus mayores dimensiones en las lentes con un porcentaje de agua superior al 50%, induce a pensar que la estructura química menos compacta de los polímeros

más hidrofílicos, puede ser la responsable de dichos resultados. En estos materiales y desde el punto de vista cuantitativo, el medio de cultivo líquido debió penetrar en su interior de una manera más importante que en los polímeros menos hidrofílicos. Por ello, el scafilcon A y el vifilcon A fueron los que principalmente se tornaron de color pardo después de ser incubados con caldo de Sabouraud, siendo más intensa la coloración cuando el hongo estudiado fue *A. niger*. En consecuencia, si el medio de cultivo posee una fuente de carbono y de nitrógeno, como es el caso del Sabouraud líquido, el desarrollo de las colonias internas debe verse favorecido. Un medio adecuado en el interior y en el exterior de las lentes debe implicar una actividad metabólica más elevada de las colonias ubicadas en la matriz lenticular, una mayor liberación de enzimas hidrolíticos responsables de la despolimerización del material y de la degradación de la lente; asimismo, debe existir una mayor asimilación de los componentes hidrolizados, proceso que ha de conducir a un mayor tamaño de las colonias internas y del diámetro de las hifas que las constituyen.

Cuando el medio de cultivo en el que se incuban las lentes no posee fuente de carbono y de nitrógeno, como es el caso del suero fisiológico, los procesos indicados también deben tener lugar, pero el desarrollo del hongo ha de verse altamente atenuado por la falta de requerimientos nutritivos. Algunos autores como Tripathi & Ruben (1980) piensan que el HEMA es susceptible de ser la fuente de carbono para el hongo colonizador. Posiblemente, y según lo expuesto, este hecho sea así en algunas ocasiones; quizás además del HEMA otros monómeros (como la NVP, la DAA, etc.) también puedan ser utilizados por los hongos como fuente de carbono o de nitrógeno. No obstante, es de suponer que, de nuevo esta circunstancia dependa del microorganismo considerado, así como del material a colonizar, sin olvidar el posible efecto del medio de cultivo utilizado. Así, *C. albicans* fue incapaz de utilizar ninguno de los polímeros hidrofílicos de las lentes cuando se incubó en suero fisiológico y, en consecuencia, el material no fue susceptible de constituir la fuente de carbono necesaria. En cambio, el empleo de un medio de cultivo con carbono y nitrógeno permitió la invasión de los polímeros por parte de la levadura. Cabe pensar por tanto, que la degradación de las lentes de contacto por parte de las dos especies

indicadas debe ser un proceso químico más que mecánico, ya que si no fuera así, ambos microorganismos deberían haber invadido los materiales con la misma intensidad y frecuencia. Sin embargo, y ya que esto no es lo que aconteció, las diferencias de invasión deben venir marcadas posiblemente por el tipo y cantidad de enzimas hidrolíticas sintetizadas y liberados por los hongos.

Tal como se comentó en los resultados de colonización de las lentes hidrofílicas de uso diario se observaron diferencias de acidificación del medio de cultivo utilizado en la incubación de las mismas al final del periodo de estudio, atendiendo al hongo considerado, al medio y al tipo de polímero. Así, a pesar de que todos los cultivos dieron valores ácidos de pH, los que se realizaron con Sabouraud líquido, *A. niger* y los materiales más hidrofílicos, dieron valores de pH más bajos. Posiblemente estos resultados estén relacionados con una mayor actividad metabólica y desarrollo de este hongo bajo las condiciones indicadas; éstas deben inducir una liberación más importante de productos del metabolismo celular, al mismo tiempo que tiene lugar la despolimerización de los materiales en las zonas de penetración. Los procesos indicados acontecen de forma más activa en el scafilcon A y el vifilcon A que en aquéllos que poseen menores grados de hidrofilia (tefilcon y bufilcon A). Ya que los hongos crecen mejor en medios ácidos, quizás los usuarios de lentes de contacto con un pH lagrimal más ácido puedan verse afectados por un mayor desarrollo de estos microorganismos y, en consecuencia, la colonización de sus lentes. No obstante, se debe recordar que en condiciones normales la lágrima real tiene un pH próximo a la neutralidad (7.2-7.4), por tanto, la acidificación de la misma sólo sería posible en el caso que existiese alguna alteración en la composición química de la misma, por exceso o defecto de alguno de sus componentes habituales.

5.3. ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LAS LENTES DE CONTACTO HIDROFILICAS

La discusión de los resultados obtenidos después de efectuar el análisis

ultraestructural de las lentes de contacto hidrofílicas procedentes de usuarios (véase apartados 3.1. y 4.1.) y nuevas a las cuales se les provocó la colonización de *C. albicans* 93150 y de *A. niger* 2700 (véase apartados 3.2.1.2., 4.2.1.1.2. y 4.2.1.2.2. se realiza conjuntamente en el presente apartado con el objeto de evitar repeticiones.

La microscopía electrónica de barrido es un instrumento adecuado para poder observar la distribución de las hifas que se adhieren o invaden las lentes de contacto y el biodeterioro de los polímeros hidrofílicos. En consecuencia, constituye un complemento perfecto de la microscopía óptica convencional con la que no es posible realizar análisis detallados de la superficie de las lentes. La exploración de la misma con el haz de electrones proporciona una resolución (10 nm) muy superior a la que puede conseguirse con los microscopios ópticos actuales (200 nm), un aumento superior a 100 veces y una profundidad de campo más elevada. Los electrones secundarios, producidos por el haz primario y emitidos por la muestra con baja energía, son los responsables de la elevada resolución topográfica de la imagen obtenida (Sawyer & Grubb 1987).

No obstante, todos los procesos a los que deben ser sometidas las muestras previamente a su observación (fijación, deshidratación y secado, principalmente), pueden provocar su alteración. Las distorsiones y los artefactos causados por los tratamientos químicos son un problema difícil de paliar. Asimismo, las condiciones de trabajo empleadas para conseguir la máxima resolución resultan ser perjudiciales para las muestras. El material de las lentes hidrofílicas utilizadas en el estudio se manifiestan altamente vulnerable al haz de electrones, lo cual genera perforaciones en la zona de observación cuando el análisis no se efectúa de forma rápida.

Según los resultados expuestos sobre las estructuras helicoidales (véase apartado 4.1.4.) presentes en las lentes colonizadas por *A. pullulans* y *A. niger* 2700 (colonizador de las lentes nuevas), se puede emitir dos hipótesis. La primera, indicaría la presencia de bacterias helicoidales asociadas a las hifas o directamente ancladas al polímero de las lentes. La segunda, comportaría que

dichas hélices son estructuras propias de los hongos y les servirían para la perforación y anclaje de las hifas a las lentes, facilitando su colonización.

Para analizar detenidamente la primera hipótesis se ha de considerar el orden Spirochaetales, es decir, bacterias helicoidales móviles, unicelulares con fisiología y hábitats heterogéneos. Incluye anaerobios obligados, facultativos, aerobios obligados y desde formas de vida libre hasta parásitos. Son microorganismos relativamente largos (5-500 μm), delgados y flexibles. Esta última característica no parece estar presente en las hélices cilíndricas observadas en las lentes de contacto. Según Johnson (1986) estructuralmente todas las espiroquetas tienen una morfología característica con un cilindro protoplasmático central rodeado por una membrana y una pared celular estrechamente adherida. Entre el cilindro helicoidal y la cubierta externa existe un número variable de estructuras filamentosas, las fibrillas axiales (filamentos axiales o flagelos), similares a los flagelos de otras bacterias tanto en su aspecto como en su composición química. Están fijadas en posición subterminal a uno y otro extremo del cilindro protoplasmático y se extienden a lo largo del cuerpo del microorganismo.

Se conocen actualmente cinco géneros diferentes de estos organismos, incluidos en el orden Spirochaetales: *Spirochaeta*, *Criptispira*, *Treponema*, *Borrelia* y *Leptospira*. Tres géneros adicionales, *Pillotina*, *Hollandina* y *Diplocalyx*, se proponen también como miembros de este orden (Johnson 1986). Por las características morfológicas, fisiológicas y ecológicas de todas ellas, se selecciona en principio el género *Spirochaeta* como posible contaminante de las lentes, en el caso que las estructuras helicoidales sean de origen bacteriano. Ya que los cultivos efectuados no permitieron el crecimiento de espiroquetas, no se puede aceptar ni descartar que el género indicado sea el responsable de la contaminación de las lentes de contacto, ni tan siquiera que se trate de este tipo de microorganismos.

Según la segunda hipótesis emitida, atendiendo a las características morfológicas de las estructuras helicoidales observadas en contacto con las

células fúngicas de *A. pullulans* y de *A. niger* se puede indicar que, podría tratarse de una estructura desarrollada por el propio hongo, dada la aparente continuidad existente entre las estructuras helicoidales y la pared fúngica. Su función podría estar relacionada con un mecanismo de perforación y anclaje de estos hongos sobre las lentes, facilitando su colonización. El hecho de que en *A. pullulans* nunca se observara la penetración del micelio en el interior de la matriz lenticular, pero sí estuvieran presentes las estructuras helicoidales perforando la superficie de las lentes, darían un cierto sentido a esta hipótesis. Procede recordar que *A. niger* es un hongo capaz de invadir la matriz de las lentes mediante la disposición helicoidal de sus hifas. No obstante, al observar las lentes invadidas por dicho microorganismo, algunas hifas superficiales presentaron, asimismo, las hélices descritas. Este hecho podría explicarse porque el desarrollo de las mismas tendría lugar en aquellas hifas que no pudieran penetrar en la matriz. En ambas especies, las hélices probablemente se desarrollarían al mismo tiempo que tiene lugar el crecimiento de las hifas y de esta forma se fijarían a las lentes. No obstante, es difícil dar explicación a la presencia de fragmentos de estructuras helicoidales en *A. pullulans* que no poseen relación aparente con las hifas fúngicas.

Por otra parte, es conocido que la adhesión de los hongos a la superficie de los polímeros puede estar relacionada con determinados componentes de su pared (véase apartado 1.2.4.). Se han descrito en la bibliografía la existencia de cápsulas, mucinas y/o material mucilaginoso de las hifas de *A. pullulans* (Pechak & Crang 1977; Gilbon et al. 1986), así como una capa fibrosa en la superficie del micelio (Takeo et al. 1993) que podrían tener relación con la adhesión a diferentes superficies. También se han citado ciertos polisacáridos extracelulares que facilitarían la adhesión de la especie (Andrews et al. 1994). Después de dicho proceso, la colonización de diferentes materiales por hongos requiere la fijación y/o la penetración de las hifas del microorganismo. En este sentido, las estructuras helicoidales observadas en *A. pullulans* y en *A. niger* después del estudio realizado contribuirían a esta acción, así como al biodeterioro de las lentes de contacto. Procede constatar que la morfología helicoidal fue también la que adoptaron la mayoría de los hongos que colonizaron las lentes de

contacto hidrofílicas procedentes de usuarios (véase apartados 4.1.2 y 4.1.3.) y todas las lentes nuevas a las que se provocó la colonización de *C. albicans* (véase apartado 4.2.1.1.1.) y *A. niger* (véase apartado 4.2.1.2.1.).

Estructuras de penetración están presentes en determinados dermatófitos como *Trichophyton mentagrophytes*. La especie produce órganos en forma de cuña que perforan el pelo y facilitan su penetración en el mismo de forma radial. Otros hongos patógenos de plantas poseen estructuras que facilitan la infección de las hojas (Carlile & Watkinson 1994). El extremo del tubo germinal de la espora puede hincharse y originar un apresorio para facilitar el anclaje del hongo a la hoja de la planta. La invasión tiene lugar gracias a una fina hifa, cuyo ápice tiene forma de punta de lanza y que crece desde el apresorio perforando la cutícula (Gow & Gadd 1995). Una célula tubular con el extremo afilado es un método eficaz para penetrar en el sustrato. Posteriormente, crece en el interior de la célula y origina un haustorio, estructura que tiene un importante papel en la transferencia de sustancias entre el huésped y el hongo. En algunos hongos, el estímulo provocado por el contacto entre dos células es suficiente para inducir la formación de las estructuras de infección citadas (Carlile & Watkinson 1994). No obstante, ninguna de ellas es morfológicamente similar a las hélices cilíndricas observadas en *A. pullulans* y *A. niger*. Desde un punto de vista fisiológico, existe una similitud entre la delgada y afilada hifa tubular y las hélices de ambas especies, ya que facilitan la firme adherencia de los hongos al sustrato. No obstante, las estructuras helicoidales no condicionan el parasitismo de las dos especies. Es probable, que faciliten el anclaje de los microorganismos para soportar la acción del parpadeo, o la limpieza de las lentes con productos específicos. Quizás, aquellas hifas que no pueden penetrar en la matriz de las lentes hidrofílicas adoptando la morfología típica helicoidal ya descrita originen las estructuras observadas en *A. pullulans* y *A. niger* con el objetivo de colonizar el material.

De acuerdo con la bibliografía consultada, las estructuras helicoidales descritas en ambas especies no han sido citadas con anterioridad en otros hongos durante los procesos de colonización. Posiblemente, y de ser cierta la

segunda hipótesis emitida, las hélices las desarrollen sólo algunas cepas o hifas de hongos al entrar en contacto con determinados materiales.

Procede indicar que, para ratificar o descartar las hipótesis emitidas en relación a la etiología de las estructuras helicoidales descritas en *A. pullulans* y *A. niger* se deberían conseguir en el laboratorio cultivos del microorganismo contaminante. De esta forma, si la muestra obtenida fuera abundante, se podrían reproducir las condiciones de cultivo de las lentes con el microorganismo colonizador y se realizarían observaciones de las muestras con microscopía electrónica de transmisión. Debe indicarse que la alteración del polímero al ser tratadas las lentes para ser procesadas con este instrumento impidió efectuar su análisis. Se debería conseguir una técnica que evitara la alteración de los materiales empleados y, en consecuencia, posibilitara su observación. Únicamente si después del análisis con microscopía electrónica de transmisión estuvieran presentes las características morfológicas típicas de las espiroquetas descritas anteriormente, se podría dar por válida la primera hipótesis. Si por el contrario estuvieran ausentes, o se detectaran aspectos morfológicos típicos de los hongos, se ratificaría la teoría emitida sobre la importancia fisiológica de las hélices cilíndricas en el anclaje de las hifas fúngicas a las lentes de contacto hidrofílicas.

Para concluir este apartado se debe indicar que se continuará profundizando en el estudio de las estructuras helicoidales observadas y descritas en las especies mencionadas. Parece difícil el aislamiento y crecimiento de la cepa de *A. pullulans* que colonizó las lentes de contacto hidrofílicas y, por tanto, también lo es la reproducción de los resultados con nuevas lentes. Sin embargo, es fácil conseguir el cultivo de *A. niger* 2700 así como provocar la colonización de nuevas lentes con este microorganismo. En consecuencia, y a pesar de que dichas estructuras parecen ser muy poco frecuentes en esta cepa, el estudio se centrará en ella, preparándose las muestras principalmente para ser observadas mediante microscopía electrónica de transmisión.

5.4. ANALISIS DE LAS LENTES DE CONTACTO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Los trabajos publicados desde los años ochenta referentes al origen, principios funcionales, aplicaciones actuales y posibilidades de futuro de la microscopía confocal son relativamente numerosos (Petran et al. 1985; Minsky 1988; White et al. 1987; Kino y Corle 1989; Shotton & White 1989; Paddock 1991; Brakenhoff et al. 1993; Wright et al. 1993; Litchman 1994; Schwartz et al. 1996; etc). A su vez, es relativamente escasa la bibliografía que versa sobre estudios micológicos y más concretamente, sobre la detección de especies fúngicas en lentes de contacto, así como las posibles alteraciones corneales que pueden provocar estos microorganismos. Destacan en este sentido, los estudios realizados por Czymmek et al. (1994) que ponen de relieve la gran utilidad de la microscopía confocal en la dinámica celular, interacciones hongo-huésped, estructura y función de orgánulos celulares, localización del citoesqueleto y citoquímica. Ocasionalmente se han analizado lentes de contacto hidrofílicas con el propósito de determinar la aparición de depósitos proteicos en diferentes materiales de fabricación (Meadows & Paugh 1992, 1994). La utilización del microscopio confocal en oftalmología se ha destinado, hasta el momento, al diagnóstico de úlceras corneales (Cavanagh & Petroll 1993), a la identificación de bacterias causantes de queratitis (Kaufman et al. 1995; Moazami et al. 1995; Winchester et al. 1995; Kaufman et al. 1996), a la observación *in vivo* de la película lagrimal (Mathers & Daley 1994), así como al seguimiento de los cambios micromorfológicos producidos en la córnea después de una queratomileusis (Nagel et al. 1995).

La escasez de estudios sobre las aplicaciones de la microscopía confocal en micología posiblemente viene determinada por la reciente comercialización de los microscopios confocales. Por este motivo, y con el objetivo de ampliar la información aportada sobre la colonización fúngica de las lentes de contacto, se decidió efectuar un estudio sobre el desarrollo interno de las colonias en distintos materiales de lentes de contacto mediante un método no invasivo.

El análisis se efectuó de forma más exhaustiva para las lentes colonizadas por *A. niger* que para las invadidas por *C. albicans*, ya que la actividad de esta última especie para penetrar a través de los diferentes polímeros utilizados fue siempre reducida. Además, cabe recordar que las lentes rígidas permeables a los gases únicamente fueron degradadas por *A. niger*. Los resultados de invasión de ambos hongos se encuentran ampliamente expuestos en el apartado 4.2. del capítulo anterior.

Con el microscopio confocal se observó que las mayores colonias, es decir, las más profundas y ramificadas de ambos hongos, aparecieron en los grupos II y IV. En las figuras 4.2.25. y 4.2.36. se aprecia claramente el mayor desarrollo del micelio interno de *A. niger*. Las colonias de *C. albicans* que invadieron las lentes nunca alcanzaron el tamaño de las de *A. niger*. Como se ha indicado en otros capítulos, la dotación enzimática de la levadura no permitió degradar los polímeros con tanta eficacia como lo hizo el hongo filamentoso. Las colonias pequeñas estuvieron presentes en todos los materiales estudiados. Lógicamente, estos resultados concuerdan con las observaciones efectuadas mediante microscopía óptica convencional (véase apartado 4.2.). Ya que el material de que se dispuso es el mismo en ambos análisis, lo único que se pretende con la utilización de la microscopía confocal es determinar las posibles ventajas que manifiesta este instrumento en relación a la microscopía óptica convencional. En este sentido, el microscopio confocal permite ver la morfología y el tamaño de las colonias internas, totalmente enfocadas, hecho que puede conseguirse sólo parcialmente con el microscopio óptico convencional; la profundidad con que penetran las hifas y el grado más o menos acusado de ramificación dificulta la observación de las colonias. Además, debe tenerse en cuenta que cuando el objetivo de un microscopio óptico convencional enfoca la muestra en un plano, el material situado por encima y por debajo de él también devuelve luz y se crean imágenes borrosas. Este hecho permite enfocar correctamente una hifa o la porción de ella que se encuentre en el plano de enfoque, pero se observan al mismo tiempo otros filamentos ubicados en diferentes planos, y por tanto desenfocados, que distorsionan la imagen. La dispersión de la luz no aporta información sino que crea un resplandor difuso que tiende a encubrir la luz

procedente del plano de interés, reduciendo además el contraste. Estos problemas quedan paliados con la utilización del microscopio confocal.

Mediante la microscopía confocal se confirman los resultados de colonización de las lentes rígidas permeables a los gases por parte de *A. niger*, observadas con microscopio óptico convencional. El deterioro exclusivamente superficial de este tipo de lentes queda patente en la figura 4.2.35. Al no ser capaz el hongo de penetrar a través del polímero, la única imagen obtenida demuestra el ataque superficial del material. Por tanto, también en este caso, la microscopía confocal permite corroborar las observaciones efectuadas mediante el microscopio óptico convencional.

La mayoría de microscopios confocales que utilizan luz procedente de un láser también poseen lámparas halógenas de luz blanca para localizar rápidamente el área de interés. Los láseres de argón, helio-neón, argón-kriptón y helio-cadmio son relativamente económicos y producen una excelente excitación de una gran parte de colorantes fluorescentes. No obstante, algunos instrumentos también utilizan luz blanca como fuente de iluminación cuando trabajan con confocalidad. En ellos, y al igual que los microscopios que emplean el láser, la luz situada fuera de foco es reducida sustancialmente. No obstante, poseen una resolución menor y las imágenes tienen una menor intensidad (Petran 1985, Chen 1989, Kino 1989). Para obtener una buena imagen con microscopía confocal es importante efectuar una correcta selección de la fuente de luz, de la muestra, del objetivo a utilizar, del tamaño del "pinhole", del número de secciones, de la distancia entre ellas, etc. En general, se obtienen buenas imágenes si se trabaja con materiales altamente reflectantes como el hueso y los dientes (Petran 1985), pero se prevén unas aplicaciones muy limitadas en micología (Czymmek et al. 1994). Por todo ello, se decidió utilizar el láser de argón-kriptón como fuente de iluminación de las lentes colonizadas por hongos.

Para poder obtener imágenes con microscopía confocal y realizar secciones ópticas a diferente profundidad, es necesario que la luz utilizada en la iluminación de la muestra pueda penetrarla. La transparencia de las lentes de contacto

empleadas en nuestro estudio facilitó que la luz seleccionada penetrara fácilmente. Asimismo, la luz reflejada por las hifas que forman parte de las colonias internas permitió formar imágenes en las diferentes secciones ópticas efectuadas y no fue necesaria la utilización de marcadores fluorescentes. Es decir, se observaron colonias vivas sin necesidad de ser mecánicamente seccionadas, fijadas y teñidas. Por tanto, las distorsiones y artefactos provocados por el micrótopo y los tratamientos químicos fueron totalmente eliminados al observar las muestras con microscopía confocal por reflexión de la luz.

En microscopía óptica convencional, la apertura numérica del objetivo, los aumentos que proporciona y la distancia de trabajo poseen una importancia primordial en la imagen final. La apertura numérica determina, no sólo la resolución lateral sino también, la profundidad de foco. Este parámetro disminuye ostensiblemente al utilizar objetivos con inmersión asociados a valores elevados de apertura numérica (1.3 ó 1.4). Por este motivo, para conseguir una profundidad de foco reducida, en nuestro estudio se utilizaron siempre objetivos con *aceite de inmersión*. En un *microscopio confocal*, al igual que ocurre en microscopía óptica de barrido, el aumento del objetivo es menos importante que en un microscopio óptico convencional. En ambos, el aumento final de la imagen en una pantalla puede ser modificado electrónicamente sin necesidad de cambiar de objetivo, simplemente reduciendo el área de la muestra examinada y sin perder resolución.

La distancia de trabajo adquiere una gran importancia en la microscopía confocal. La capacidad de observar centenares de micrómetros de profundidad en una muestra requiere una distancia de trabajo relativamente grande. No obstante, este parámetro no se puede controlar y depende de las características de fabricación del objetivo. Actualmente existen objetivos diseñados especialmente para microscopía confocal que trabajan con inmersión en agua y que presentan elevada apertura numérica y distancias de trabajo relativamente grandes. Son indispensables para trabajar con tejidos vivos o fijados y montados con agua. En oftalmología se utilizan objetivos que contactan con los tejidos oculares (Boyde 1995) y han sido utilizados, por ejemplo, por Masters y Paddock

(1990) para observar las córneas vivas de conejos.

El tamaño y la forma de la apertura confocal es un factor a considerar en la adquisición de imágenes con este tipo de microscopía. El "pinhole" circular es el modelo más común en los instrumentos comercializados, aunque también pueden ser cuadrados o tener forma de hendidura. Según los fabricantes, las dimensiones pueden ser fijas o ajustables. No obstante, es preferible que sean regulables para cambiar el tamaño del "pinhole" en función de la anchura óptima de cada objetivo y permitir modificar la intensidad de las señales luminosas recibidas. Sin embargo, no deben incrementarse en demasía las dimensiones del "pinhole" por peligro a destruir la confocalidad. Se debe ajustar para trabajar en condiciones de máxima confocalidad.

Las secciones ópticas están formadas por la luz procedente del plano focal del objetivo y son análogas a las secciones efectuadas mecánicamente cortando la muestra en el mismo nivel. En este sentido, la microscopía confocal proporciona imágenes similares a las obtenidas por resonancia magnética. Las colonias analizadas en nuestro estudio fueron seccionadas ópticamente en diferentes planos, de forma repetida, bajo condiciones controladas. Cabe indicar que fue variable el número de secciones ópticas efectuadas en relación al plano horizontal x-y de la colonias de *A. niger* y *C. albicans* seleccionadas. En el micelio que penetró más profundamente (figura 4.2.25.), se efectuó un mayor número de planos situados a intervalos también mayores en comparación con las colonias más pequeñas y de menor ramificación. El número máximo de secciones ópticas que el instrumento permitió visualizar fue de 49. Por esta razón, si deseamos ver la morfología de toda la colonia interna, la separación entre planos ha de ser mayor cuando el hongo ha invadido ostensiblemente la lente. No obstante, es más aconsejable realizar secciones finas para conseguir una resolución óptima y obtener la máxima información de cada una. La pérdida de información es un problema que debe intentar paliarse, pero que no siempre es posible evitar. Lógicamente, la asociación de todas las imágenes obtenidas en las diferentes secciones ópticas origina una reconstrucción tridimensional del objeto observado, en este caso, de la morfología colonial. Si los planos

efectuados no han estado debidamente seleccionados, tampoco será adecuada la información conseguida después de su reconstrucción. Por tanto, la imagen tridimensional definitiva puede ser parcialmente irreal. La fidelidad de la información final estará relacionada con las secciones ópticas realizadas y el intervalo existente entre ellas. Posiblemente, ésta sea la causa que determine las diferencias morfológicas existentes entre la imagen de una hifa invasora de una lente de contacto hidrofílica observada con microscopía óptica y la imagen de la misma hifa analizada con microscopía confocal. En el primer caso, y tal como se describió en el apartado 4.2.1., cuando una colonia de *A. niger* y *C. albicans* ha invadido una lente de contacto adopta una morfología típicamente helicoidal, tanto más pronunciada cuanto más joven es la hifa. Dicha forma geométrica no queda patente ni en la figura 4.2.25. ni en la figura 4.2.30. y se insinúa ligeramente en la figura 4.2.35. Parece lógico pensar que no existe suficiente resolución para poder ver las hélices con las secciones ópticas efectuadas. Posiblemente, para solventar el problema haría falta seleccionar sólo una parte de las colonias y realizar las diferentes secciones a intervalos menores. De esta forma, se observarían más puntos de reflexión de la luz por parte de las hifas en el plano de enfoque y su reconstrucción tridimensional determinaría la percepción de las hélices internas.

Por todo lo expuesto, cabe considerar que el microscopio confocal, bajo las condiciones con las que se ha utilizado, es un instrumento adecuado para poder visualizar las colonias que han conseguido invadir las lentes de contacto, así como cuantificar la profundidad de penetración, complementando de esta forma la información obtenida mediante microscopía óptica convencional.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

En este capítulo, según los objetivos marcados en el inicio del presente estudio, se exponen las conclusiones más relevantes derivadas de los resultados obtenidos.

1. La incidencia de la colonización fúngica de las lentes de contacto hidrofílicas procedentes de usuarios es baja y está asociada, en ocasiones, a depósitos químicos.
2. En el proceso de colonización fúngica de las lentes de contacto hidrofílicas procedentes de usuarios pueden influir factores relacionados con las características intrínsecas del hongo, la flora conjuntival y el estado de salud del usuario, el tipo de material de la lente, el sistema de mantenimiento utilizado y la periodicidad con que se llevan a cabo los procesos de limpieza y desinfección de las lentes y de los portales.
3. La identificación taxonómica de los hongos colonizadores de las lentes de contacto hidrofílicas procedentes de usuarios sólo es posible cuando, a partir de ellas o de su líquido de suspensión, se generan colonias fúngicas *in vitro*.
4. *Gliomastix*, *Humicola* y *Phoma* constituyen nuevas citas de hongos colonizadores de lentes de contacto hidrofílicas.
5. Resulta aconsejable no utilizar portales en los que el líquido de suspensión sea común para las lentes de los dos ojos, ya que es probable que el hongo colonizador de una de ellas invada la del ojo opuesto.
6. Factores relacionados con el hongo, las condiciones de cultivo y el tipo de material de las lentes de contacto nuevas intervienen en la adhesión y la invasión fúngica de las mismas.

-
7. De un total de once cepas fúngicas empleadas solamente la 93150 de la levadura *Candida albicans* y la 2700 del hongo filamentoso *Aspergillus niger* fueron capaces de colonizar las lentes de contacto hidrofílicas nuevas, con mayor o menor profusión según las condiciones de cultivo y el tipo de material. De aquí se desprende que probablemente sólo las cepas que puedan adherirse a los polímeros de las lentes y que secreten los enzimas hidrolíticos adecuados pueden llegar a colonizarlas.
 8. De las dos cepas indicadas, *A. niger* presenta una capacidad de colonización de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas significativamente mayor. Ello puede estar relacionado con su mayor capacidad para formar hifas, así como la mayor variedad de enzimas hidrolíticos que libera.
 9. *C. albicans* y *A. niger* necesitan un aporte de nutrientes diferente para colonizar un mismo material. Así, mientras el medio líquido de Sabouraud permite la invasión de las lentes por parte de ambos hongos, el suero fisiológico y la lágrima sintética sólo conducen a la formación de hifas internas del hongo filamentoso. Para la levadura es indispensable la presencia de una fuente de carbono y de nitrógeno que corre a cargo de la glucosa y de la peptona presentes en el medio de Sabouraud.
 10. Cuando las condiciones de cultivo, la composición química del material hidrofílico y el tipo de hongo son adecuados para colonizar una lente de contacto nueva, la adhesión y la invasión se efectúan en un periodo de tiempo inferior o igual a tres días. Un incremento del número de días de incubación conduce a un aumento de la frecuencia de lentes ya colonizadas por *A. niger*; dicho parámetro no varía significativamente cuando se incuban los polímeros con *C. albicans*.
 11. La evaporación del medio de cultivo facilita la adhesión de *C. albicans* y de *A. niger* a la superficie de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas y, por tanto, puede favorecer su invasión.

12. Las características hidrofílicas e iónicas de los materiales de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas, así como la estructura poco compacta de los mismos influyen en las frecuencias de adhesión e invasión, en el tamaño y la densidad de las hifas colonizadoras de *A. niger*. En el caso de *C. albicans* la composición química y la estructura de los polímeros repercute solamente en el tamaño de las colonias internas.
13. El vifilcon A es el material hidrofílico más susceptible a la colonización por *C. albicans* y *A. niger*. Ello puede estar relacionado con la presencia de ácido metacrílico, que confiere ionicidad al polímero, y de N-vinilpirrolidona, que incrementa su grado de hidrofilia. El tefilcon es el material hidrofílico menos susceptible a la colonización por los hongos indicados al no poseer ninguno de los monómeros citados.
14. Las hifas de las colonias invasoras de *C. albicans* y de *A. niger* adoptan siempre una disposición helicoidal en la matriz de las lentes de contacto hidrofílicas y, por tanto, no es posible reconocer la especie invasora únicamente mediante el análisis microscópico de las lentes colonizadas.
15. El cultivo de las lentes rígidas permeables a los gases en cámaras de incubación con medio líquido de Sabouraud permite el deterioro del polímero por parte de *A. niger*.
16. El microscopio electrónico de barrido es un instrumento adecuado tanto para observar la distribución de las hifas que se adhieren o se introducen en las lentes de contacto hidrofílicas como para determinar el deterioro superficial de los materiales. No obstante, los tratamientos a los que deben ser sometidas las muestras, previamente a su observación, pueden ocasionar alteraciones en los polímeros y roturas del micelio superficial.
17. El análisis mediante microscopía electrónica de barrido ha permitido constatar la presencia de estructuras helicoidales en las lentes de contacto hidrofílicas colonizadas por *Aureobasidium pullulans* y por *A. niger* 2700.

Cabe suponer que se trate, bien de bacterias helicoidales contaminantes, o bien de estructuras fúngicas relacionadas con el anclaje de dichos microorganismos a los polímeros.

18. El microscopio confocal por reflexión de luz es un instrumento no invasivo adecuado para visualizar las colonias internas de las lentes de contacto y cuantificar la profundidad de penetración de las hifas y, por tanto, constituye un buen complemento a la información suministrada por la microscopía óptica convencional.