

Estudio in vitro de la capacidad de proliferación de *Candida albicans* en diferentes materiales de lentes de contacto blandos¹

Liliana Zambrano* / Claudia M. Parra G.** / Miriam Teresa Mayorga***

Resumen

Debido a la creciente importancia que tiene el uso de lentes de contacto blandos para corregir ametropías a nivel mundial y en la población colombiana, sumado a la capacidad de la levadura *Candida albicans* de producir enfermedades oculares por el uso de los mismos, llegando a ser uno de los principales agentes infecciosos; en este estudio se evaluó la capacidad de *Candida albicans* de proliferar en 5 diferentes materiales de lentes de contacto blandos hidrofílicos, tres de ellos de hidrogel (Alphafilcon A, Omafilcon A, Polymacon) y dos de hidrogel silicona (Balafilcon A y Lotrafilcon A). Se encontró que la levadura puede proliferar en el material Alphafilcon A en mayor proporción, y en menor grado en Omafilcon A y Lotrafilcon A.

Palabras clave: lentes de contacto blandos, *Candida albicans*, proliferación.

In vitro Study about the proliferation of *Candida albicans* in different material soft contact lenses

Abstract

The use of soft contact lenses has an increasing importance to correct ametropias at world-wide level and in the Colombian population, besides, the yeast *Candida albicans* has the ability to produce ocular diseases by using the lenses, which has become in one of the main infectious agents. The proliferation capability of *Candida albicans* was evaluated in 5 different hydrophilic soft contact lenses, three of them of hidrogel (Alphafilcon A, Omafilcon A, Polymacon) and two of hidrogel silicone (Lotrafilcon A and Balafilcon A). Yeast proliferates in the Alphafilcon A material in greater proportion, and in smaller degree in Omafilcon A and Lotrafilcon A.

Key Words: soft contact lenses, *Candida albicans*, proliferation.

¹ Investigación financiada por la Universidad de La Salle.

* Microbióloga Industrial. Pontificia Universidad Javeriana.

** Bacterióloga, MSc Microbiología. Docente investigador Pontificia Universidad Javeriana, Universidad de La Salle.
Correo electrónico: claudia.parra@javeriana.edu.co

*** Optómetra Docente Investigador Universidad de La Salle.

Correo electrónico: mtmayorga@hotmail.com

Fecha de recepción: septiembre 8 de 2006.

Fecha de aprobación: septiembre 29 de 2006.

INTRODUCCIÓN

El uso de lentes de contacto es frecuente dentro de la población colombiana y se ha incrementado en los últimos años para la corrección de ametropías. Existen varios tipos de lentes, los rígidos permeables a los gases, los blandos hidrofílicos y actualmente los blandos de hidrogel silicona, siendo estos últimos los utilizados con mayor frecuencia debido a que por su mayor permeabilidad al oxígeno brindan más confort.

Los lentes blandos a pesar de poseer ventajas frente a los demás, requieren un mayor cuidado y procesos de desinfección completos para asegurar su adecuado funcionamiento y durabilidad, ya que son fácilmente colonizados por microorganismos. Sin embargo, en muchas ocasiones las personas no tienen las medidas adecuadas de cuidado como son la limpieza y desinfección, lo cual involucra la aparición de residuos como partículas de polvo y en otros casos de microorganismos que pueden producir infecciones oculares. La presencia de polvo y la gran cantidad de microorganismos puede además comprometer la eficacia del producto desinfectante (Rosenthal *et al.*, 2004).

Algunos de los principales agentes microbianos causales de enfermedades oculares por el uso de lentes de contacto son bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus sp.*, *Serratia marcescens*, levaduras como *Candida albicans*, hongos como *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* y, el protozoo *Acanthamoeba* (Borazjani, 2005; Kilvington, 2004; Marqués, 2001).

En cuanto al crecimiento de los hongos en lentes de contacto usados, aunque estudios iniciales no revelan daños al segmento externo del ojo, investigaciones subsecuentes han demostrado que la presencia de hongos en tales lentes puede producir infecciones oculares (Marqués, 2001).

Candida albicans es una levadura que forma parte de la microbiota de las mucosas, incluyendo el Tracto Gastrointestinal (TGI) y Tracto Genitourinario (TGU), cuando se involucra en alguna patogenia se comporta como patógeno oportunista, a nivel ocular puede presentar diferentes patologías todas de muy mal pronóstico como desprendimiento de retina, panoftalmítis entre otras. Las infecciones oculares por *Candida albicans* aumentan en usuarios de lentes de contacto, esta población incrementa el riesgo de tales infecciones (Rotman *et al.*, 2003).

Los materiales de los lentes de contacto difieren en el polímero con que son fabricados, de acuerdo a esto, con que un radical en el copolímero sea diferente, puede cambiar las propiedades del mismo. Por esto, pueden llegar a variar en su contenido acuoso, siendo alto o bajo, y también en las características de su ionicidad.

Por lo anterior, con este estudio se evaluó la capacidad proliferativa de *Candida albicans* en diferentes materiales de lentes de contacto como primer factor predisponente, para que los lentes se comporten como nichos de este microorganismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales de lentes de contacto. Los materiales de lentes de contacto utilizados en el estudio fueron de hidrogel e hidrogel silicona. Se escogieron tres materiales de hidrogel: Alphafilcon A (Soflens 66-Bausch and Lomb), Omafilcon A (Proclear Compatibles-Coopervision) y Polymacon (Hydrosoft 38-Ital Lent) y dos de hidrogel Silicona: Balafilcon A (Purevision-Bausch and Lomb) y Lotrafilcon A (Night and Day-CIBA Vision). Los materiales de lentes de contacto presentaron el mismo espesor, de -3,00.

Cepa. Se utilizó una cepa de *Candida albicans* proveniente del cepario de Micología de la Pontificia Universidad Javeriana, corresponde al código: CMHPUJ 009, esta es aislada de una endoftalmitis de un paciente con candidemia.

Estandarización del inóculo. El inóculo se preparó en solución salina al 0,85% con la levadura de 24 horas de crecimiento. El inóculo se estableció por el método de densidad óptica. Para esto se utilizó espectrofotómetro, a una longitud de onda de 540 nm, y se leyó un promedio de absorbancia de 0,150. A partir de este inóculo se realizaron diluciones en serie 1:10 hasta 10^{-10} . Se escogieron las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , ya que estas presentaban recuentos de la levadura de aproximadamente 7×10^2 UFC/ml, 1×10^2 UFC/ml y 4×10^1 UFC/ml, respectivamente.

El inóculo establecido se preparó para el desarrollo de cada uno de los objetivos. Las absorbancias oscilaron entre ± 2 alrededor de 0,150; siempre se montó el control del inóculo para controlar la cantidad de UFC, la viabilidad y la pureza.

Evaluación de la capacidad proliferativa de *Candida albicans* sobre diferentes materiales de lentes de contacto. Se tomaron 5 lentes de contacto, 1 de cada uno de los materiales a evaluar (Balafilcon A, Lotrafilcon A, Alphafilcon A, Omafilcon A y Polimacon), cada uno de los cuales fue cortado en 4 fracciones (20 fracciones en total). Se utilizó por cada concentración (7×10^2 UFC/ml, 1×10^2 UFC/ml y 4×10^1 UFC/ml) 1 fracción, que se colocó en 1 tubo eppendorf. A cada tubo se le agregó 1 ml de la suspensión de la levadura de cada una de las concentraciones a evaluar. La cuarta fracción también se colocó en un tubo eppendorf, y se adicionó 1 ml de solución salina (control de esterilidad). Se realizaron controles de cada concentración del inóculo, y solución salina.

Como la capacidad proliferativa se evaluó en tres tiempos 0,24 y 48 h, por cada tiempo se tuvo un control de inóculo. La proliferación se evaluó por el método de recuento en placa en donde se colocó un volumen del inóculo después del tiempo de infección de los lentes de contacto (0, 24, 48 h) y además se colocaron las fracciones de lentes sobre agar sabouraud. Las cajas petri se incubaron a 37°C y se realizaron recuentos a las 24 y 48 horas. Todo fue sembrado por duplicado.

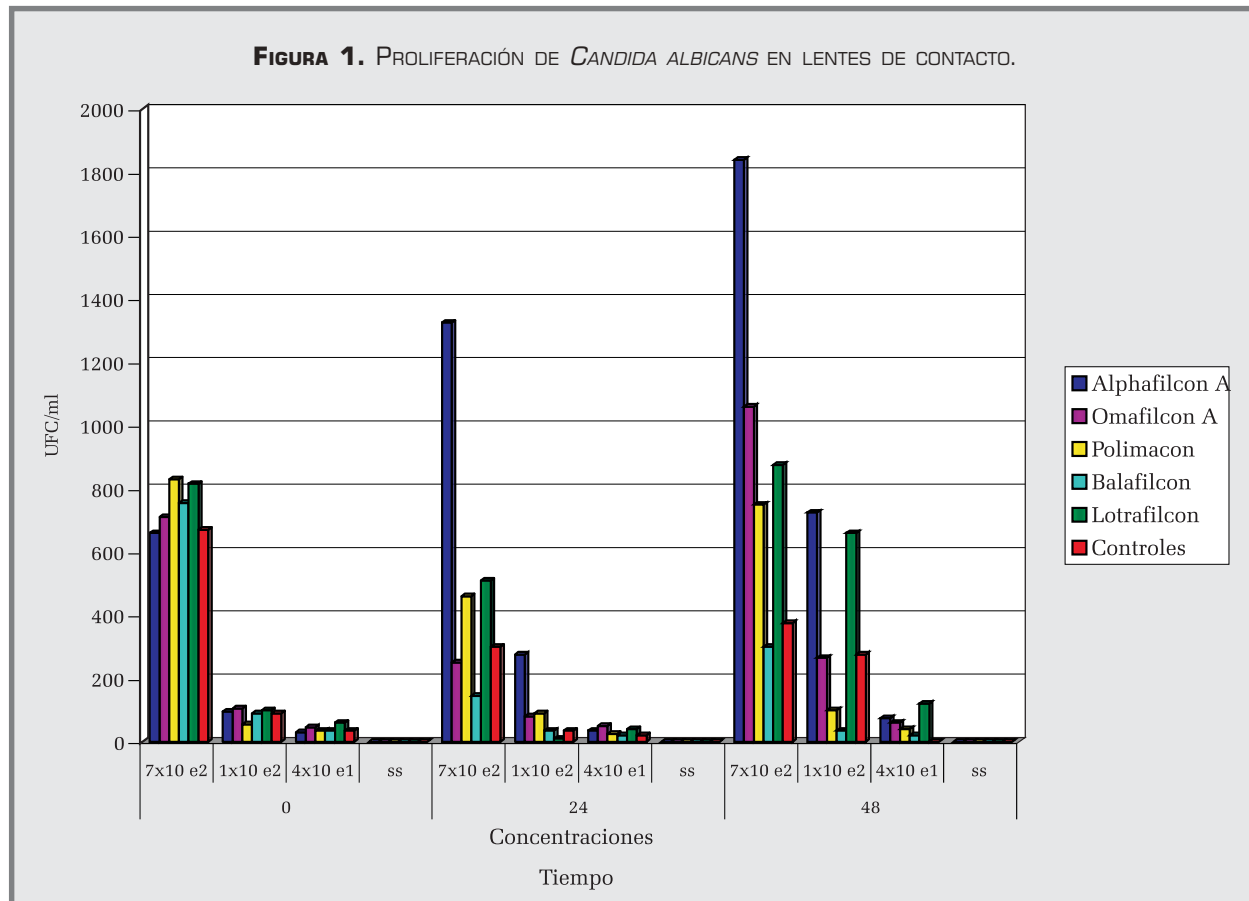
El tiempo 0 (cero) fue sembrado inmediatamente después de colocar cada una de las concentraciones de levadura, el tiempo de 24 horas, después de estar en contacto la fracción de lente con *Candida albicans* y los respectivos controles durante este periodo de tiempo. Del mismo modo se realizó para el tiempo de contacto de 48 horas, transcurridos estos tiempos de infección de los lentes fue realizada la siembra en placa. Esto se realizó de la misma manera con cada material del estudio.

RESULTADOS

Evaluación de la capacidad proliferativa de *Candida albicans* sobre diferentes materiales de lentes de contacto blandos. En el material Alphafilcon A en el tiempo cero hubo crecimiento de *Candida albicans* (660, 95, 30 UFC/ml para cada concentración), muy similar a los controles y a los otros materiales, a las 24 horas se observa que hubo un crecimiento de *Candida albicans* significativamente mayor (1325, 275, 35 UFC/ml, respectivamente) en comparación con los otros materiales y los controles. A las 48 horas se observa un incremento de la levadura en este material en donde se puede observar que su población aumenta en gran medida al compararlo con los otros materiales y sus controles (1840, 725, 75 UFC/ml). Esto se ve reflejado claramente en las dos primeras con-

centraciones de 7×10^2 y 1×10^2 y menos en la concentración de 4×10^1 , en esta última se ve aumento también pero no de una manera tan drástica

como en las concentraciones más altas (Véase Figura 1).



Para el material Omafalcon se observa que el crecimiento de la levadura al tiempo cero se encuentra muy cercano a los controles y también a los demás materiales (710, 105, 45 UFC/ml). A las 24 horas se observó una disminución del crecimiento de la levadura (250, 80, 50 UFC/ml) con respecto al tiempo cero, pero fue mayor que los controles para las dos últimas concentraciones. A las 48 horas tuvo un aumento considerable (1060, 265, 60 UFC/ml) incluso un poco mayor que los controles lo cual se ve reflejado en las tres concentraciones, además se ve el aumento también en cuanto a la población inicial del tiempo cero.

El material Polimacon y balafilcon presentan bajos recuentos. En estos no se evidencia proliferación.

El crecimiento en el material lotrafalcon A al tiempo cero es semejante a los otros materiales y los controles de la levadura. A las 24 horas la levadura disminuye en comparación con su crecimiento inicial para las tres concentraciones. A las 48 horas aumenta siendo mayor que en la concentración inicial y de las 24 horas, en este material se presenta un aumento importante.

Las fracciones de lentes que fueron colocadas sobre *agar sabouraud* después de permanecer 48 horas en contacto con la levadura demostraron crecimiento. Se clasificó el crecimiento de *Cándida albicans* en el lente de contacto como: 0: nulo; 1: bajo; 2: medio; 3: alto; 4: muy alto. Se observó que el material Alphafilcon A y Omafilcon A, presentaron alto crecimiento (escala 4=muy alto) en la mayor concentración, y medio y bajo para las dos concentraciones menores.

Al comparar los tres materiales de hidrogel Alphafilcon A, Omafilcon A y Polimacon se puede observar que hay mayor crecimiento de la levadura en aquellos materiales que poseen mayor contenido de agua, 66% para Alphafilcon, 62% para Omafilcon y 38% para polimacon.

El crecimiento de la levadura en el material Balafilcon A fue alto para la primera concentración. En la concentración del medio y en la menor concentración, presento recuento bajo. El material Lotrafilcon A presento un crecimiento alto para la primera concentración, medio para la segunda concentración y bajo para la menor concentración. La fracción de lente que estaba en contacto con la solución salina no presento crecimiento en ninguno de los materiales lo que demuestra que la solución salina utilizada se encontraba estéril.

DISCUSIÓN

Capacidad proliferativa de *Candida albicans* sobre diferentes materiales de lentes de contacto blandos. Los tres materiales que presentaron un indicio de proliferación fueron el Alphafilcon, el Omafilcon en segundo lugar y el Lotrafilcon en tercer lugar. El Alphafilcon y el Omafilcon son materiales de hidrogel, el Alphafilcon por su alto contenido acuoso de 66% indica que la levadura puede desarrollarse en este, el Omafilcon posee un 62% de agua,

ambos materiales son no iónicos. El Lotrafilcon es el material de menor contenido de agua de los estudiados con un 24% de hidratación, y contiene macrómeros de siloxano, sin embargo, mostró crecimiento, además de ser un material no iónico.

Los materiales iónicos, tienen mayor afinidad para ser influenciados por el medio ambiente, además presentan atracción por partículas extrañas y representan más depósitos de proteínas, incluso de la lágrima, cualquier partícula como lisozima con carga positiva, pueden ser atraídos a sitios con carga negativa en el material iónico (Fonn, 2001). De acuerdo con esto, era de esperarse en este estudio que el único material iónico que es el Balafilcon A presentara mas atracción de la levadura. Sin embargo, de acuerdo a los resultados, este material fue el que mas bajo crecimiento presentó, esto puede deberse a que la carga negativa de la pared celular de las levaduras hace que no se genere la atracción. Por el contrario, los materiales no iónicos que no presentan carga neta superficial (Fonn, 2001), sumados a un alto contenido acuoso logran la proliferación del microorganismo. Es de esperarse que estos materiales no presenten depósitos y además no unan partículas cargadas, sin embargo, en este estudio, la levadura pudo unirse a estos a estos materiales y proliferar.

Según Marqués (2004) la capacidad de los hongos para invadir sustratos depende, entre otros factores, del tipo y la cantidad de enzimas que ellos liberan y la posibilidad de desarrollar hifas. Solo unas pocas especies de levaduras pueden producir hifas y liberar enzimas hidrolíticas para degradar polímeros y solo en condiciones de cultivo muy específicas. La pared del hongo juega un rol importante en los procesos de adhesión a la superficie, puesto que este es el primer punto de interacción entre las células fúngicas y el sustrato a ser colonizado.

Candida albicans pudo no haber proliferado en los materiales polimacon y balafilcon, debido a factores genéticos y/o condiciones del cultivo, también es importante resaltar la importancia de la estructura química de la pared del hongo y la síntesis de enzimas hidrolíticas responsables de la colonización de los lentes. Aunque es este estudio se dio la proliferación de lentes de contacto utilizando solución salina, es probable que la invasión de la levadura al lente es difícil por el estrés nutricional causado por la disminución de nutrientes, durante el periodo de incubación y la acumulación de componentes metabólicos celulares que modifican las buenas condiciones originales del cultivo.

Los resultados sobre colonización de levaduras reportados en la literatura indican que, en general los hongos, tienen más habilidad para adherirse e invadir lentes hidrofílicos con un alto contenido acuoso (Batellier, 1992; Wilhelmus, 1988). El alto contenido de agua de los lentes, ayuda a la colonización. Este resultado es acorde con el obtenido en este estudio para Alphafilcon y Omafilcon, sin embargo no lo es para lotrafilcon.

Esto demuestra que existen otros mecanismos involucrados en la afinidad de la levadura *Candida albicans* CMHPUJ009, para adherirse y proliferar en los diferentes materiales de lentes de contacto, además de un alto contenido acuoso, el Lotrafilcon que posee Dimetilacrilamida (DMA), Trimetilsiloxalina (TRIS) y macrómero de siloxano con un 24% de hidratación, también presento adhesión. Este material al igual que los anteriores es no iónico, indicando en este caso, que la adhesión se da más en estos que en los iónicos, si se toma el ejemplo del Balafilcon A, que fue el que menor crecimiento presento, y el único iónico. Esto implica que no solo factores como el alto porcentaje de hidratación, la ionicidad del material influyen en la

proliferación de *Candida albicans* CNHPUJ 0010, estos pueden ser la estructura química del polímero.

Puesto que el material Alphafilcon presenta monómeros de HEMA y N – Vinil Pirrolidona (NVP), puede ser asumido que la presencia de este ultimo monómero ayuda a la colonización por *Candida albicans*. El nitrógeno presente en el grupo pirrolidona está puesto lateralmente a la cadena hidrocarbonada. De esta manera, el nitrógeno en este monómero es utilizado por los microorganismos, como este es más vulnerable al ataque enzimático que el nitrógeno en la Dimetilacrilamida (DMA), presente en los grupos amida, siendo este uno de los monómeros principales del Lotrafilcon.

El material Omafilcon posee fosforilcolina para aumentar la biocompatibilidad, estas moléculas de fosforilcolina en los lentes atraen agua, la cual se adhiere al lente. Las moléculas de agua actúan como escudo alrededor de los lentes, ayudando a mantener los lentes hidratados. Esta molécula parece no ser en los lentes un factor desencadenante para la proliferación de las levaduras.

El tipo de polímero tiene influencia en la adhesión y proliferación por *Candida albicans* CMHPUJ 009. Sin embargo la levadura mostró crecimiento en todas las fracciones de los lentes de los 5 materiales, en las concentraciones evaluadas, solo que en unas en mayor cantidad que en otras, esto muestra que de acuerdo a estas condiciones de cultivo, de temperatura, de tiempo y con esta cepa, la levadura presenta adhesión a los materiales en mayor o en menor grado, pero no proliferación en todos. Este estudio corrobora el hecho que incrementado el contenido de agua del polímero intensifica el crecimiento fúngico en lentes de contacto hidrofílicos, y esto demuestra que in vitro la colonización fúngica de lentes de contacto depende de 1) la cepa del hongo,

2) las condiciones del cultivo, 3) el periodo de incubación y 4) la estructura química del polímero.

AGRADECIMIENTOS

Departamento de Investigaciones de la Universidad de La Salle, por la financiación económica del proyecto, al Departamento de Microbiología de la PUJ, por facilitarnos la instalaciones para su ejecución, y a las estudiantes de optometría Pilar Espitia y Luisa Holguín, por su colaboración en la revisión de la literatura de los polímeros de lentes de contacto.

BIBLIOGRAFÍA

- Batellier, L.; Chaumeil, C. y Liotet, S.
Champignons et lentilles de contact. J. Mycol. Med. 2, 1992..
- Fonn, D.; Reyes, M.; Terry, R. y Williams, L.
Módulo 2: Introducción a lentes de contacto: Fabricación y materiales para lentes de contacto. IACLE. Asociación Internacional de Educadores en Lentes de Contacto, 2001.
- García, S. et al. «*Candida albicans* Biofilms: a Developmental state associated with specific and stable gene expression patterns». *Eukaryotic cell* 3 2. (2004): 536-545.
- ISO 14729. *Ophthalmic optics. Contact lens care products. Microbiological requirements and test methods for products and regimens for hygienic management of contact lenses*, 2001.
- Marqués, M. «Fungal growth in hydrophilic contact lenses». *ICLC* 27 (2001): 41-46.
- - -. «Colonization of hydrophilic contact lenses by yeast». *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 31 6. (2004): 255-260.
- Rosenthal, R.; Henry, C. y Schlech, B.
«Contribution of regimen steps to disinfection of hydrophilic contact lenses». *Contact lens and Anterior eye* 27. (2004): 149-156.
- Wilhelmus, K. et al. «Fungal Keratitis in contact lens wearers». *Am J. Ophthalmol* 106. (1988): 708-714.