



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 4.1.21.- *Colonia invasora de la matriz de la lente 313. (Microscopía óptica, 125 x).*

Figura 4.1.22.- *Colonia dematiácea muy densa localizada en la zona óptica de la lente 31. (Microscopía óptica, campo oscuro, 500 x).*

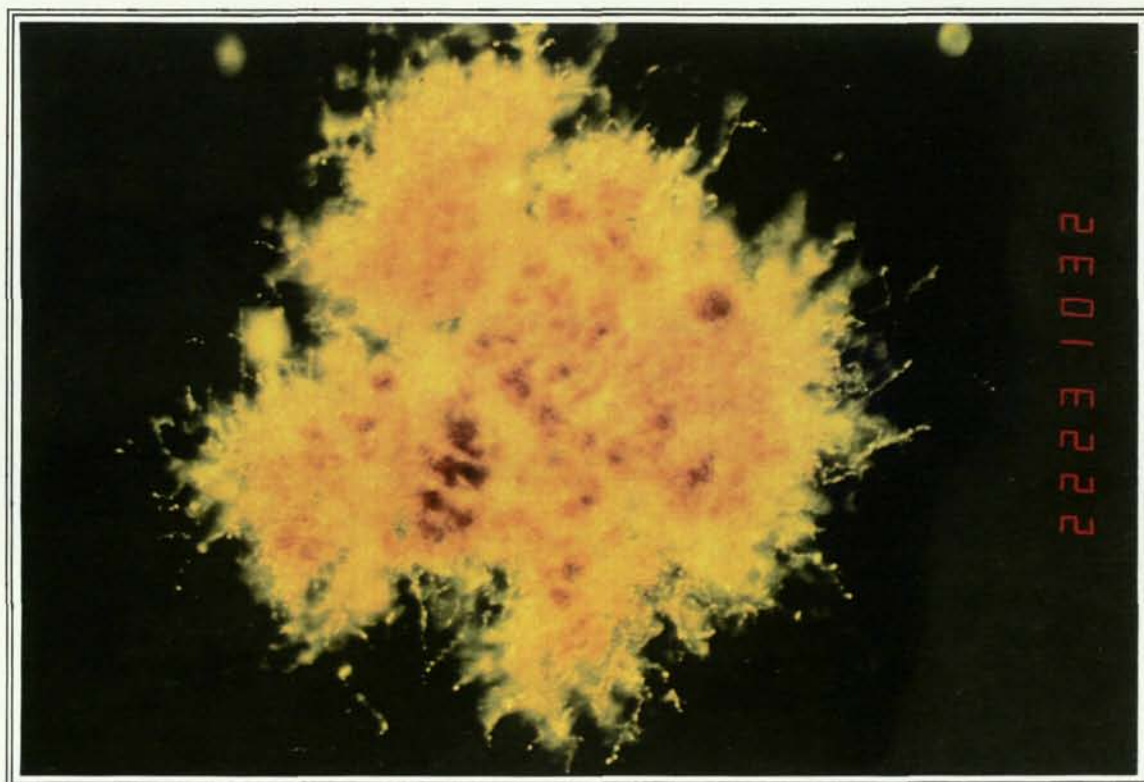
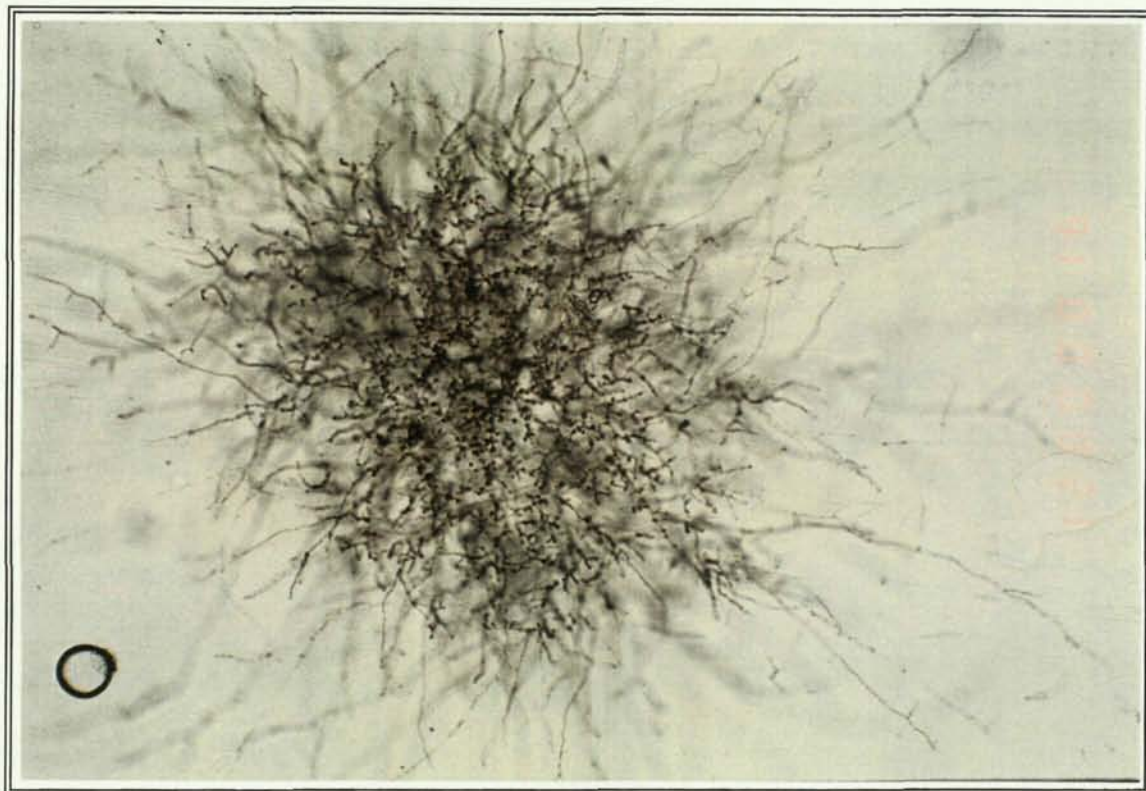


Figura 4.1.23.- Sección de la lente 31 con micrótopo de congelación y observación de las hifas dematiáceas internas. (Microscopía óptica, 500 x).

Figura 4.1.24.- Mayor magnificación de la figura anterior. (Microscopía óptica, 1250 x).

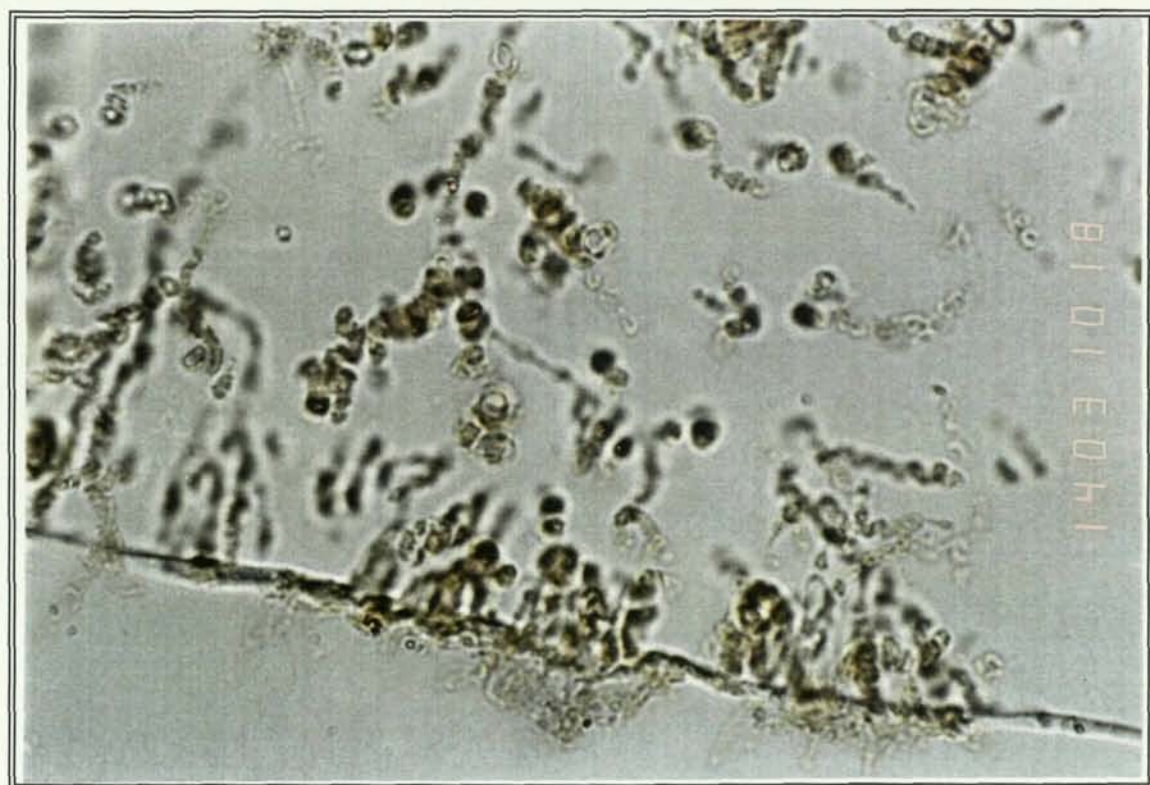
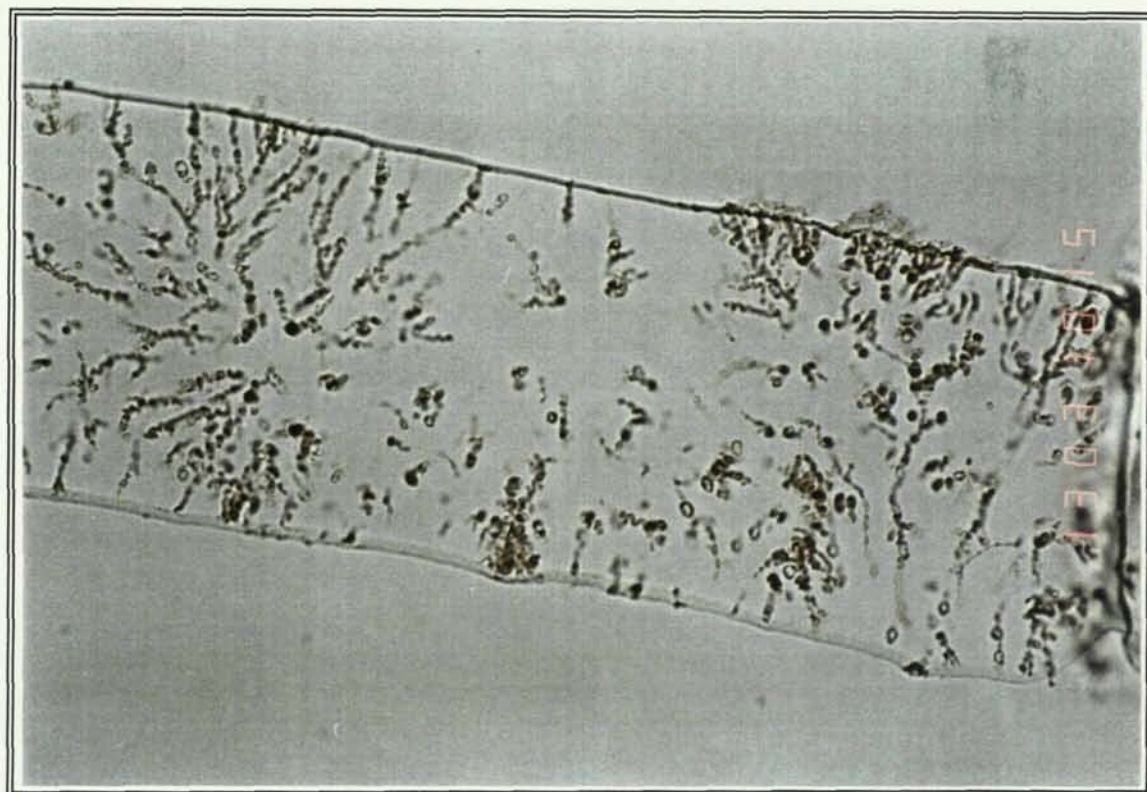


Figura 4.1.25.- Pequeña colonia dematiácea localizada en la periferia de la lente de contacto 314. (Microscopía óptica, campo oscuro, 125 x).

Figura 4.1.26.- Superficie de la lente de contacto hidrofílica 306 procedente de un usuario, colonizada por *Acremonium sp.* (Microscopía electrónica de barrido).

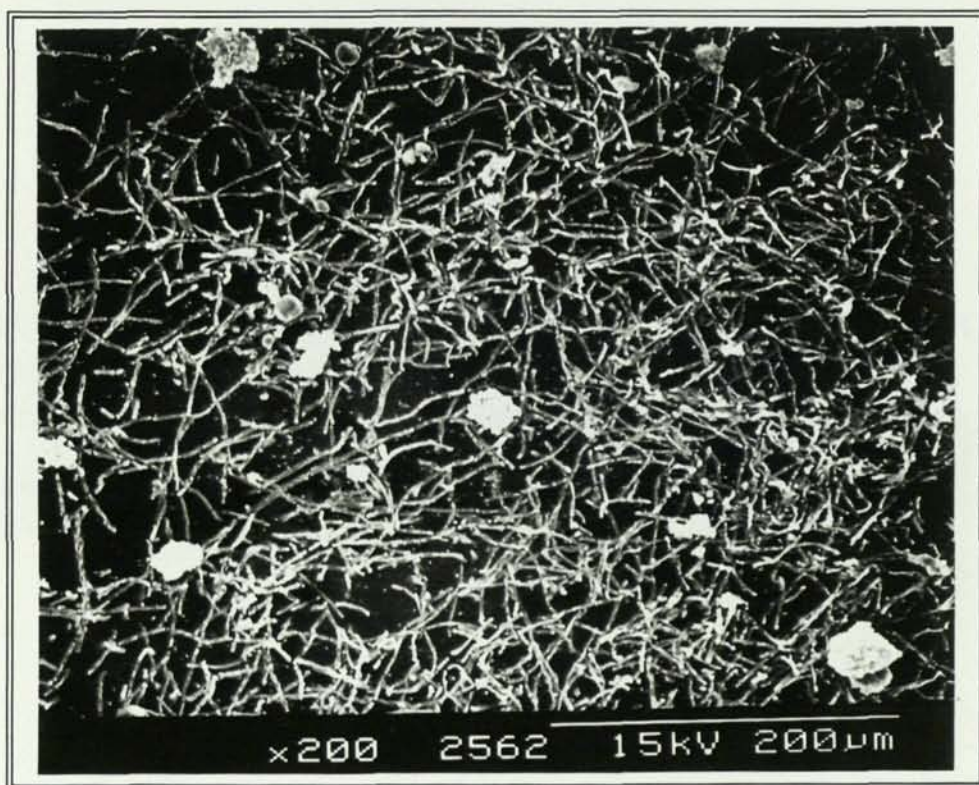
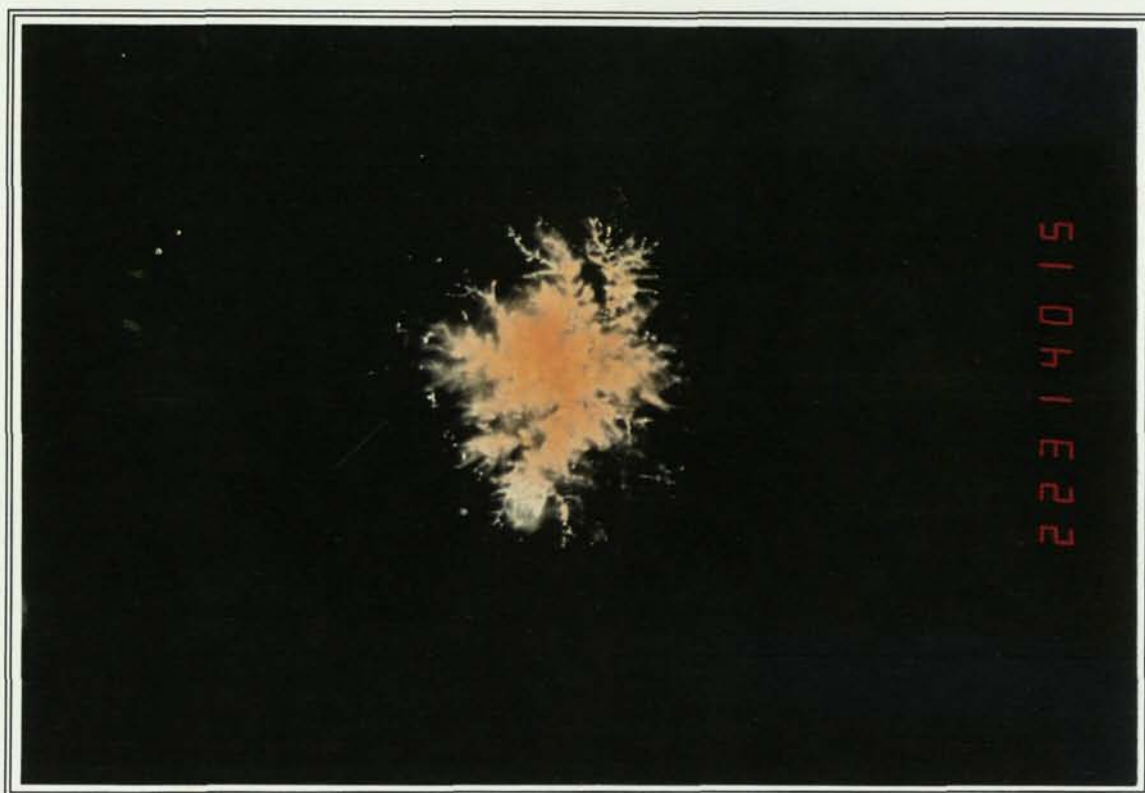


Figura 4.1.27.- *Hifas de Acremonium sp adheridas a la lente de contacto 306. (Microscopía electrónica de barrido).*

Figura 4.1.28.- *Micelio de Acremonium sp sobre la lente de contacto 306 y penetración de un hifa en el polímero hidrofílico (flecha). Numerosas bacterias permanecen adheridas a su superficie. (Microscopía electrónica de barrido).*

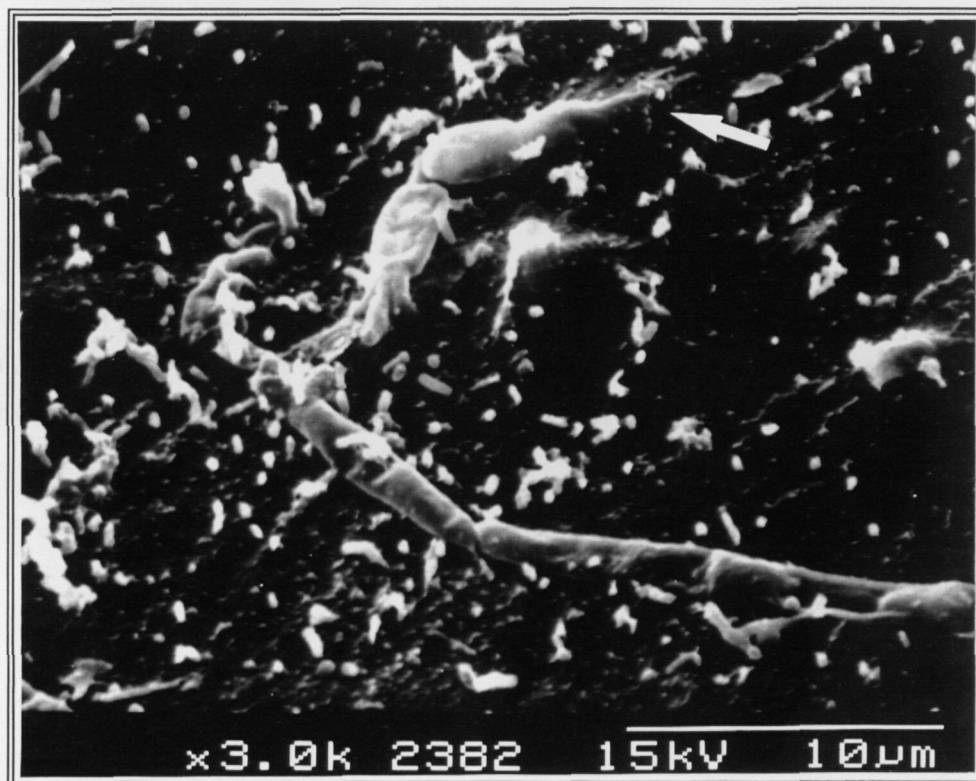
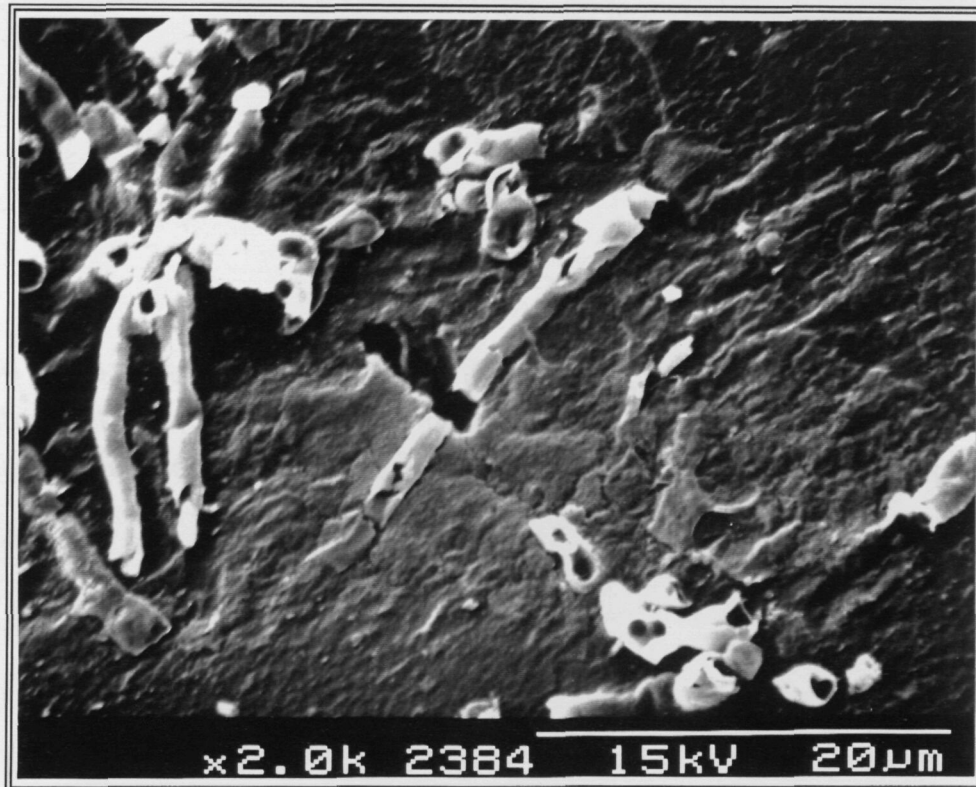


Figura 4.1.29.- Grosor y parte de la superficie de una de las caras de la lente de contacto 306 colonizada por *Acremonium sp*, donde queda patente la irregularidad de la superficie provocada por el micelio invasor. (Microscopía electrónica de barrido).

Figura 4.1.30.- Alta magnificación de la figura 4.1.29. con las hifas invasoras de *Acremonium sp* fragmentadas a nivel de la superficie lenticular (flecha) y donde se insinúa parte del recorrido fúngico interno. (Microscopía electrónica de barrido).

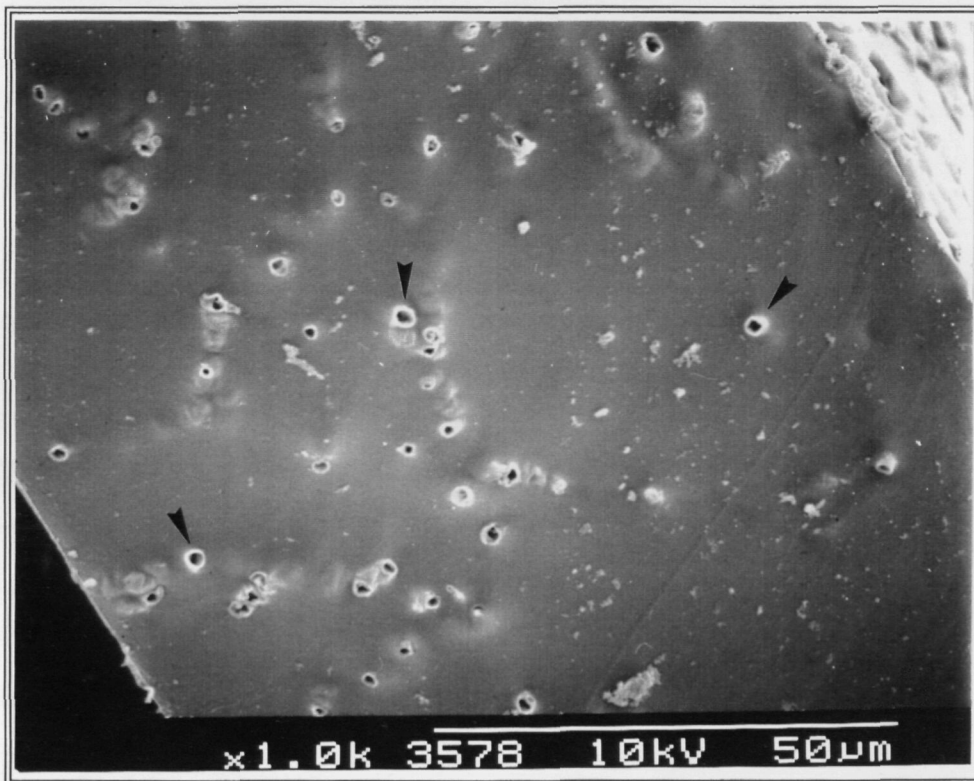
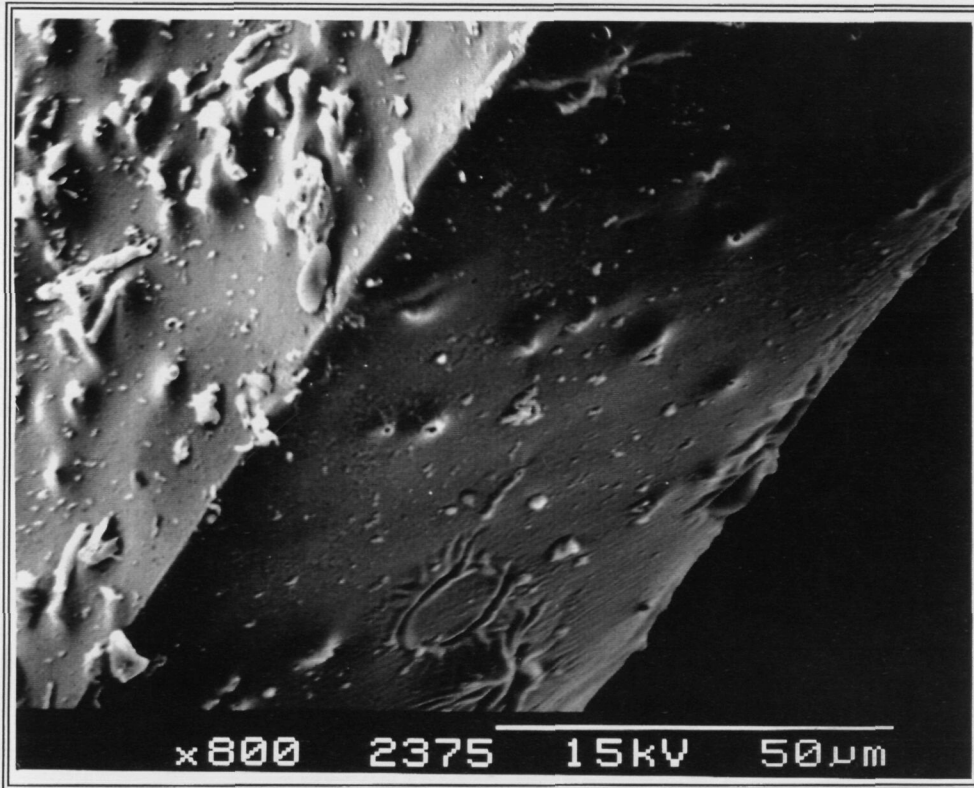


Figura 4.1.31.- Mayor magnificación de la figura 4.1.30. (Microscopía electrónica de barrido).

Figura 4.1.32.- Micelio de *Aureobasidium pullulans* hongo colonizador de la lente de contacto hidrofílica 303 procedente de un usuario. Numerosas bacterias y estructuras helicoidales aparecen en la superficie lenticular, aunque se precisan mayores aumentos para poder ser observadas con detalle. (Microscopía electrónica de barrido).

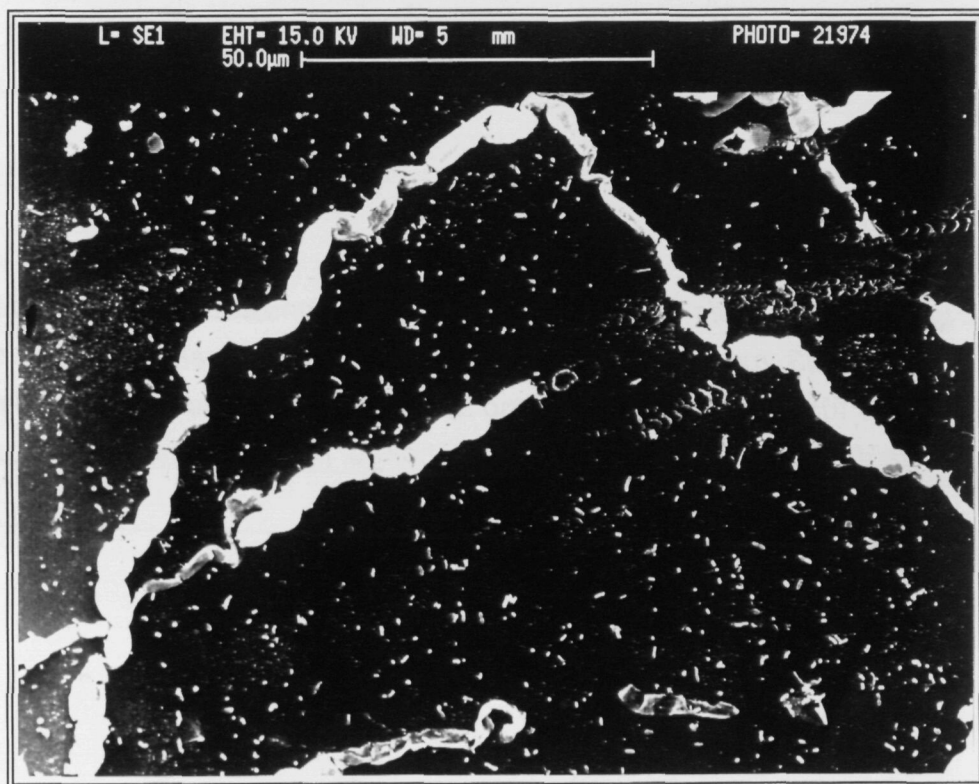
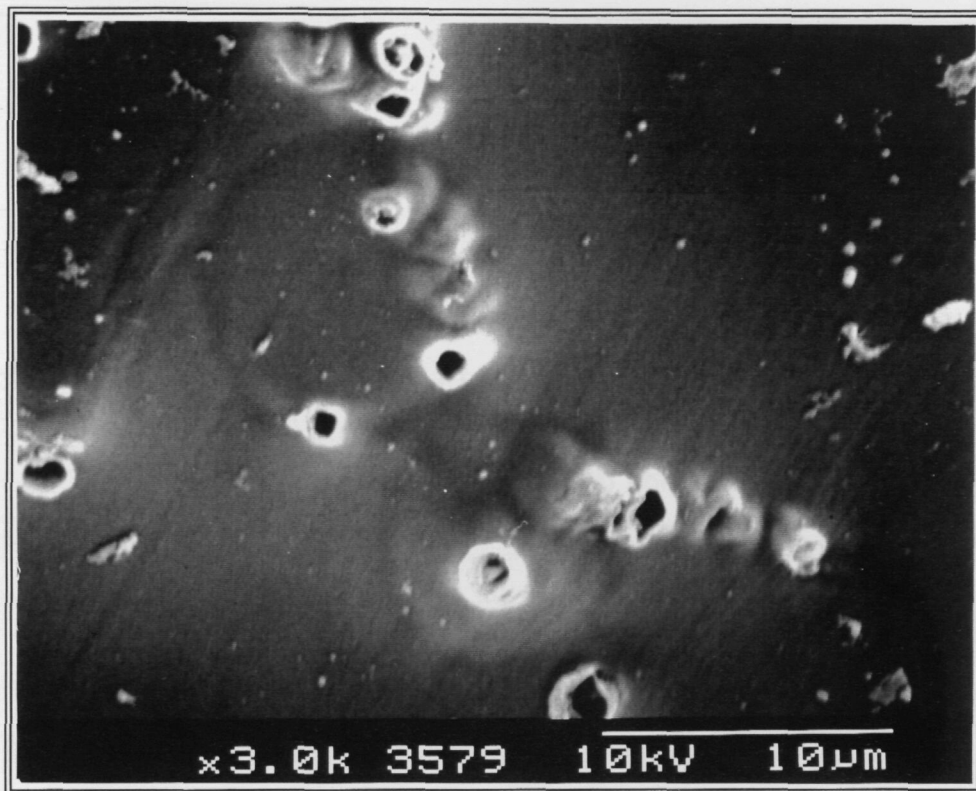


Figura 4.1.33.- Estructura helicoidal con origen aparente en el micelio fúngico de *A. pullulans*, hongo colonizador de la lente de contacto 303. (Microscopía electrónica de barrido).

Figura 4.1.34.- Hifa de *A. pullulans*, hongo colonizador de la lente de contacto 303, mostrando una hélice cilíndrica con origen aparente en la pared fúngica (flecha) y extremo apical de otra estructura helicoidal (punta de flecha) sin asociación con el hongo. (Microscopía electrónica de barrido).

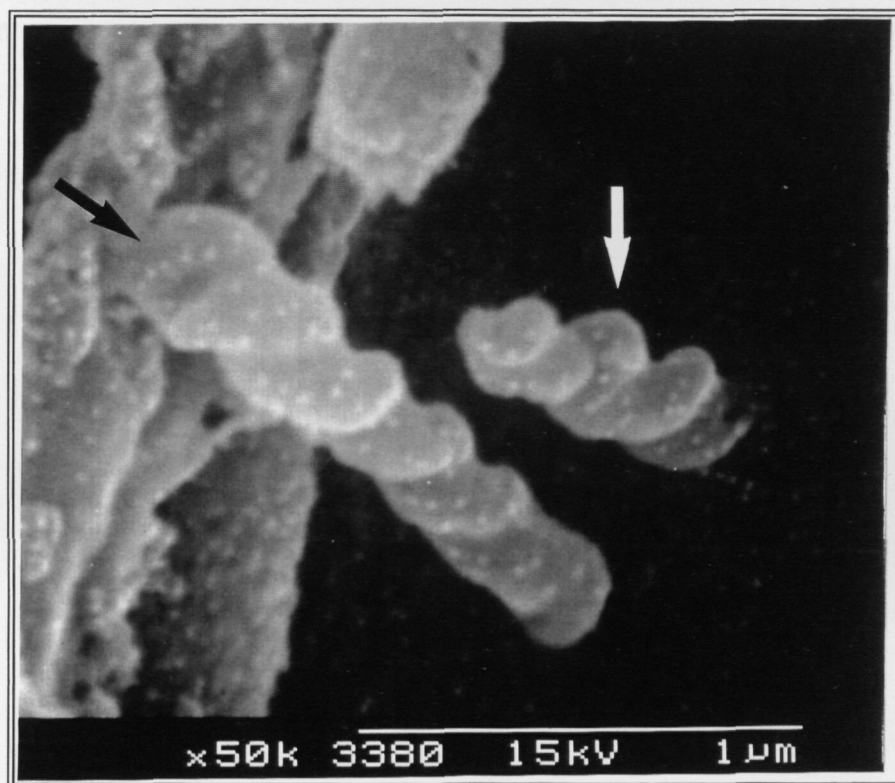
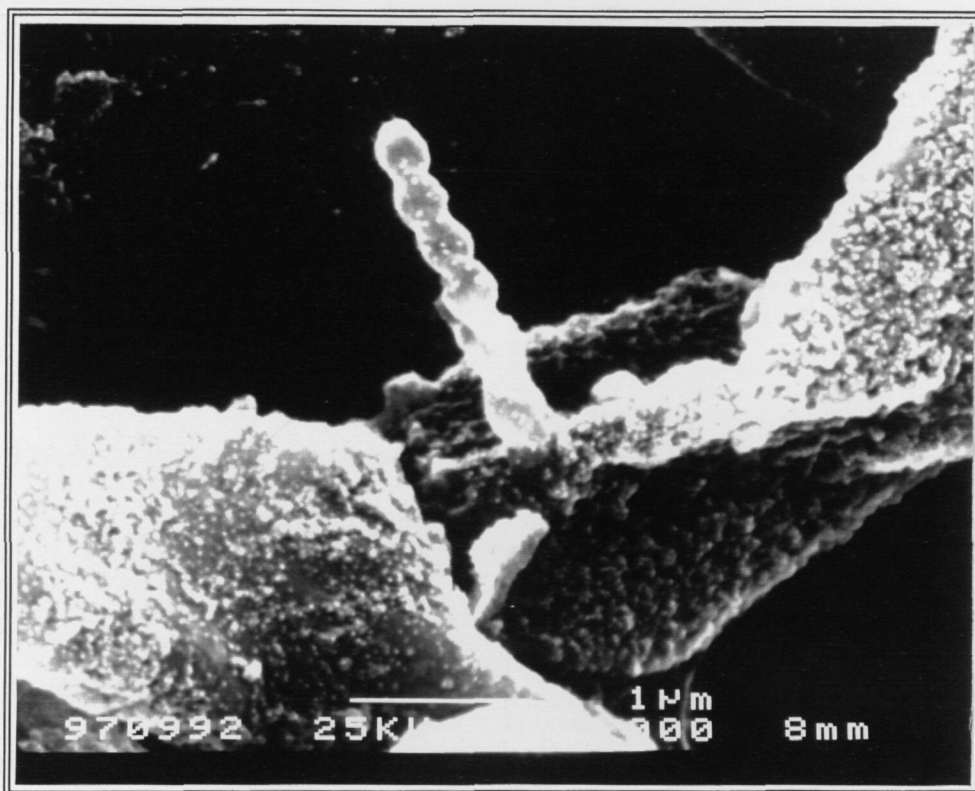


Figura 4.1.35.- Par estereoscópico que muestra diversas hélices cilíndricas con origen aparente en la pared del hongo A. pullulans, colonizador de la lente de contacto 303. La observación de ambas fotografías con un estereoprisma permite ver las estructuras en tres dimensiones. (Microscopía electrónica de barrido).

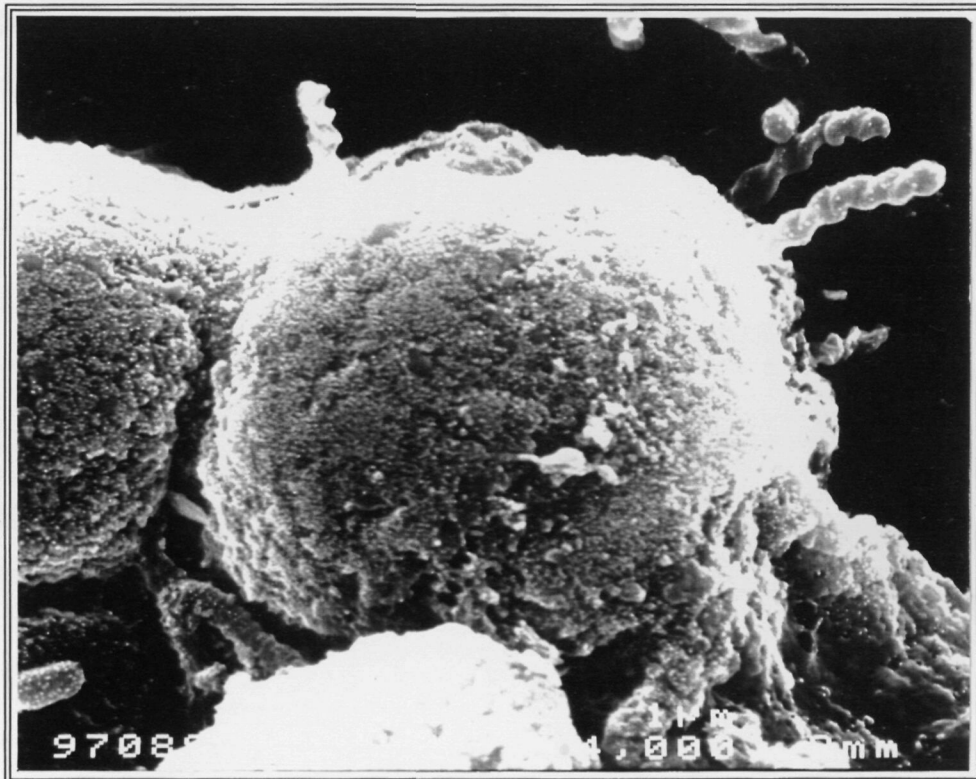
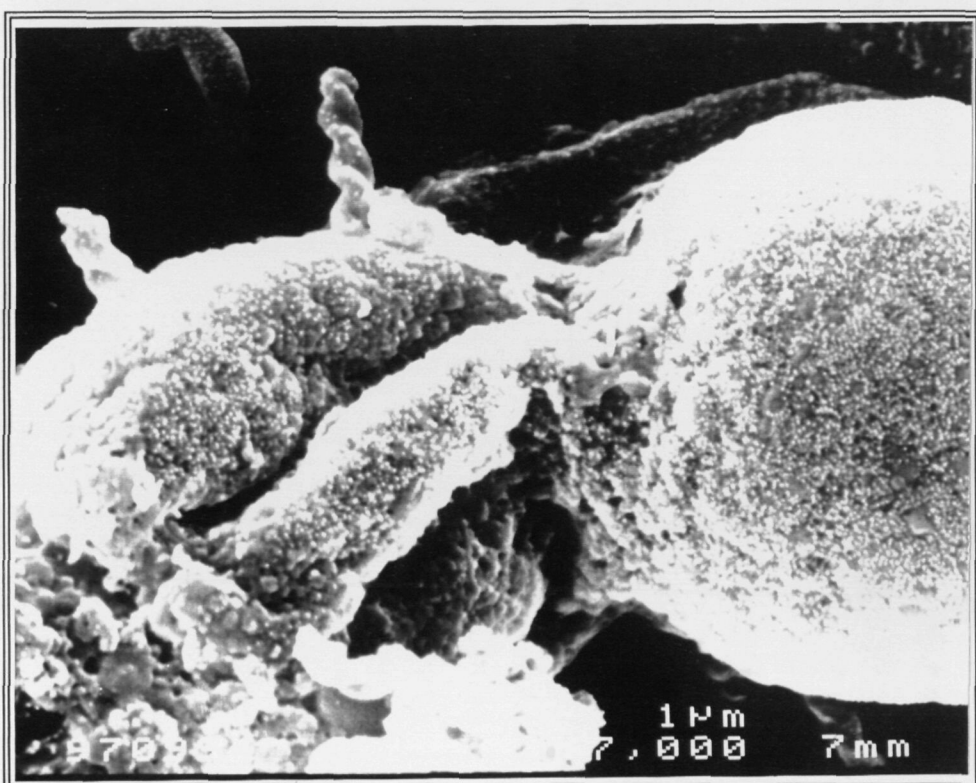
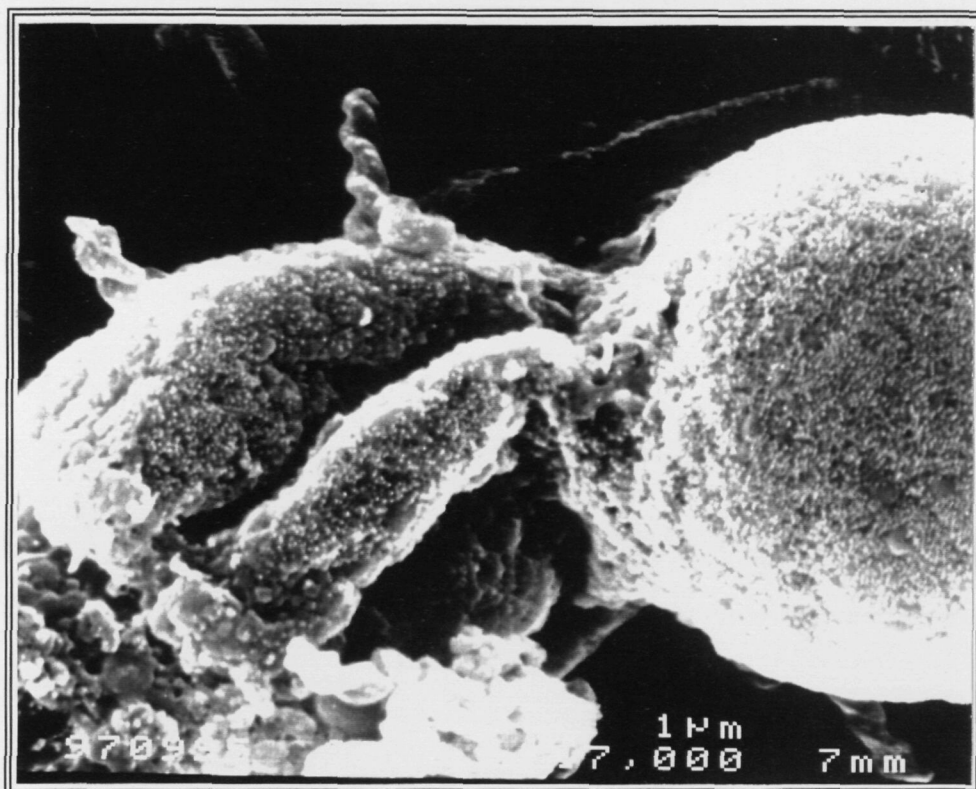


Figura 4.1.36.- Par estereoscópico del hongo colonizador de la lente de contacto 303, A. pullulans, en el que se observan estructuras helicoidales con origen aparente en la pared fúngica. (Microscopía electrónica de barrido).



4.2. COLONIZACION FUNGICA DE LENTES DE CONTACTO NUEVAS

4.2.1. LENTES HIDROFILICAS

En el presente apartado se exponen los resultados de colonización (adhesión e invasión) obtenidos después de tratar las lentes de contacto hidrofílicas de uso continuado o diario según la metodología descrita en el apartado 3.2.1. En primer lugar, se presentan los resultados obtenidos después de la incubación de las lentes con levaduras y seguidamente los correspondientes al cultivo de los polímeros con hongos filamentosos. Por último, se detallan los resultados del análisis comparativo efectuado entre los dos grupos de hongos indicados.

La denominación de las lentes hidrofílicas según su uso (continuado y diario) sólo está relacionada con el periodo y forma de utilización por parte de los usuarios (véase apartado 1.1.2.). Ya que la metodología empleada para provocar la colonización de las lentes de uso diario se modificó ligeramente en base a los resultados obtenidos con las de uso continuado, se ha estimado oportuno mantener dicha denominación para diferenciarlas entre sí.

CARACTERIZACION QUIMICA DE LOS MATERIALES

Los resultados obtenidos en relación a los espectros de infrarrojos (IR) de las lentes de contacto hidrofílicas utilizadas en el estudio (véase apartado 3.2.1.) se exponen seguidamente. Las frecuencias de las bandas de absorción más intensas debidas a las vibraciones de tensión y de deformación de los diferentes grupos funcionales presentes en los polímeros, se indican en la tabla 3. Asimismo, en las figuras 15-17 se representan los espectros IR de los materiales analizados, tanto de las lentes de uso continuado (polymacon) como de las de

uso diario (tefilcon, scafilcon A, bufilcon A y vifilcon A).

Tabla 3.- Frecuencias de las bandas de absorción (cm^{-1}) más intensas debidas a las vibraciones de tensión (ν) y de deformación (δ) de los grupos funcionales presentes en los materiales de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas.

MATERIAL	ν_{OH}	$\nu_{\text{CH,CH}_2, \text{CH}_3}$	$\nu_{\text{C=O}}$ O	$\nu_{\text{C=O}}$ N	δ_{NH}	$\delta_{\text{CH,CH}_2, \text{CH}_3}$	δ_{CH_3}	$\nu_{\text{C-OC}}$	$\nu_{\text{C-OH}}$
Polymacon	3446	2933	1736	---	---	1460.8	---	1162	1076
Tefilcon	3445	2939	1725	---	---	1460	---	1156	1077
Scafilcon A	3449	2932	1740	1657	---	1460	1387	1167	---
Bufilecon A	3436	2952	1733	---	1562	1458.6	1390	1158	1076
Vifilcon A	3437	2952	1734	1671	---	1461	1392	1158	1076

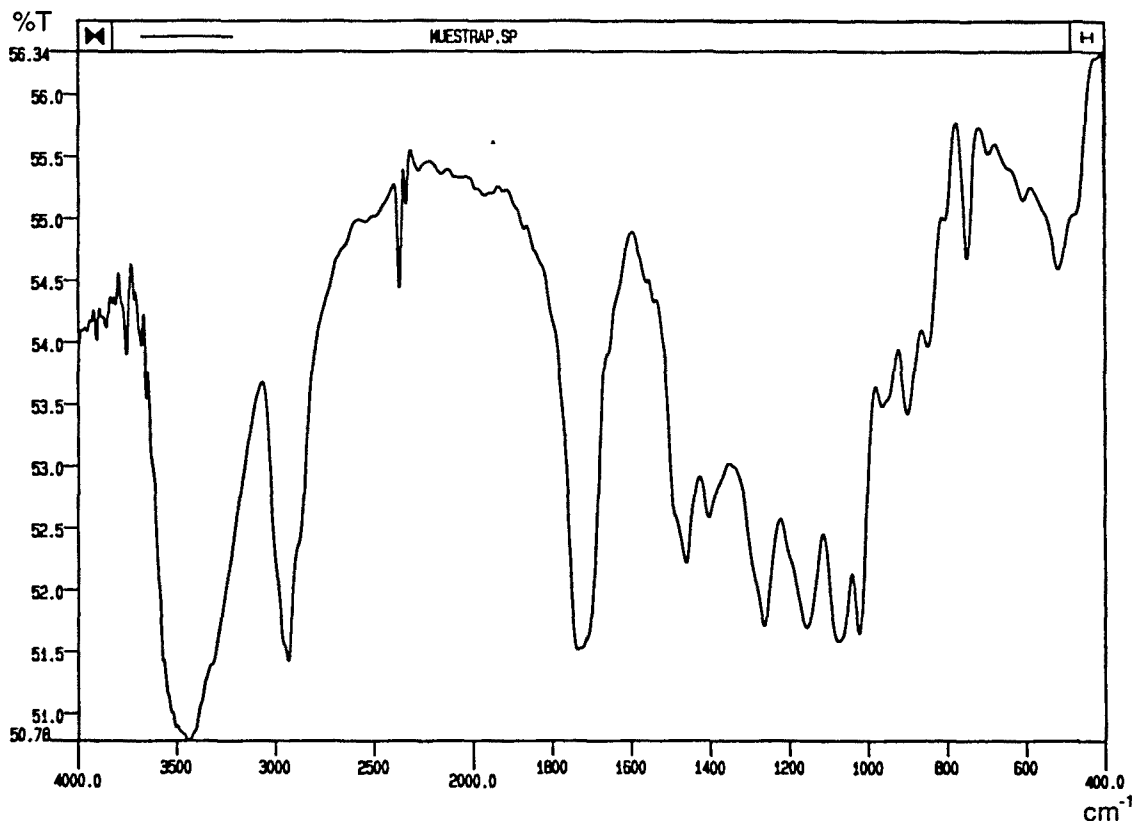


Figura 15.- Espectro IR del polymacon.

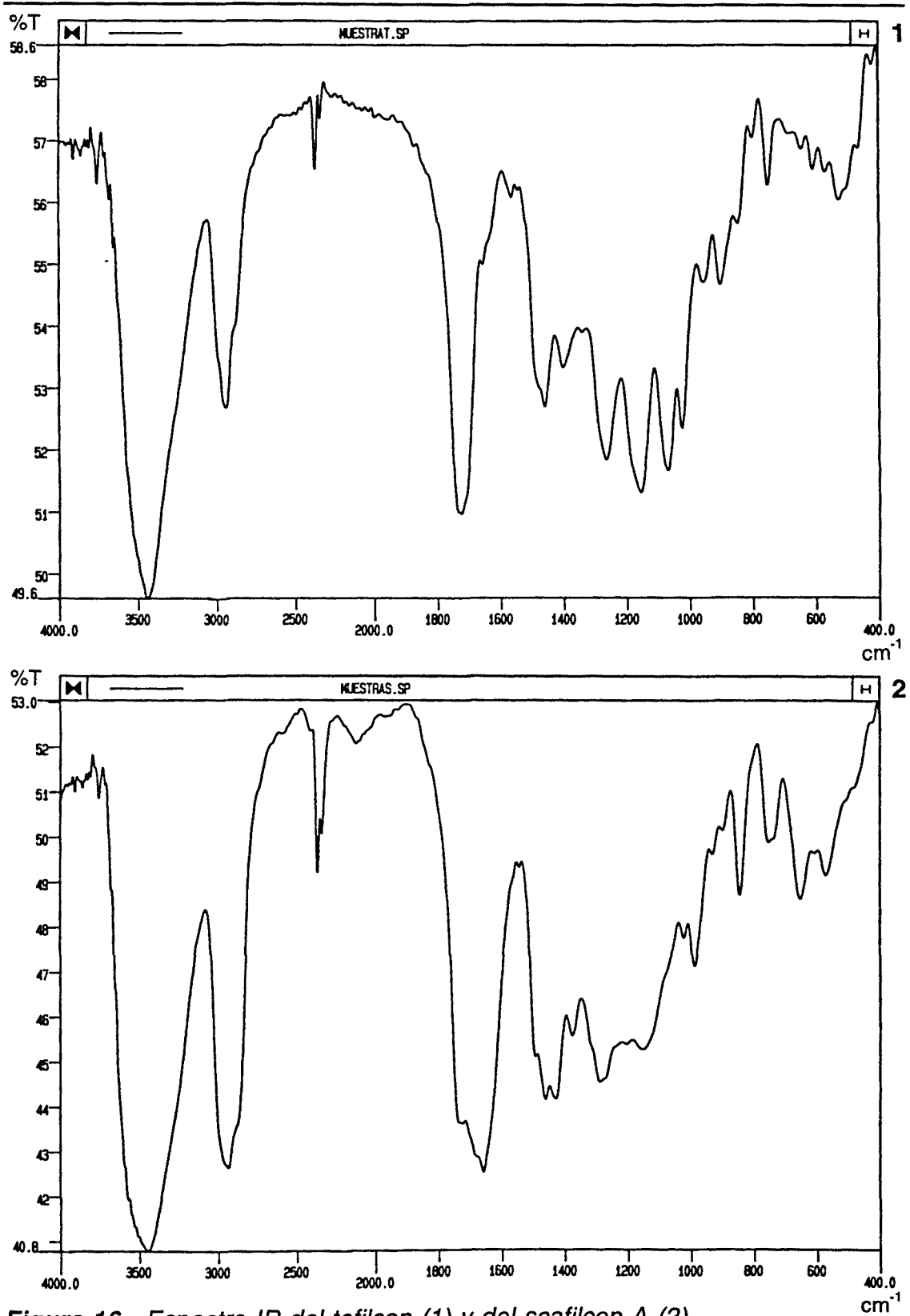


Figura 16.- Espectro IR del tefilcon (1) y del scafilcon A (2).

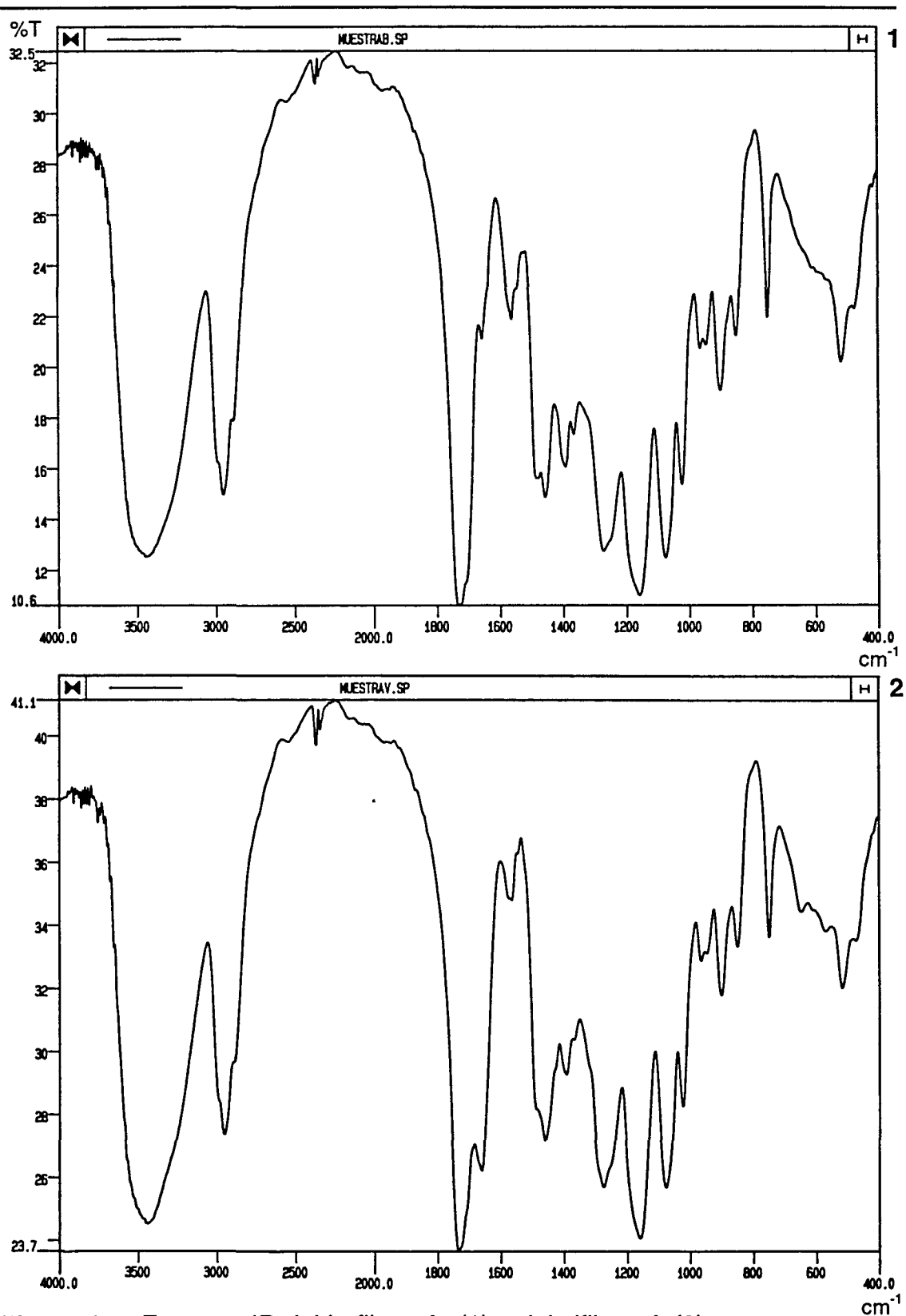


Figura 17.- Espectro IR del bufilcon A (1) y del vililcon A (2).

4.2.1.1. COLONIZACION DE LAS LENTES POR LEVADURAS

De todas las especies y cepas de levaduras utilizadas, únicamente *Candida albicans* 93150 colonizó las lentes de uso continuado. Esta fue la causa determinante que condujo a utilizar solamente dicha levadura para los estudios posteriores sobre colonización de lentes hidrofílicas de uso diario. *C. albicans* 92009, así como *C. tropicalis* (cepas 13/2 y 92077) y *Torulopsis glabrata* (cepas 93189 y 93370) no se adhirieron a las lentes de uso continuado bajo las condiciones de cultivo establecidas. En consecuencia, tampoco se utilizaron para los estudios de colonización de las lentes de uso diario.

Procede recordar que las lentes hidrofílicas se dividieron por la mitad con el objeto de comprobar si existían diferencias de colonización entre la zona contigua a la incisión y el resto. Valga indicar que las colonias internas estuvieron presentes en cualquier lugar de las lentes independientemente de la zona considerada.

4.2.1.1.1. LENTES DE USO CONTINUADO

Las lentes de uso continuado fueron las primeras que se utilizaron para analizar la posible colonización de lentes de contacto hidrofílicas. Los resultados de adhesión e invasión por la cepa 93150 de *C. albicans* se exponen seguidamente. Procede recordar que se estudió la colonización de las lentes de polymacon al ser cultivadas en diferentes medios de cultivo con diferentes cepas en cámaras de incubación y viales (véase apartado 3.2.1.1.).

Los resultados sobre la adhesión y la invasión de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso continuado por parte de *C. albicans*, según el lugar de siembra y el medio de cultivo se relacionan en la tabla 4.

Tabla 4.- Resultados sobre la adhesión (ADH.) y la invasión (INV.) de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso continuado por *Candida albicans* 93150, según el lugar de siembra y el medio de cultivo (SF: suero fisiológico; MS: medio de Sabouraud; LS: lágrima sintética). Grado 0, 1, 2: grados de adhesión/invasión.

ADHESION		Grado 0		Grado 1		Grado 2		no ADH.		ADH. total	
LUGAR SIEMBRA	MEDIO	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
cámara	SF	40	100	0	0	0	0	40	100	0	0
	MS	17	42.5	21	52.5	2	5	17	42.5	23	57.5
	LS	31	77.5	9	22.5	0	0	31	77.5	9	22.5
vial	SF	40	100	0	0	0	0	40	100	0	0
	MS	29	72.5	11	27.5	0	0	29	72.5	11	27.5
	LS	36	90	4	10	0	0	36	90	4	10

INVASION		Grado 0		Grado 1		Grado 2		no INV.		INV. total	
LUGAR SIEMBRA	MEDIO	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
cámara	SF	40	100	0	0	0	0	40	100	0	0
	MS	38	95	2	5	0	0	37	92.5	3	7.5
	LS	40	100	0	0	0	0	40	100	0	0
vial	SF	40	100	0	0	0	0	40	100	0	0
	MS	39	95	1	5	0	0	39	95	1	5
	LS	40	100	0	0	0	0	40	100	0	0

Colonización según el medio de cultivo utilizado en la incubación

La observación microscópica del inóculo localizado en las cámaras de incubación después de 7 días de cultivo de las lentes, permitió determinar que el pseudomicelio/micelio estuvo prácticamente ausente cuando el cultivo se preparó con suero fisiológico. La presencia del mismo fue más abundante al utilizar lágrima sintética; no obstante, fue todavía mayor y su desarrollado fue máximo cuando se incubaron las lentes con caldo de Sabouraud.

Adhesión

Respecto al grado de adhesión del hongo (figura 18), el análisis estadístico efectuado reveló la existencia de diferencias significativas en el grado de adhesión entre los medios de cultivo utilizados en la incubación de las lentes, tanto en cámara ($\chi^2 = 35.3591$, g.l. = 4, $p < 0.001$) como en vial ($\chi^2 = 14.1714$, g.l. = 2, $p < 0.001$). Estos resultados indican que el medio de cultivo influyó en la adhesión del hongo. La observación microscópica de las lentes permitió indicar que fue principalmente el pseudomicelio o el micelio el que se adhirió a la superficie del material y no los blastoconidios. Así, el máximo porcentaje de lentes con pseudohifas/hifas adheridas y el grado más elevado de densidad se consiguió al incubarlas con caldo de Sabouraud. Por su parte, el cultivo con suero fisiológico puso de manifiesto la ausencia total de adhesión (figura 18).

Invasión

Las diferencias en las frecuencias de lentes invadidas por *C. albicans* no fueron significativas entre los distintos medios de cultivo, ni en cámara ni en vial. De hecho, la invasión de las lentes por dicha levadura es muy baja en todos los casos y prácticamente no varía en función del medio empleado (figura 18). Sólo se consiguió una cierta penetración del pseudomicelio/micelio cuando la incubación del polímero se realizó con caldo de Sabouraud, independientemente

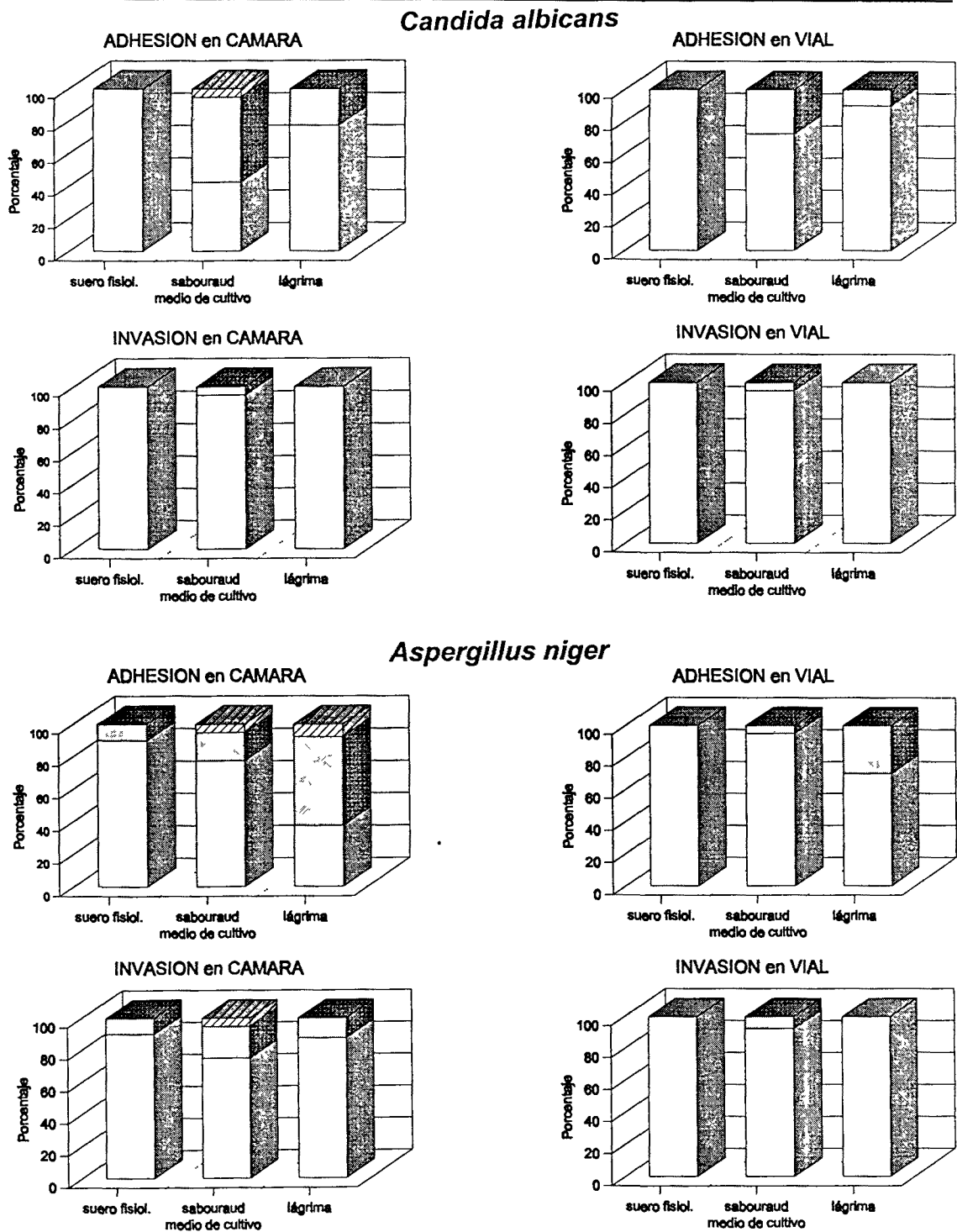


Figura 18.- Resultados de la adhesión y la invasión de *Candida albicans* 93150 y *Aspergillus niger* 2700 a lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso continuado. Grado de adhesión/invasión 0: blanco; grado 1: punteado; grado 2: rayado.

de su lugar de cultivo. Asimismo, el grado de invasión fue débil, según la escala de valores establecida en el apartado 3.2.1.1.6.

La observación de las lentes con microscopía óptica permitió indicar que morfológicamente las hifas/pseudohifas del hongo invasor que habían colonizado las lentes adoptaron una disposición helicoidal en la matriz del polímero. Los filamentos internos, de extremos afilados, tenían dimensiones reducidas y ligeramente diferentes según el medio de cultivo utilizado. Así, al final del período de incubación con suero fisiológico y lágrima sintética se alcanzaron valores máximos de 2.0 μm y de 2.5 μm con caldo de Sabouraud. En general, la ramificación fue escasa, por lo que no formaron colonias compactas en la matriz de las lentes.

Colonización según el lugar de incubación

Adhesión

Teniendo en cuenta que no se produjo adhesión en suero fisiológico, las diferencias entre las frecuencias de adhesión observadas en cámara y en vial (figura 18), únicamente fueron significativas cuando se utilizó caldo de Sabouraud como medio de cultivo ($\chi^2 = 8.2554$, g.l. = 2, $p < 0.05$). En términos generales, las frecuencias de adhesión fueron mayores cuando las lentes se incubaron en cámara. Mientras el grado máximo de adhesión en cámara fue el 2 (con medio de Sabouraud), en vial solamente se registró una adhesión débil (figura 18).

Invasión

La comparación entre las frecuencias de invasión en cámara y vial (figura 18) reveló que, en todos los medios de cultivo no se registraron diferencias

estadísticamente significativas. De aquí se deduce que, independientemente del medio de cultivo empleado, el lugar de incubación no afectó al grado de adhesión de la levadura. Concretamente, sólo se apreció un escaso porcentaje de invasión, tanto en cámara como en vial, cuando se utilizó caldo de Sabouraud. Asimismo, el grado máximo de invasión conseguido con dicho medio, tan sólo fue débil (figura 18).

4.2.1.1.2. LENTES DE USO DIARIO

Antes de proceder a la exposición de los resultados correspondientes a las lentes de uso diario, valga recordar que los polímeros analizados fueron el tefilcon (grupo I, no iónico y contenido hídrico del 37.5%), el scafilcon A (grupo II, no iónico e hidratación del 71%), el bufilcon A (grupo III, iónico y grado de hidrofilia del 45%) y el vifilcon A (grupo IV, iónico y contenido acuoso del 55%). Todos ellos se cultivaron con suero fisiológico y medio líquido de Sabouraud en cámaras de incubación durante 3, 7, 14 y 21 días, con una concentración conocida de blastoconidios de *C. albicans* 93150 (véase apartado 3.2.1.2.).

En las tablas 5 y 6 se relacionan los resultados de adhesión e invasión, respectivamente, de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario por parte de *C. albicans*, según el tipo de material, medio de cultivo y días de incubación.

Colonización según el material de las lentes

Adhesión

En la tabla 7 se muestran los resultados de las comparaciones estadísticas referentes al grado de adhesión de los cuatro materiales de las lentes de

Tabla 5.- Resultados sobre la adhesión (adh.) de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario por *Candida albicans* 93150, cultivadas en suero fisiológico y medio de Sabouraud. Grados 0, 1, 2, 3: grados de adhesión.

DIAS	GRADOS	TEFILCON				SCAFILCON A				
		Suero Fisiol.		Medio Sab.		Suero Fisiol.		Medio Sab.		
		n	%	n	%	n	%	n	%	
3	0	40	100	30	75.00	38	95.00	17	42.50	
	1	0	0	10	25.00	2	5.00	22	55.00	
	2	0	0	0	0	0	0	1	2.50	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	no adh.	40	100	30	75.00	38	95.00	17	42.50	
	adh.tot.	0	0	10	25.00	2	5.00	23	57.50	
7	0	40	100	14	35.00	35	87.50	6	15.00	
	1	0	0	23	57.00	5	12.50	29	72.50	
	2	0	0	3	7.50	0	0	5	12.50	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	no adh.	40	100	14	35.00	35	87.50	6	15.00	
	adh.tot.	0	0	26	65.00	5	12.50	34	85.00	
14	0	40	100	14	35.00	35	87.50	10	25.00	
	1	0	0	24	60.00	5	12.50	26	65.00	
	2	0	0	2	5.00	0	0	4	10.00	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	no adh.	40	100	14	35.00	35	87.50	10	25.00	
	adh.tot.	0	0	26	65.00	5	12.50	30	75.00	
21	0	40	100	12	30.00	33	82.50	4	10.00	
	1	0	0	25	62.50	7	17.50	30	75.00	
	2	0	0	3	7.50	0	0	6	15.00	
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
	no adh.	40	100	12	30.00	33	82.50	4	10.00	
	adh.tot.	0	0	28	70.00	7	17.50	36	90.00	
TOTAL	no adh.	0	160	100	70	43.75	141	88.12	37	23.12
	adh.	1-3	0	0	90	56.25	19	11.88	123	76.88

Tabla 5. (Continuación).

DIAS	GRADOS	BUFILCON A				VIFILCON A			
		Suero Fisiol.		Medio Sab.		Suero Fisiol.		Medio Sab.	
		n	%	n	%	n	%	n	%
3	0	40	100	3	7.50	29	72.50	3	7.50
	1	0	0	30	75.00	11	27.50	28	70.00
	2	0	0	7	17.50	0	0	9	22.50
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no adh.	40	100	3	7.50	29	72.50	3	7.50
	adh.tot.	0	0	37	92.50	11	27.50	37	92.50
7	0	40	100	3	7.50	29	72.50	1	2.50
	1	0	0	28	70.00	11	27.50	28	70.00
	2	0	0	9	22.50	0	0	11	27.50
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no adh.	40	100	3	7.50	29	72.50	1	2.50
	adh.tot.	0	0	37	92.50	11	27.50	39	97.50
14	0	40	100	2	5.00	28	70.00	1	2.50
	1	0	0	29	72.50	12	30.00	27	67.50
	2	0	0	9	22.50	0	0	12	30.00
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no adh.	40	100	2	5.00	28	70.00	1	2.50
	adh.tot.	0	0	38	95.00	12	30.00	39	97.50
21	0	40	100	3	7.50	28	70.00	1	2.50
	1	0	0	28	70.00	12	30.00	28	70.00
	2	0	0	9	22.50	0	0	11	27.50
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no adh.	40	100	3	7.50	28	70.00	1	2.50
	adh.tot.	0	0	37	92.50	12	30.00	39	97.50
TOTAL	no adh.	160	100	11	6.87	114	71.25	6	3.75
	adh.	0	0	149	93.13	46	28.75	154	96.25

Tabla 6.- Resultados sobre la invasión (inv.) de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario por *Candida albicans* 93150, cultivadas en suero fisiológico y medio de Sabouraud. Grados 0, 1, 2, 3: grados de invasión.

DIAS	GRADOS	TEFILCON				SCAFILCON A			
		Suero Fisiol.		Medio Sab.		Suero Fisiol.		Medio Sab.	
		n	%	n	%	n	%	n	%
3	0	40	100	39	97.50	40	100	37	92.50
	1	0	0	1	2.50	0	0	3	7.50
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv. inv.tot.	40	100	39	97.50	40	100	37	92.50
		0	0	1	2.50	0	0	3	7.50
7	0	40	100	35	87.50	40	100	33	82.50
	1	0	0	5	12.50	0	0	7	17.50
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv. inv.tot.	40	100	35	87.50	40	100	33	82.50
		0	0	5	12.50	0	0	7	17.50
14	0	40	100	34	85.00	40	100	32	80.00
	1	0	0	6	15.00	0	0	8	20.00
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv. inv.tot.	40	100	34	85.00	40	100	32	80.00
		0	0	6	15.00	0	0	8	20.00
21	0	40	100	34	85.00	40	100	31	77.50
	1	0	0	6	15.00	0	0	9	22.50
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv. inv.tot.	40	100	34	85.00	40	100	31	77.50
		0	0	6	15.00	0	0	9	22.50
TOTAL	no inv.								
	inv.								
	0	160	100	142	88.75	160	100	133	83.12
	1-3	0	0	18	11.25	0	0	27	16.88

Tabla 6. (Continuación).

DIAS	GRADOS	BUFILCON A				VIFILCON A			
		Suero Fisiol.		Medio Sab.		Suero Fisiol.		Medio Sab.	
		n	%	n	%	n	%	n	%
3	0	40	100	31	77.50	40	100	30	75.00
	1	0	0	9	22.50	0	0	10	25.00
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv.	40	100	31	77.50	40	100	30	75.00
	inv.tot.	0	0	9	22.50	0	0	10	25.00
7	0	40	100	29	72.50	40	100	28	70.00
	1	0	0	11	27.50	0	0	12	30.00
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv.	40	100	29	72.50	40	100	28	70.00
	inv.tot.	0	0	11	27.50	0	0	12	30.00
14	0	40	100	29	72.50	40	100	27	67.50
	1	0	0	11	27.50	0	0	13	32.50
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv.	40	100	29	72.50	40	100	27	67.50
	inv.tot.	0	0	11	27.50	0	0	13	32.50
21	0	40	100	30	75.00	40	100	28	70.00
	1	0	0	10	25.00	0	0	12	30.00
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv.	40	100	30	75.00	40	100	28	70.00
	inv.tot.	0	0	10	25.00	0	0	12	30.00
TOTAL	no inv.	160	100	119	74.37	160	100	113	70.62
	inv.	0	0	41	26.63	0	0	47	29.38

contacto hidrofílicas analizadas después de ser incubadas con *C. albicans* y suero fisiológico o medio líquido de Sabouraud, durante 3, 7, 14 y 21 días de cultivo. Las diferencias fueron significativas en todos los casos ($p < 0.001$). Cabe asumir, por tanto, que el tipo de material de la lente influye en el grado de adhesión de las hifas/pseudohifas, independientemente del medio de cultivo empleado y de los días de incubación.

Tabla 7.- Resultados de las comparaciones estadísticas χ^2 ; (grados de libertad), nivel de significación- efectuados para determinar la relación entre el tipo de material de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario y el grado de adhesión de *Candida albicans* 93150, según el medio de cultivo y los días de incubación.

DÍAS	SUERO FISIOLÓGICO	MEDIO SABOURAUD
3	27.7132; (3), $p < 0.001$	62.7179; (6), $p < 0.001$
7	22.7778; (3), $p < 0.001$	22.8624; (6), $p < 0.001$
14	25.4710; (3), $p < 0.001$	27.3794; (6), $p < 0.001$
21	24.5465; (3), $p < 0.001$	19.5284; (6), $p < 0.01$

Si se consideran únicamente las frecuencias de adhesión a los polímeros al utilizar suero fisiológico puede comprobarse que aquella fue siempre nula con tefilcon y bufilcon A, es decir, los polímeros con menor contenido hídrico. Atendiendo a los demás materiales, las frecuencias más bajas se apreciaron con el scafilcon A a los 3 días de cultivo (figura 19). El porcentaje de lentes con adhesión a este material se incrementó ligeramente al séptimo día de incubación. Posteriormente, y hasta el final del periodo de cultivo, los valores porcentuales de lentes fabricadas con dicho material y que presentaron micelio/pseudomicelio

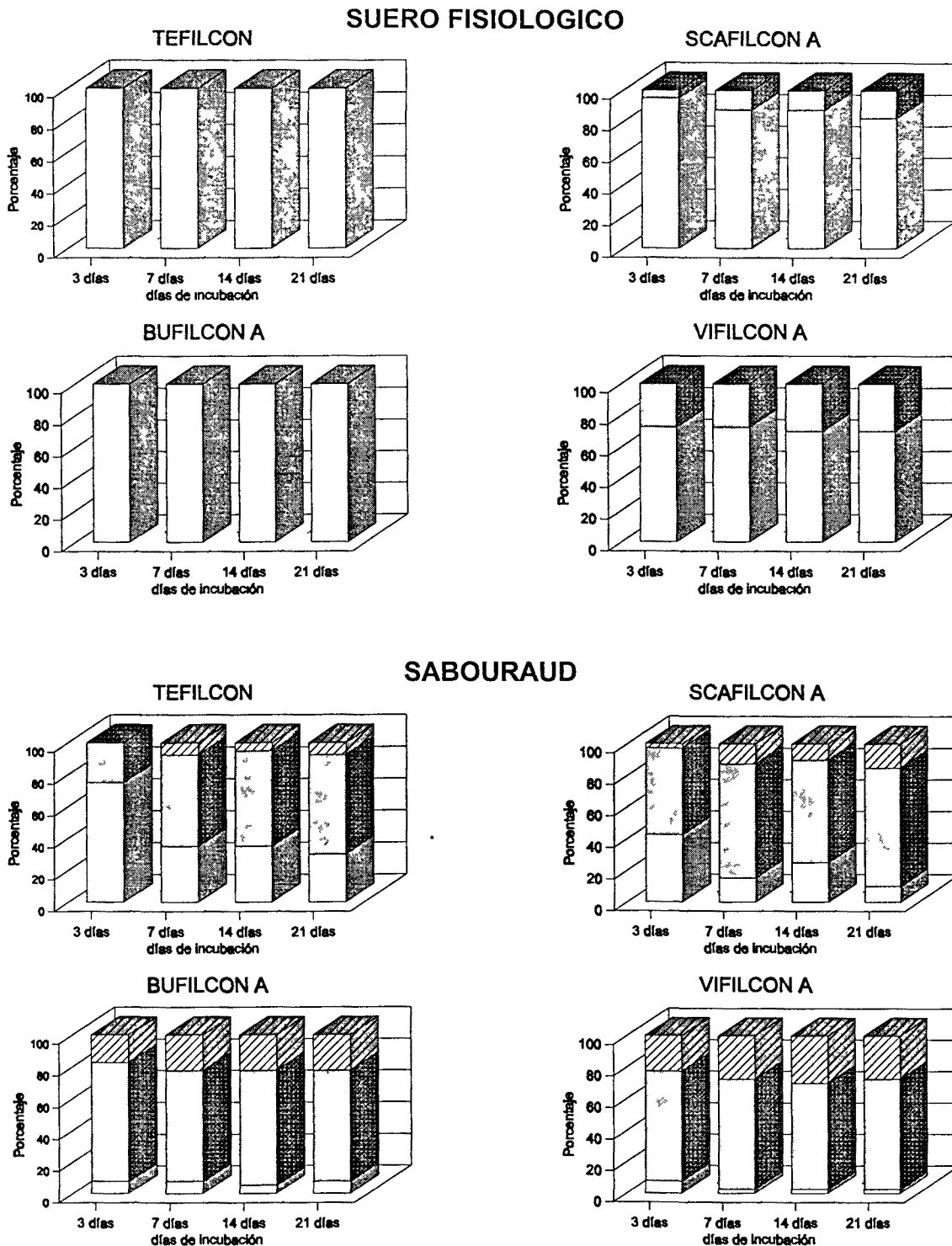


Figura 19.- Resultados sobre la adhesión de Candida albicans 93150 a lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario. Grado de adhesión 0: blanco; grado 1: punteado; grado 2: rayado.

adherido incrementaron muy levemente el porcentaje de hifas/pseudohifas adheridas permaneciendo prácticamente constante a lo largo de los días de cultivo (figura 19).

Dejando al margen los materiales en los que nunca se registró adhesión (tefilcon y bufilcon A), los intervalos de confianza de las frecuencias correspondientes al scafilcon A y al vifilcon A únicamente no mostraron solapamiento a los 3 días de incubación (figura 20).

El análisis de conglomerados efectuado a partir de las frecuencias de adhesión obtenidas confirmó que el vifilcon A mostró un comportamiento claramente distinto al del resto de materiales considerados. Dentro de éstos, el scafilcon A se separó del conglomerado formado por el tefilcon y el bufilcon A (figura 21).

La incubación de las lentes con medio de Sabouraud puso de manifiesto que *C. albicans* se adhirió a todos los polímeros (figura 19). Los porcentajes de adhesión más bajos se alcanzaron con el tefilcon, independientemente de los días de incubación. Los materiales no iónicos (tefilcon y scafilcon A) manifestaron un notable incremento de la adhesión fúngica al séptimo día de incubación, oscilando aquélla sólo ligeramente en los días sucesivos. Los polímeros iónicos (bufilcon A y vifilcon A) fueron los que presentaron siempre los mayores porcentajes de adhesión (figura 19) y se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo del periodo de cultivo. La densidad máxima de hifas adheridas alcanzó el grado 2 en todos los materiales desde el tercer día de cultivo con excepción del tefilcon que lo consiguió al séptimo día. Este polímero fue el que mostró en todos los días de cultivo un menor porcentaje de lentes con adhesión (figura 19).

El dendograma correspondiente a la valoración conjunta de las frecuencias de adhesión en caldo de Sabouraud para todos los días de incubación, confirmó claramente el comportamiento diferente del tefilcon respecto a los demás materiales. Dentro del cluster formado por estos últimos, el bufilcon A y el vifilcon A mostraron una respuesta semejante en cuanto a la adhesión fúngica,

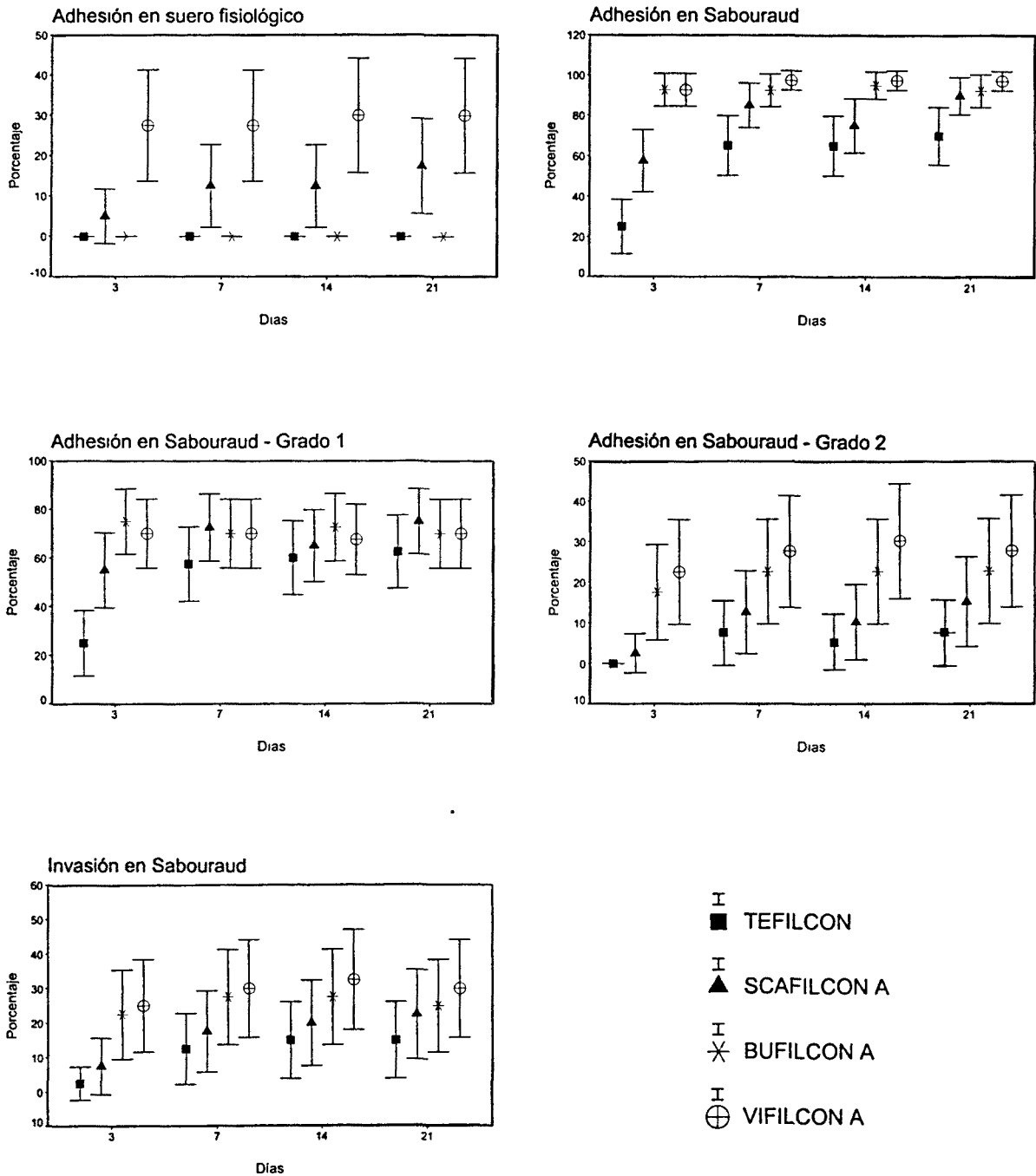


Figura 20.- Variación, a lo largo de los distintos periodos de incubación, de los porcentajes e intervalos de confianza (95%) correspondientes a la adhesión e invasión de *Candida albicans* 93150 en cada uno de los materiales considerados, al ser cultivados en suero fisiológico y medio de Sabouraud.

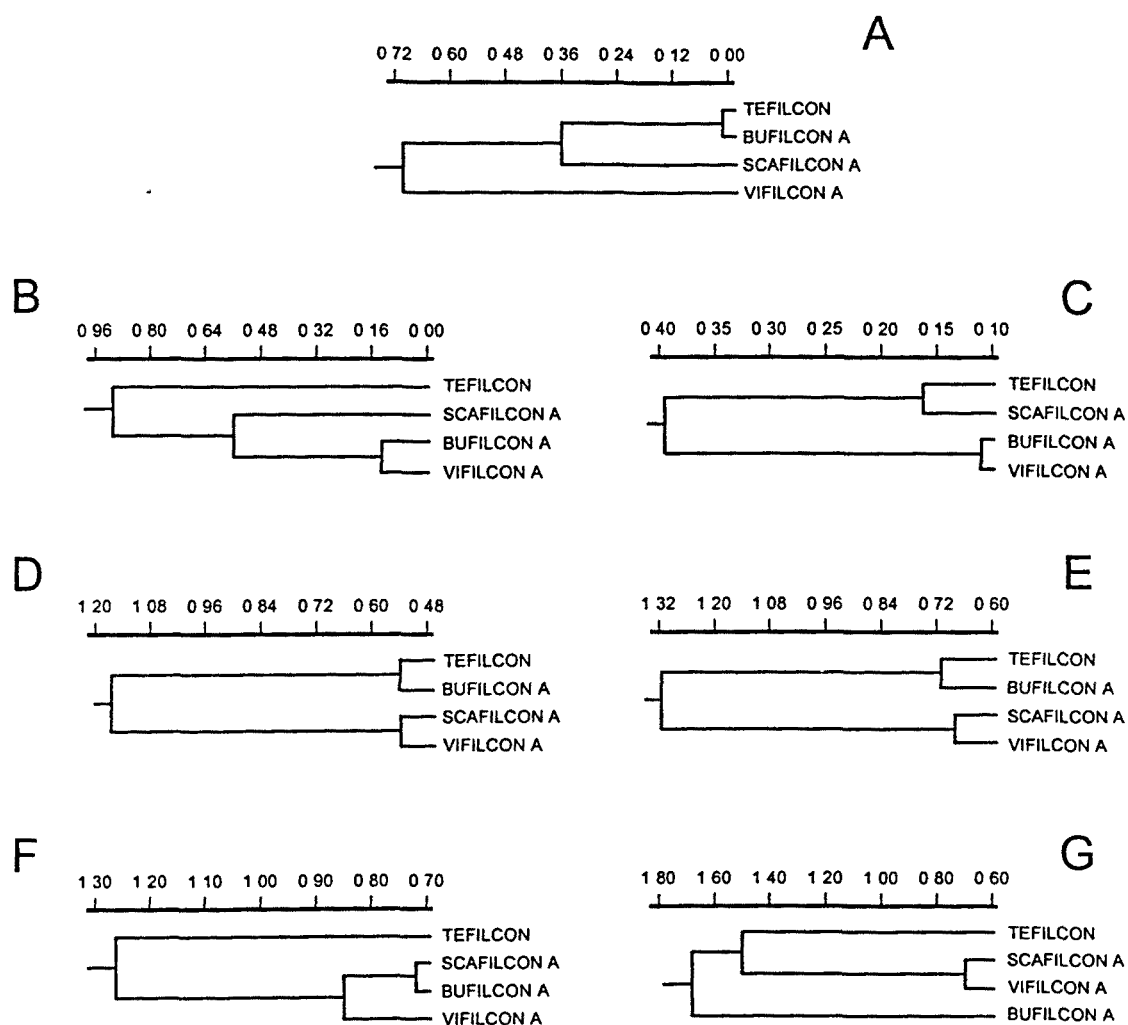


Figura 21.- Dendrograma que muestra las afinidades entre los materiales de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario, obtenido a partir de los grados de adhesión y de invasión de ambos hongos registrados en el conjunto de días de incubación. *Candida albicans* 93150: A, adhesión en suero fisiológico; B, adhesión en medio de Sabouraud; C, invasión en medio de Sabouraud. *Aspergillus niger* 2700: D, adhesión en suero fisiológico; E, adhesión en medio de Sabouraud; F, invasión en suero fisiológico; G, invasión en medio de Sabouraud.

separándose a su vez del scafilcon A (figura 21).

Los intervalos de confianza de las frecuencias de adhesión en Sabouraud mostraron generalmente un elevado solapamiento entre todos los materiales. De ellos, el bufilcon A y el vifilcon A presentaron un comportamiento semejante en todos los casos considerados (figura 20).

Invasión

Las comparaciones estadísticas entre los distintos materiales respecto a las frecuencias de invasión fúngica revelaron que las diferencias observadas, tanto en los distintos medios de cultivo como en los cuatro periodos de incubación, no fueron significativas, a excepción hecha de las frecuencias observadas en los cultivos de 3 días en medio líquido de Sabouraud ($\chi^2 = 11.9327$, g.l. = 3, $p < 0.01$). De aquí se desprende, por tanto, que todos los materiales se comportaron de manera semejante frente a la capacidad invasiva de *C. albicans* bajo las condiciones de cultivo consideradas. Así pues, cabe indicar de manera general, que el tipo de polímero no influye sobre la capacidad de invasión de dicha levadura.

Los porcentajes de invasión indicaron que ningún material fue invadido por la levadura a lo largo del periodo de estudio cuando se incubaron con suero fisiológico y que la densidad del micelio invasor de las lentes fue siempre de grado 0 (figura 22). Sin embargo, siempre existió invasión cuando los polímeros se cultivaron con medio de Sabouraud. En este caso, todas las lentes que sufrieron invasión presentaron una baja densidad de hifas internas, nunca superior al grado 1 (figura 22). En cada uno de los días de incubación, los materiales con mayores porcentajes de lentes con hifas internas correspondieron siempre a los dos polímeros iónicos (el bufilcon A y el vifilcon A). Así, el tefilcon y el scafilcon A fueron menos susceptibles a la invasión fúngica aunque, como ya se ha indicado, las diferencias a lo largo de los días de incubación, no fueron estadísticamente significativas salvo en el cultivo de 3 días. Las diferencias entre

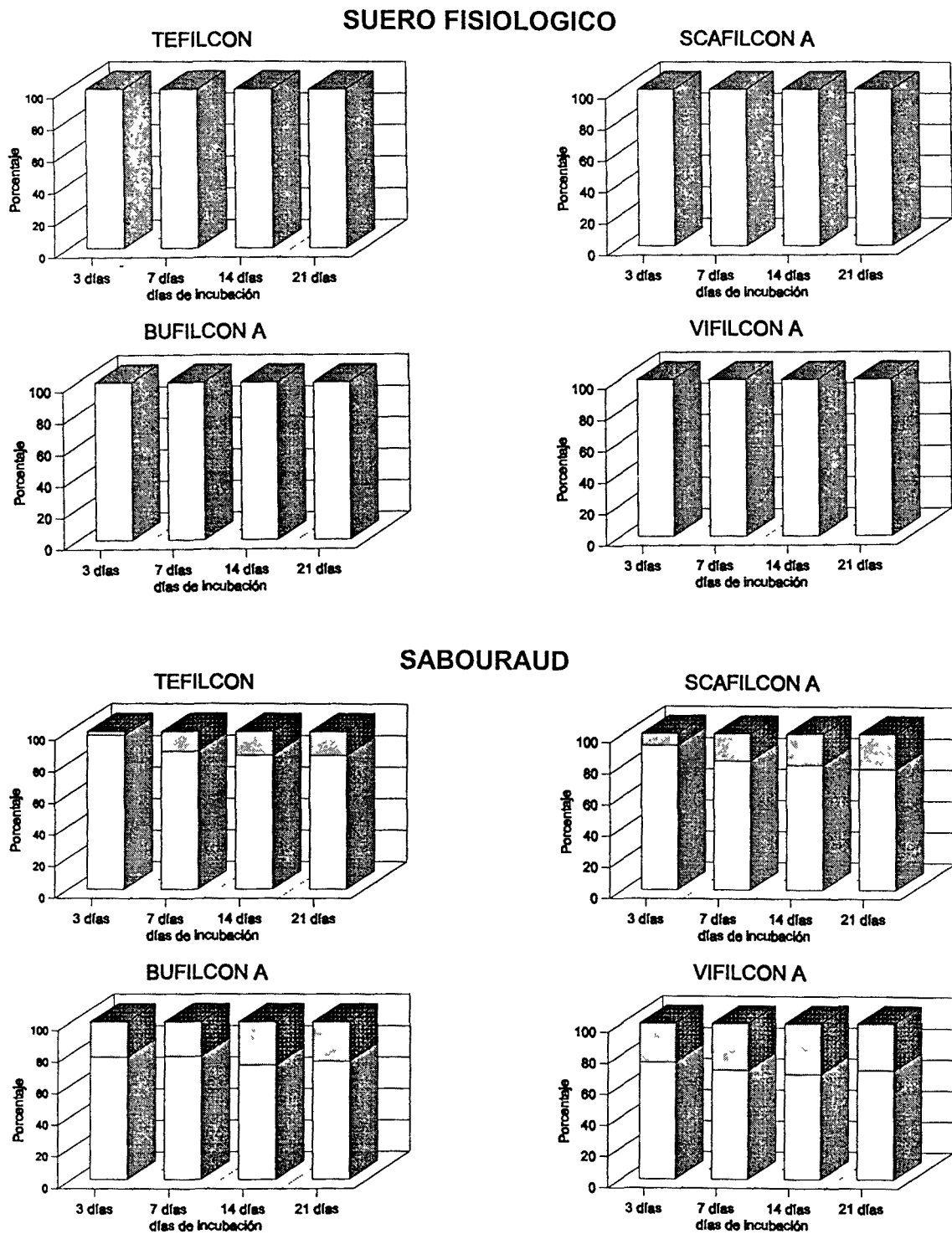


Figura 22.- Resultados sobre la invasión de Candida albicans 93150 a lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario. Grado de invasión 0: blanco; grado 1: punteado; grado 2: rayado.

los materiales iónicos y no iónicos queda claramente patente al cotejar el solapamiento entre los intervalos de confianza obtenidos para cada polímero en cada uno de los periodos de incubación (figura 20) y al atender al dendograma obtenido a partir de las frecuencias de invasión (figura 21).

La morfología del hongo en la matriz lenticular fue helicoidal, es decir, las hifas adoptaron la misma disposición que en las lentes de uso continuado (véase apartado 4.2.1.1.1.). El diámetro de los filamentos internos y el tamaño de las colonias invasoras varió en función del material de las lentes según se expone en los apartados 4.2.1.3.2. (figuras 4.2.1. y 4.2.2.).

Colonización según el medio de cultivo utilizado en la incubación

El análisis microscópico del inóculo efectuado a los 3, 7, 14 y 21 días de incubación de las lentes, previamente a la observación de las mismas, permitió determinar que el pseudomicelio/micelio estuvo prácticamente ausente cuando el cultivo se preparó con suero fisiológico, mientras que fue más abundante y su desarrollo máximo cuando se incubaron las lentes con caldo de Sabouraud.

Se comprobó que las variaciones del pH de los medios de cultivo analizados fueron mínimas a lo largo del periodo de estudio, aunque con tendencia a la acidificación. El pH del suero fisiológico osciló entre 6.0 y 6.5 y el del caldo de Sabouraud entre 5.0 y 5.5.

Adhesión

Las diferencias respecto al grado de adhesión de *C. albicans* entre los dos medios de cultivo utilizados en la incubación de las lentes (tabla 8) fueron siempre significativas ($p < 0.001$). Estos resultados permiten indicar que la adhesión de la levadura varía en función del medio de incubación y es

Tabla 8.- Resultados de las comparaciones estadísticas χ^2 ; (grados de libertad), nivel de significación- efectuadas entre los medios de cultivo utilizados para la incubación de los diferentes grupos de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario, para analizar la adhesión (ADH.) y la invasión (INV.) de *Candida albicans* 93150 a lo largo del periodo de estudio. n.s.: diferencias no significativas.

	DIAS	TEFILCON	SCAFILCON A	BUFILCON A	VIFILCON A
ADH.	3	11.4286; (1), p<0.001	25.6848; (2), p<0.001	68.8372; (2), p<0.001	37.5353; (2), p<0.001
	7	38.5185; (2), p<0.001	42.4534; (2), p<0.001	68.8372; (2), p<0.001	44.5436; (2), p<0.001
	14	38.5185; (2), p<0.001	32.1147; (2), p<0.001	72.3809; (2), p<0.001	42.9072; (2), p<0.001
	21	43.0769; (2), p<0.001	43.0270; (2), p<0.001	68.8372; (2), p<0.001	34.4276; (2), p<0.001
INV.	3	1.0127; (1), n.s.	3.1169; (1), n.s.	10.1408; (1), p<0.01	11.4286; (1), p<0.001
	7	5.3333; (1), p<0.05	7.6712; (1), p<0.01	12.7536; (1), p<0.001	14.1176; (1), p<0.001
	14	6.4865; (1), p<0.05	8.8889; (1), p<0.01	12.7536; (1), p<0.001	15.5224; (1), p<0.001
	21	6.4865; (1), p<0.05	10.1408; (1), p<0.01	11.4286; (1), p<0.001	14.1176; (1), p<0.001

significativamente mayor al emplear el medio de Sabouraud, independientemente del material de fabricación de las lentes y del periodo de cultivo (figura 19).

Según se observa en la figura 19, el cultivo con suero fisiológico sólo permitió la adhesión a los polímeros con mayor contenido hídrico (scafilcon A y vifilcon A), siendo el grado de adhesión siempre débil. Por su parte, el Sabouraud líquido permitió la adhesión del hongo a todos los polímeros y fue el medio que condujo, en cada uno de los días de incubación, a frecuencias más elevadas de lentes con filamentos fúngicos adheridos, principalmente con el bufilcon A y vifilcon A. El grado de adhesión más frecuente en el scafilcon A fue débil, aunque en todos estos materiales siempre llegó a alcanzar el grado medio. Por otro lado, la adhesión al tefilcon fue, en términos generales, algo más débil que en los demás polímeros.

Invasión

Respecto a las frecuencias de invasión cabe indicar que, atendiendo al material de fabricación de las lentes y a los periodos de cultivo se registraron, en términos generales, diferencias significativas entre los medios de cultivo empleados en la incubación de las lentes (tabla 8). Únicamente las diferencias entre ambos medios no fueron significativas en la incubación con tefilcon y scafilcon A (polímeros no iónicos) en el tercer día de revisión de las lentes. De aquí se desprende que, generalmente, el medio de cultivo influye en la invasión de las lentes por *C. albicans*.

Los porcentajes de invasión (figura 22) fueron nulos en todos los polímeros después de su incubación con suero fisiológico. Por el contrario, los cultivos con caldo de Sabouraud condujeron a la presencia de hifas internas en la matriz de las lentes, aunque los porcentajes de colonización fueron siempre relativamente bajos. En cada uno de los días de incubación, los valores más elevados correspondieron a los materiales iónicos (bufilcon A y vifilcon A). Cuando se registró invasión, ésta fue siempre débil.

Colonización según los días de incubación

Adhesión

En cada uno de los materiales considerados, la variación de las frecuencias de adhesión de *C. albicans* después de su cultivo con suero fisiológico a lo largo de todo el periodo de estudio no fue estadísticamente significativa. Valga recordar que la adhesión en suero fisiológico fue o bien nula, o bien escasa (figura 19).

Teniendo en cuenta que el grado de adhesión fue para todas las condiciones de estudio siempre significativamente superior al emplear el caldo de Sabouraud como medio de cultivo que el suero fisiológico, las diferencias entre los días de incubación fueron significativas en el caso del tefilcon ($\chi^2 = 22,3254$, g.l. = 6, $p < 0.01$) y del scafilcon A ($\chi^2 = 15,6243$, g.l. = 6, $p < 0.05$). En estos materiales se observó un incremento importante de lentes con hifas/pseudohifas adheridas entre el tercer y el séptimo día de cultivo (figura 19); de hecho, si no se consideran las frecuencias obtenidas al tercer día, el grado de adhesión fue independiente de los días de incubación. El aumento de las frecuencias de adhesión no se manifestó con los polímeros iónicos, mostrando ya desde el primer día valores muy similares (figura 19).

Invasión

No se detectó en ningún caso una variación significativa de la invasión con los días de incubación. Según se ha comentado anteriormente, con el suero fisiológico nunca se produjo invasión de las lentes y en los cultivos con caldo de Sabouraud las frecuencias fueron bajas en todos los materiales (grado 1) y más o menos constantes (figura 22); concretamente, el valor porcentual máximo se obtuvo al incubar durante 14 días las lentes de vifilcon A (32.5%) y el mínimo después del cultivo de las lentes de tefilcon durante 3 días (2.5%).

4.2.1.2. COLONIZACION DE LAS LENTES POR HONGOS FILAMENTOSOS

De las diferentes cepas de *Aspergillus niger* estudiadas, solamente la cepa 2700 colonizó las lentes hidrofílicas de uso continuado. Esta fue la causa que condujo a la utilización exclusiva del hongo filamentoso indicado para provocar la colonización de las lentes hidrofílicas de uso diario y de las rígidas permeables a los gases. Las cepas 22, 24, 25 y 2574 de *A. niger* no se adhirieron a las lentes de uso continuado analizadas y, en consecuencia, no los invadieron. Por tanto, no se utilizaron para los estudios de colonización de las lentes de uso diario. Seguidamente se exponen solamente los resultados concernientes a la cepa 2700 de la citada especie.

Al igual que se ha indicado en el apartado destinado a la colonización de las lentes hidrofílicas por levaduras, procede recordar que aquéllas fueron divididas por la mitad con el objeto de comprobar si existían diferencias de colonización entre la zona contigua a la incisión y el resto de la lente, obteniéndose como resultado que las colonias internas estuvieron presentes en cualquier lugar independientemente de la zona considerada.

4.2.1.2.1. LENTES DE USO CONTINUADO

En relación a las lentes de uso continuado se analizó la colonización de un polímero, el polymacon al ser cultivado con *A. niger* 2700 en suero fisiológico, medio líquido de Sabouraud y lágrima sintética en cámaras de incubación y viales durante 7 días (véase apartado 3.2.1.1.). Los resultados sobre la adhesión y la invasión de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso continuado por parte del hongo indicado, según el lugar de siembra y el medio de cultivo, se relacionan en la tabla 9.

Tabla 9.- Resultados sobre la adhesión y la invasión de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso continuado por *Aspergillus niger* 2700, según el lugar de siembra y el medio de cultivo (SF: suero fisiológico; MS: medio de Sabouraud; LS: lágrima sintética). Grado 0, 1, 2: grados de adhesión/invasión.

ADHESION		Grado 0		Grado 1		Grado 2		no ADH.		ADH. total	
LUGAR SIEMBRA	MEDIO	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
cámara	SF	36	90	4	10	0	0	36	90	4	10
	MS	30	77.5	8	17.5	2	5	30	77.5	10	22.5
	LS	15	37.5	22	55.0	3	7.5	15	37.5	25	62.5
vial	SF	40	100	0	0	0	0	40	100	0	0
	MS	38	95	2	5	0	0	37	92.5	3	7.5
	LS	28	70	12	30	0	0	28	70	12	30

INVASION		Grado 0		Grado 1		Grado 2		no INV.		INV. total	
LUGAR SIEMBRA	MEDIO	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
cámara	SF	36	90	4	10	0	0	36	90	4	10
	MS	30	75	8	20	2	5	30	75	10	25
	LS	35	87.5	5	12.5	0	0	35	87.5	5	12.5
vial	SF	40	100	0	0	0	0	40	100	0	0
	MS	37	92.5	3	7.5	0	0	37	92.5	3	7.5
	LS	40	100	0	0	0	0	40	100	0	0

Colonización según el medio de cultivo utilizado en la incubación

El análisis macroscópico del hongo después del periodo de incubación de las lentes permitió distinguir grandes diferencias morfológicas según el medio de cultivo utilizado. Las gruesas colonias con una alta densidad de conidios negros que se observaron mayoritariamente al emplear medio de Sabouraud no estuvieron nunca presentes con la lágrima sintética ni con el suero fisiológico. En estos dos casos, las esporas asexuales permanecían en el fondo del lugar de incubación. El análisis microscópico del hongo permitió indicar que el desarrollo y número de hifas de *A. niger* fue mayor cuando se cultivaron las lentes con medio líquido de Sabouraud. Si la incubación se llevó a cabo con dicho medio y las colonias tuvieron un desarrollo parcial con ausencia de conidios maduros, el micelio no se adhirió a la superficie de los polímeros y, en consecuencia, no tuvo lugar su invasión.

Adhesión

Atendiendo a las frecuencias obtenidas para los distintos grados de adhesión de *A. niger* a la superficie de las lentes de polymacon, las comparaciones efectuadas entre los tres medios de cultivo revelaron la existencia de diferencias significativas tanto en cámara ($\chi^2 = 27.2313$, g.l. = 4, $p < 0.001$) como en vial ($\chi^2 = 17.8285$, g.l. = 2, $p < 0.001$). De aquí se desprende que el medio de cultivo utilizado en la incubación de las lentes influyó en el grado de adhesión de las hifas. Los porcentajes de adhesión más elevados se obtuvieron con la lágrima sintética y los más bajos con el suero fisiológico, tanto en cámara como en vial. El grado máximo de adhesión (2) se apreció en las lentes incubadas en cámara con medio de Sabouraud o con lágrima sintética (figura 18).

Invasión

Las diferencias en las frecuencias de invasión entre los medios de cultivo no fueron significativas deduciéndose, por tanto, que la invasión es independiente del medio utilizado (figura 18). En términos generales, el número de lentes invadidas por el hongo fue escaso, especialmente en vial. El medio que permitió una mayor invasión de lentes fue, en todos casos, el caldo de Sabouraud. Cuando se produjo invasión ésta fue generalmente débil y, solamente fue media en dos lentes que fueron incubadas en las cámaras con el líquido de Sabouraud (figura 18).

La observación de las lentes con microscopía óptica permitió indicar que morfológicamente las hifas del hongo invasor adoptaron una disposición helicoidal en la matriz del polímero. Los filamentos internos, de extremos afilados, tenían un diámetro variable en función del medio de cultivo. Los valores más bajos se obtuvieron con el suero fisiológico y la lágrima sintética (3.5 μm) y los máximos con medio líquido de Sabouraud (4.5 μm). Su grado de ramificación fue variable en función del medio empleado y, en general, formaron colonias más compactas que *C. albicans*.

Colonización según el lugar de incubación

Adhesión

Las diferencias en las frecuencias de adhesión de *A. niger* obtenidos en cámara y vial fueron estadísticamente significativas al utilizar suero fisiológico ($\chi^2 = 4.2105$, g.l. = 1, $p < 0.05$) y lágrima sintética ($\chi^2 = 9.8714$, g.l. = 2, $p < 0.01$). La adhesión del micelio fue siempre mayor cuando el cultivo se hizo en cámara, independientemente del medio. El grado máximo de adhesión fue el 2 y solamente se registró en cultivos efectuados en cámara.

Invasión

Los resultados sobre invasión de las lentes hidrofílicas de uso continuado por *A. niger* fueron semejantes a los obtenidos para la adhesión. Así, las comparaciones estadísticas efectuadas pusieron de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre las frecuencias registradas en cámara y en vial cuando el polímero fue cultivado con suero fisiológico ($\chi^2 = 4.2105$, g.l. = 1, $p < 0.05$) o con lágrima sintética ($\chi^2 = 5.3333$, g.l. = 1, $p < 0.05$); de hecho, en ambos medios, mientras en el vial nunca se produjo invasión, en cámara las frecuencias de lentes invadidas se situaron alrededor del 11% (figura 18). La densidad máxima de hifas adheridas (grado 2) se alcanzó en la incubación efectuada en cámara utilizando el caldo de Sabouraud. En las demás condiciones de cultivo se registró, como máximo, una adhesión débil (figura 18).

4.2.1.2.2. LENTES DE USO DIARIO

Antes de proceder a la exposición de los resultados obtenidos en los cultivos de las lentes de uso diario, valga recordar que los polímeros analizados fueron el tefilcon (grupo I, no iónico y contenido hídrico del 37.5%), el scafilcon A (grupo II, no iónico e hidratación del 71%), el bufilcon A (grupo III, iónico y grado de hidrofilia del 45%) y el vifilcon A (grupo IV, iónico y contenido acuoso del 55%). Todos ellos se cultivaron con suero fisiológico y medio líquido de Sabouraud en cámaras de incubación durante 3, 7, 14 y 21 días, con una concentración conocida de conidios de *A. niger* 2700 (véase apartado 3.2.1.2.).

En las tablas 10 y 11 se indican los resultados de adhesión y de invasión de las lentes de contacto hidrofílicas de uso diario por parte de *A. niger* 2700, según su material de fabricación, medio de cultivo y días de incubación.

Tabla 10.- Resultados sobre la adhesión (adh.) de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario por *Aspergillus niger* 2700, cultivadas en suero fisiológico y medio de Sabouraud. Grados 0, 1, 2, 3: grados de adhesión.

DIAS	GRADOS	TEFILCON				SCAFILCON A			
		Suero Fisiol.		Medio Sab.		Suero Fisiol.		Medio Sab.	
		n	%	n	%	n	%	n	%
3	0	24	60.00	8	20.00	16	40.00	12	30.00
	1	16	40.00	30	75.00	23	57.50	14	35.00
	2	0	0	2	5.00	1	2.50	9	22.50
	3	0	0	0	0	0	0	5	12.50
	no adh.	24	60.00	8	20.00	16	40.00	12	30.00
	adh.tot.	16	40.00	32	80.00	24	60.00	28	70.00
7	0	19	47.50	7	17.50	14	35.00	0	0
	1	21	52.50	22	55.00	21	52.50	10	25.00
	2	0	0	7	17.50	5	12.50	13	32.50
	3	0	0	4	10.00	0	0	17	42.50
	no adh.	19	47.50	7	17.50	14	35.00	0	0
	adh.tot.	21	52.50	33	82.50	26	65.00	40	100
14	0	8	20.00	0	0	5	12.50	0	0
	1	32	80.00	5	12.50	12	30.00	0	0
	2	0	0	26	65.00	23	57.50	8	20.00
	3	0	0	9	22.50	0	0	32	80.00
	no adh.	8	20.00	0	0	5	12.50	0	0
	adh.tot.	32	80.00	40	100	35	87.50	40	100
21	0	6	15.00	0	0	2	5.00	0	0
	1	34	85.00	3	7.50	8	20.00	0	0
	2	0	0	25	62.50	30	75.00	5	12.50
	3	0	0	12	30.00	0	0	35	87.50
	no adh.	6	15.00	0	0	2	5.00	0	0
	adh.tot.	34	85.00	40	100	38	95.00	40	100
TOTAL	no adh.	57	35.62	15	9.37	37	23.12	12	7.50
	adh.	103	64.38	145	90.63	123	76.88	148	92.50

Tabla 10. (Continuación).

DIAS	GRADOS	BUFILCON A				VIFILCON A			
		Suero Fisiol.		Medio Sab.		Suero Fisiol.		Medio Sab.	
		n	%	n	%	n	%	n	%
3	0	19	47.50	9	22.50	10	25.00	2	5.00
	1	17	42.50	21	52.50	24	60.00	21	52.50
	2	4	10.00	10	25.00	6	15.00	17	42.50
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no adh. adh.tot.	19 21	47.50 52.50	9 31	22.50 77.50	10 30	25.00 75.00	2 38	5.00 95.00
7	0	10	25.00	1	2.50	3	7.50	0	0
	1	20	50.00	12	30.00	17	42.50	0	0
	2	10	25.00	26	65.00	20	50.00	12	30.00
	3	0	0	1	2.50	0	0	28	70.00
	no adh. adh.tot.	10 30	25.00 75.00	1 39	2.50 97.50	3 37	7.50 92.50	0 40	0 100
14	0	7	17.50	1	2.50	2	5.00	0	0
	1	25	62.50	4	10.00	16	40.00	0	0
	2	8	20.00	26	65.00	22	55.00	20	50.00
	3	0	0	9	22.50	0	0	20	50.00
	no adh. adh.tot.	7 33	17.50 82.50	1 39	2.50 97.50	2 38	5.00 95.00	0 40	0 100
21	0	3	7.50	0	0	2	5.00	0	0
	1	28	70.00	7	17.50	7	17.50	0	0
	2	9	22.50	31	77.50	29	72.50	7	17.50
	3	0	0	2	5.00	2	5.00	33	82.50
	no adh. adh.tot.	3 37	7.50 92.50	0 40	0 100	2 38	5.00 95.00	0 40	0 100
TOTAL	no adh.	0		11		17		2	
	adh.	1-3	121	72.63	149	93.13	143	89.38	158

Tabla 11.- Resultados sobre la invasión (inv.) de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario por *Aspergillus niger* 2700, cultivadas en suero fisiológico y medio de Sabouraud. Grados 0, 1, 2, 3: grados de invasión.

DIAS	GRADOS	TEFILCON				SCAFILCON A			
		Suero Fisiol.		Medio Sab.		Suero Fisiol.		Medio Sab.	
		n	%	n	%	n	%	n	%
3	0	40	100	35	87.50	35	87.50	24	60.00
	1	0	0	5	12.50	5	12.50	12	30.00
	2	0	0	0	0	0	0	4	10.00
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv.	40	100	35	87.50	35	87.50	24	60.00
	inv.tot.	0	0	5	12.50	5	12.50	16	40.00
7	0	30	75.00	21	52.50	21	52.50	8	20.00
	1	10	25.00	14	35.00	16	40.00	10	25.00
	2	0	0	5	12.5	3	7.50	16	40.00
	3	0	0	0	0	0	0	6	15.00
	no inv.	30	75.00	21	52.50	21	52.50	8	20.00
	inv.tot.	10	25.00	19	47.50	19	47.50	32	80.00
14	0	14	35.00	0	0	12	30.00	0	0
	1	26	65.00	30	75.00	7	17.50	0	0
	2	0	0	10	25.00	21	52.50	21	52.50
	3	0	0	0	0	0	0	19	47.50
	no inv.	14	35.00	0	0	12	30.00	0	0
	inv.tot.	26	65.00	40	100	28	70.00	40	100
21	0	12	30.00	0	0	9	22.50	0	0
	1	28	70.00	27	67.50	3	7.50	0	0
	2	0	0	13	32.50	28	70.00	17	42.50
	3	0	0	0	0	0	0	23	57.50
	no inv.	12	30.00	0	0	9	22.50	0	0
	inv.tot.	28	70.00	40	100	31	77.50	40	100
TOTAL	no inv.	96	60.00	56	35.00	77	48.12	32	20.00
	inv.	64	40.00	104	65.00	83	51.88	128	80.00

Tabla 11. (Continuación).

DIAS	GRADOS	BUFILCON A				VIFILCON A			
		Suero Fisiol.		Medio Sab.		Suero Fisiol.		Medio Sab.	
		n	%	n	%	n	%	n	%
3	0	32	80.00	23	57.50	19	47.50	10	25.00
	1	8	20.00	17	42.50	21	52.50	30	75.00
	2	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	no inv.	32	80.00	23	57.50	19	47.50	10	25.00
	inv.tot.	8	20.00	17	42.50	21	52.50	30	75.00
7	0	19	47.50	10	25.00	6	15.00	0	0
	1	20	50.00	29	72.50	19	47.50	9	22.50
	2	1	2.50	1	2.50	15	37.50	15	37.50
	3	0	0	0	0	0	0	16	40.00
	no inv.	19	47.50	10	25.00	6	15.00	0	0
	inv.tot.	21	52.50	30	75.00	34	85.00	40	100
14	0	13	32.50	7	17.50	3	7.50	0	0
	1	25	62.50	31	77.50	17	42.50	8	20.00
	2	2	5.00	2	5.00	20	50.00	15	37.50
	3	0	0	0	0	0	0	17	42.50
	no inv.	13	32.50	7	17.50	3	7.50	0	0
	inv.tot.	27	67.50	33	82.50	37	92.50	40	100
21	0	9	22.50	0	0	3	7.50	0	0
	1	3	7.50	36	90.00	10	25.00	2	5.00
	2	28	70.00	4	10.00	27	67.50	17	42.50
	3	0	0	0	0	0	0	21	52.50
	no inv.	9	22.50	0	0	3	7.50	0	0
	inv.tot.	31	77.50	40	100	37	92.50	40	100
TOTAL	no inv.	73	45.62	40	25.00	30	18.75	10	6.25
	inv.	87	54.38	120	75.00	130	81.25	150	93.75

Colonización según el material de las lentes

El análisis de las lentes a ojo desnudo permitió determinar que los polímeros con mayor contenido hídrico (scafilcon A y vifilcon A) adoptaron, en general, una coloración parda cuando se cultivaron con caldo de Sabouraud y *A. niger*.

Adhesión

Las diferencias en las frecuencias de adhesión entre los cuatro materiales de las lentes de contacto hidrofílicas analizados fueron significativas, para ambos medios y para todos los días de incubación (tabla 12). Cabe asumir, por tanto, que el grado de adhesión de las hifas es dependiente del tipo de material de las lentes, independientemente del medio de cultivo empleado y de los días de incubación.

La totalidad de las lentes fabricadas con los distintos materiales tenían hifas adheridas a su superficie al final del periodo de estudio al ser cultivadas con ambos medios (figura 23). En los cultivos con suero fisiológico, la menor adhesión se produjo, en general, en el tefilcon independientemente del día de incubación considerado (figura 23) Este polímero fue el único que mostró siempre, a lo largo del periodo de estudio, una densidad de hifas débil. El resto de materiales alcanzaron como máximo un grado de adhesión 2 mostrando el bufilcon A menores frecuencias para estas densidades a partir del séptimo día de incubación (figura 23). Atendiendo a los valores generales (figura 24) se registró un notable solapamiento de los intervalos de confianza en las frecuencias de adhesión, si bien considerando los grados de manera aislada y especialmente a 14 y 21 días de incubación, se registró una imbricación más que notable entre el scafilcon A y el vifilcon A (figura 24). En el dendograma correspondiente, los polímeros con mayor contenido hídrico (scafilcon A y vifilcon A) quedan claramente separados del cluster formado por el tefilcon y el bufilcon A (figura 21).

Tabla 12.- Resultados de las comparaciones estadísticas χ^2 ; (grados de libertad), nivel de significación- efectuados para determinar la relación entre el tipo de material de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario y el grado de adhesión (ADH.) y de invasión (INV.) de *Aspergillus niger* 2700, según el medio de cultivo y los días de incubación.

	DIAS	SUERO FISIOLÓGICO	MEDIO SABOURAUD
ADH.	3	16.7292; (6), $p < 0.05$	39.7012; (9), $p < 0.001$
	7	37.4573; (6), $p < 0.001$	89.9680; (9), $p < 0.001$
	14	43.5247; (6), $p < 0.001$	43.6508; (9), $p < 0.001$
	21	78.1335; (9), $p < 0.001$	80.9446; (6), $p < 0.001$
INV.	3	36.0037; (3), $p < 0.001$	38.2751; (6), $p < 0.001$
	7	49.6858; (6), $p < 0.001$	88.5336; (9), $p < 0.001$
	14	55.3513; (6), $p < 0.001$	115.9800; (9), $p < 0.001$
	21	70.8806; (6), $p < 0.001$	112.8865; (6), $p < 0.001$

El 100% de las lentes de scafilcon A y vifilcon A tenían ya hifas adheridas a los 7 días de cultivo con caldo de Sabouraud (figuras 4.2.3.-4.2.5.); en los demás materiales incubados en dicho medio la adhesión fúngica a todas las lentes se alcanzó de manera paulatina (figuras 23 y 4.2.6.). Asimismo, el scafilcon A y el vifilcon A mostraron, frente a los demás materiales y de manera general para todos los días de incubación en Sabouraud, una mayor densidad de hifas adheridas (figura 23). Los intervalos de confianza de las frecuencias de adhesión indican que, de manera general, el tefilcon y el bufilcon A, por un lado, y el scafilcon A y el vifilcon A, por otro, mostraron un comportamiento semejante frente a la adhesión de *A. niger* (figura 25). Al igual que en los cultivos con suero

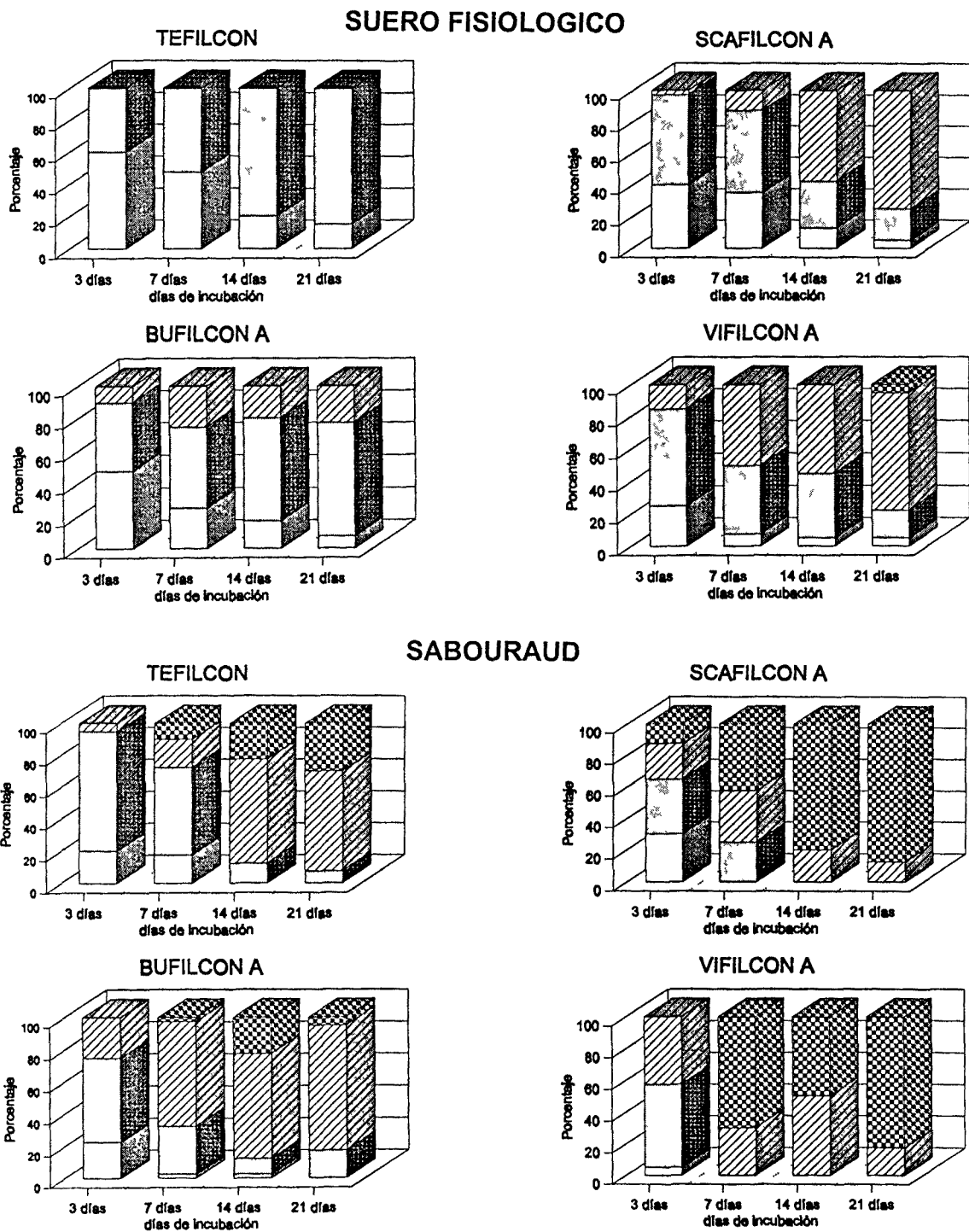


Figura 23.- Resultados sobre la adhesión de *Aspergillus niger* 2700 a lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario. Grado de adhesión 0: blanco; grado 1: punteado; grado 2: rayado; grado 3: cuadrículado.

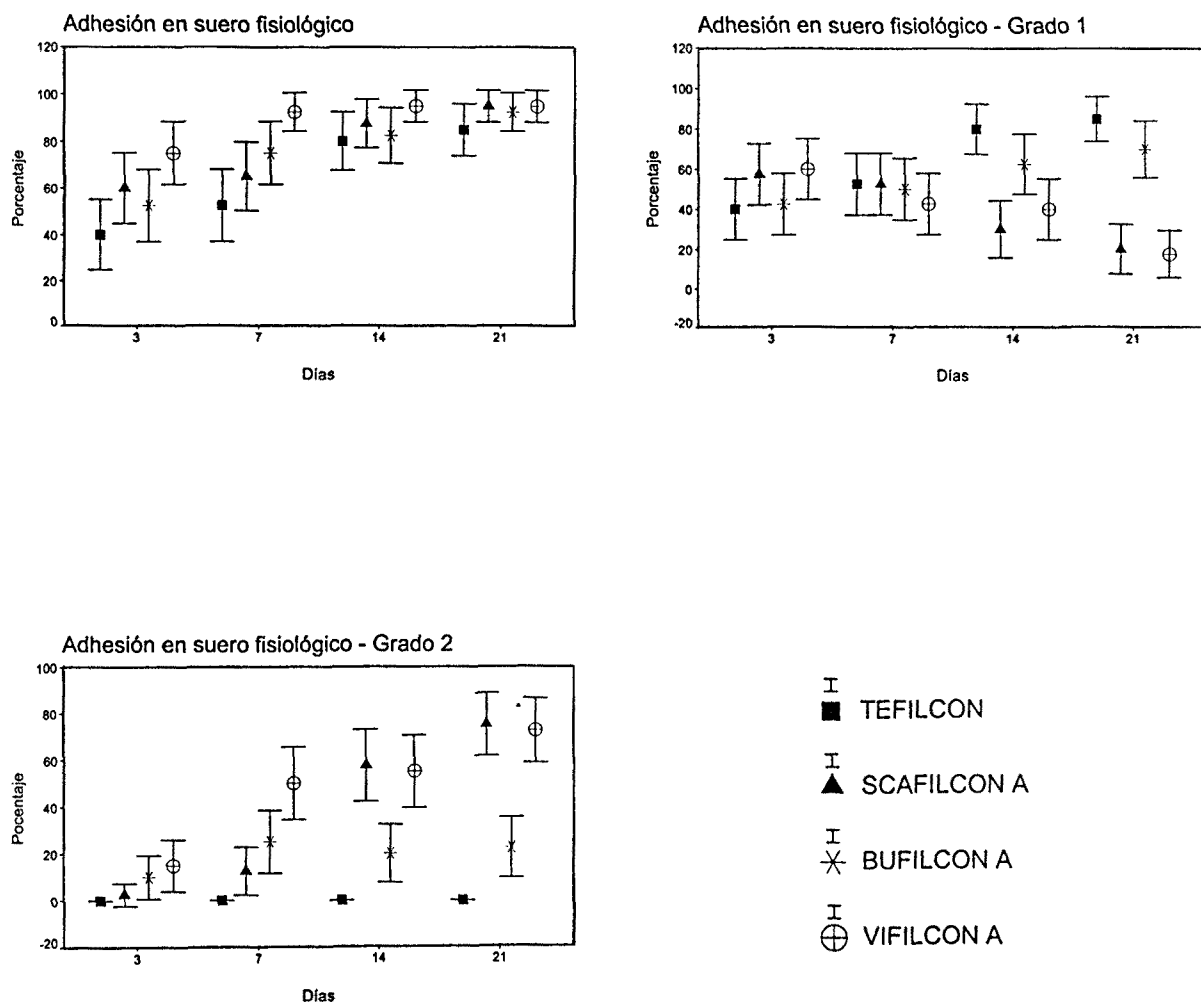


Figura 24.- Variación, a lo largo de los distintos periodos de incubación, de los porcentajes e intervalos de confianza (95%) correspondientes a la adhesión de *Aspergillus niger* 2700 en cada uno de los materiales considerados, al ser cultivados con suero fisiológico.

fisiológico, estas asociaciones quedaron también patentes en el análisis de conglomerados efectuado (figura 21).

Invasión.

Los resultados de invasión de las lentes por hifas fúngicas fueron parecidos a los de adhesión acabados de exponer. Así, también se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.001$) en todas las condiciones de cultivo (tabla 12). De este modo, cabe admitir también que el material de fabricación de las lentes influye sobre el grado de invasión de las hifas de *A. niger*, independientemente del medio de cultivo y los días de incubación.

En suero fisiológico, el tefilcon no mostró hifas internas hasta el séptimo día de cultivo y, a su vez, fue el que presentó menores valores porcentuales de lentes con micelio interno en cada uno de los días de incubación (figura 26 y 4.2.7.). Asimismo, la densidad de hifas invasoras no pasó de ser débil (figura 26). Por el contrario, el vifilcon A fue el material que mostró, en términos generales, mayores porcentajes de hifas invasoras, así como una mayor densidad de las mismas (figura 4.2.8.). Los intervalos de confianza de las frecuencias obtenidas en suero fisiológico ponen de relieve el comportamiento claramente distinto que, de manera general, presentaron el tefilcon y el vifilcon A (figura 27). Esta pauta se confirmó en el análisis cluster correspondiente, de manera que el tefilcon se separó del conglomerado formado por los restantes polímeros; dentro de ellos, el vifilcon A quedó separado del cluster formado por el scafilcon A y el bufilcon A (figura 21).

La incubación de las lentes de vifilcon A con medio de Sabouraud permitió la invasión de todas ellas desde el séptimo día de cultivo. Los restantes materiales lo consiguieron a los 14 (tefilcon y scafilcon A) ó 21 (bufilcon A) días de incubación (figura 26). No obstante, las mayores diferencias entre los polímeros se registraron en los porcentajes correspondientes a los distintos grados de invasión (figura 26). En este sentido, los únicos polímeros que

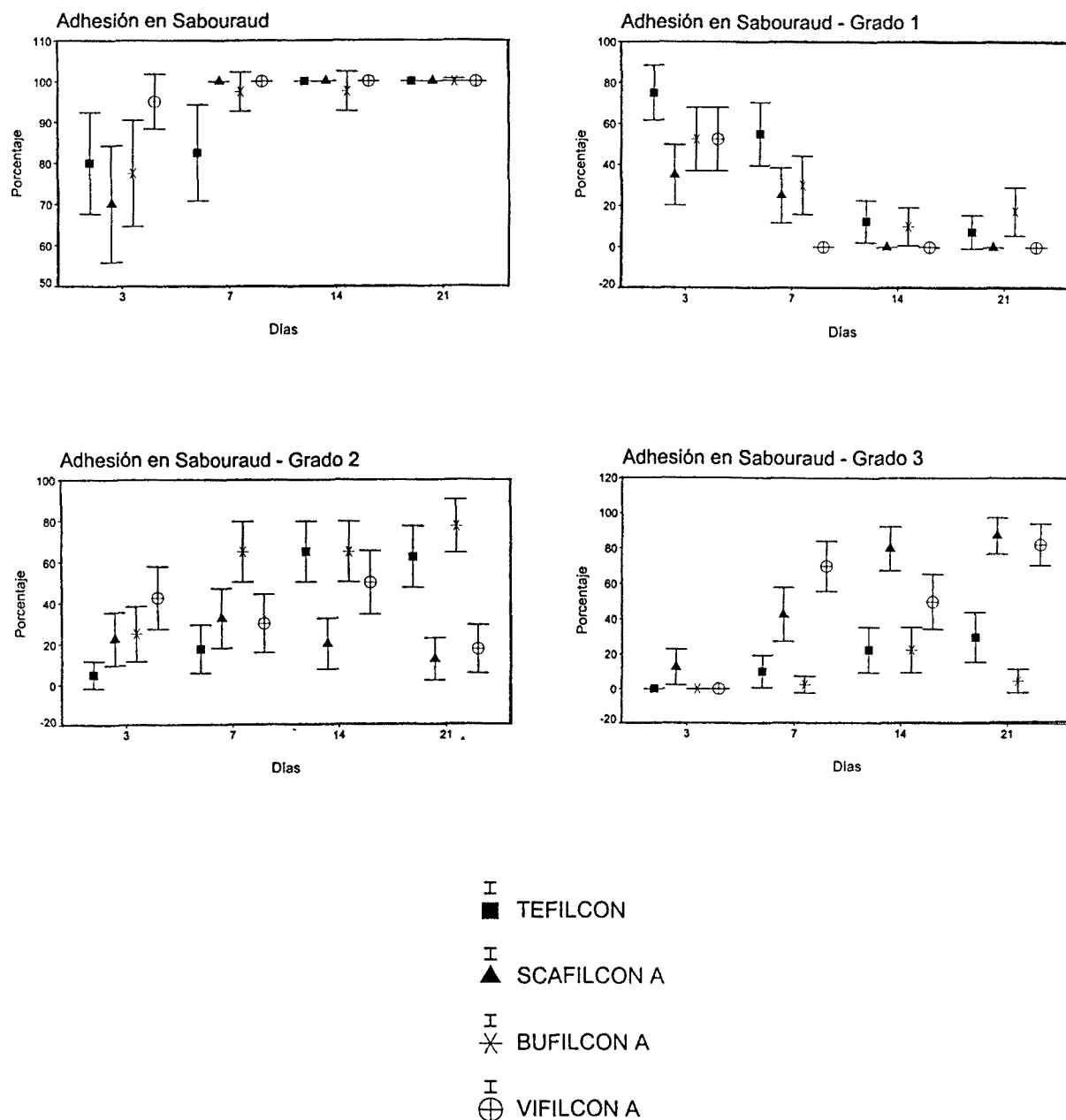


Figura 25.- Variación, a lo largo de los distintos periodos de incubación, de los porcentajes e intervalos de confianza (95%) correspondientes a la adhesión de *Aspergillus niger* 2700 en cada uno de los materiales considerados, al ser cultivados en medio de Sabouraud.

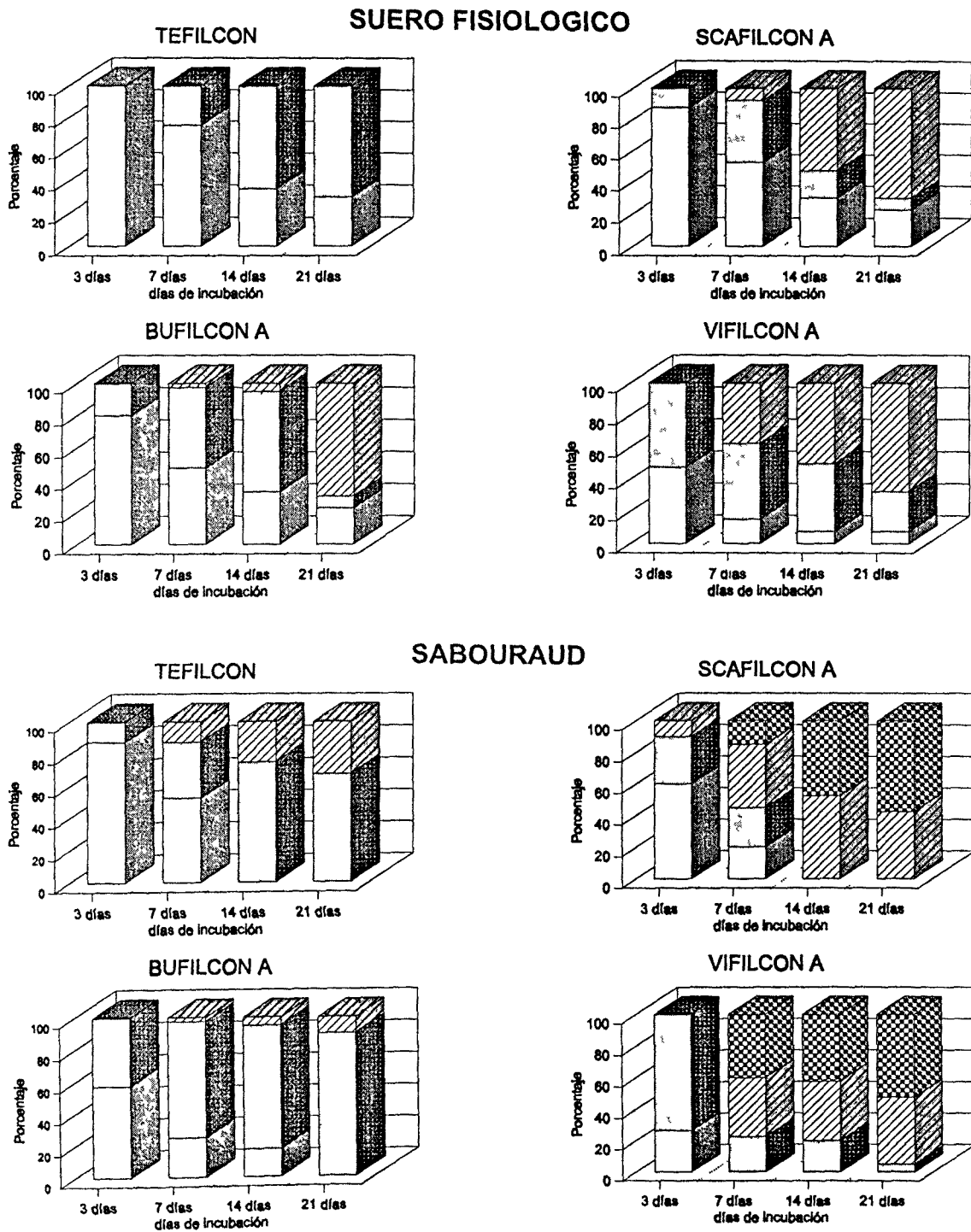


Figura 26.- Resultados sobre la invasión de *Aspergillus niger* 2700 a lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario. Grado de invasión 0: blanco; grado 1: punteado; grado 2: rayado; grado 3: cuadriculado.

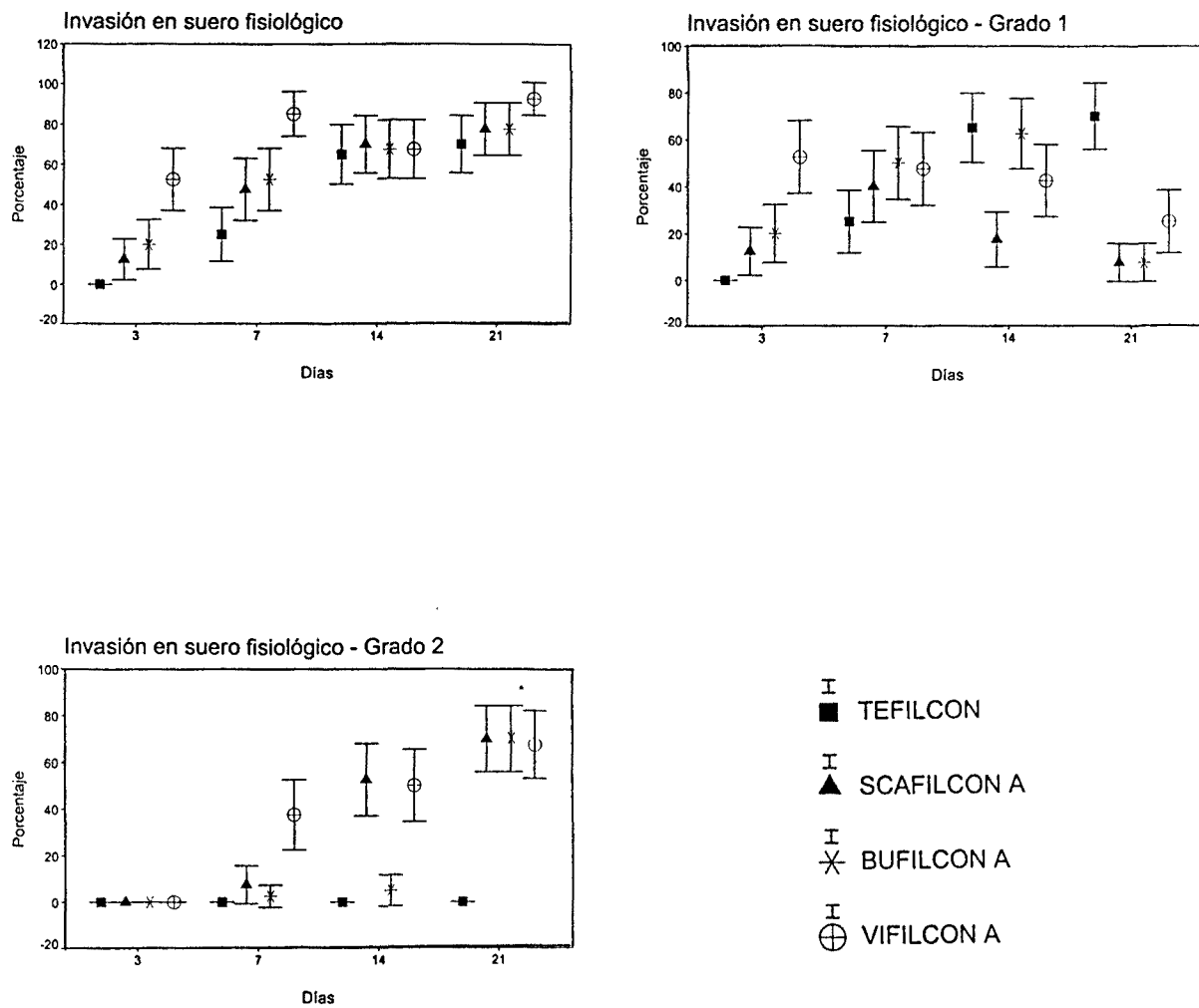


Figura 27.- Variación, a lo largo de los distintos periodos de incubación, de los porcentajes e intervalos de confianza (95%) correspondientes a la invasión de *Aspergillus niger* 2700 en cada uno de los materiales considerados, al ser cultivados en suero fisiológico.

manifestaron una invasión elevada, fueron el scafilcon A (figura 4.2.9.) y el vifilcon A (figuras 4.2.10. y 4.2.11.), es decir, los que poseen un contenido hídrico superior al 50%. En términos generales, el scafilcon A y el vifilcon A mostraron mayor solapamiento en los intervalos de confianza, especialmente al atender a los grados 3 y 4 (figura 28). El dendograma correspondiente puso de manifiesto el comportamiento distinto del bufilcon, claramente separado del cluster formado por los demás polímeros; dentro de este grupo el tefilcon se separó del cluster formado por el scafilcon A y el vifilcon A (figura 21).

La observación de las lentes con microscopía óptica permitió indicar que morfológicamente las hifas del hongo invasor adoptaron una disposición helicoidal en la matriz del polímero. Según el tipo de material y el medio de cultivo utilizado en su incubación, los filamentos internos, de extremos afilados, tenían un diámetro variable y su grado de ramificación estuvo más o menos patente (véase apartado 4.2.1.3.2.). No obstante formaron, en general, colonias compactas.

Colonización según el medio de cultivo utilizado en la incubación

Al igual que en el cultivo de las lentes hidrofílicas de uso continuado, el análisis macroscópico del hongo en cada periodo de incubación permitió observar grandes diferencias morfológicas según el medio utilizado. Las gruesas colonias con una alta densidad de conidios negros en su superficie que se observaron abundantemente en los cultivos con caldo de Sabouraud, no se apreciaron con el suero fisiológico. En este caso, las esporas asexuales permanecían en el fondo de las cámaras de incubación. El análisis microscópico del hongo efectuado previamente a la revisión de las lentes permitió apreciar que, de los dos medios utilizados, el cultivo con Sabouraud originó un mayor número y desarrollo de las hifas de *A. niger*. No obstante, si macroscópicamente el desarrollo de las colonias fue incompleto y los conidios maduros no estaban presentes, el micelio no se adhirió a la superficie de los polímeros y, en

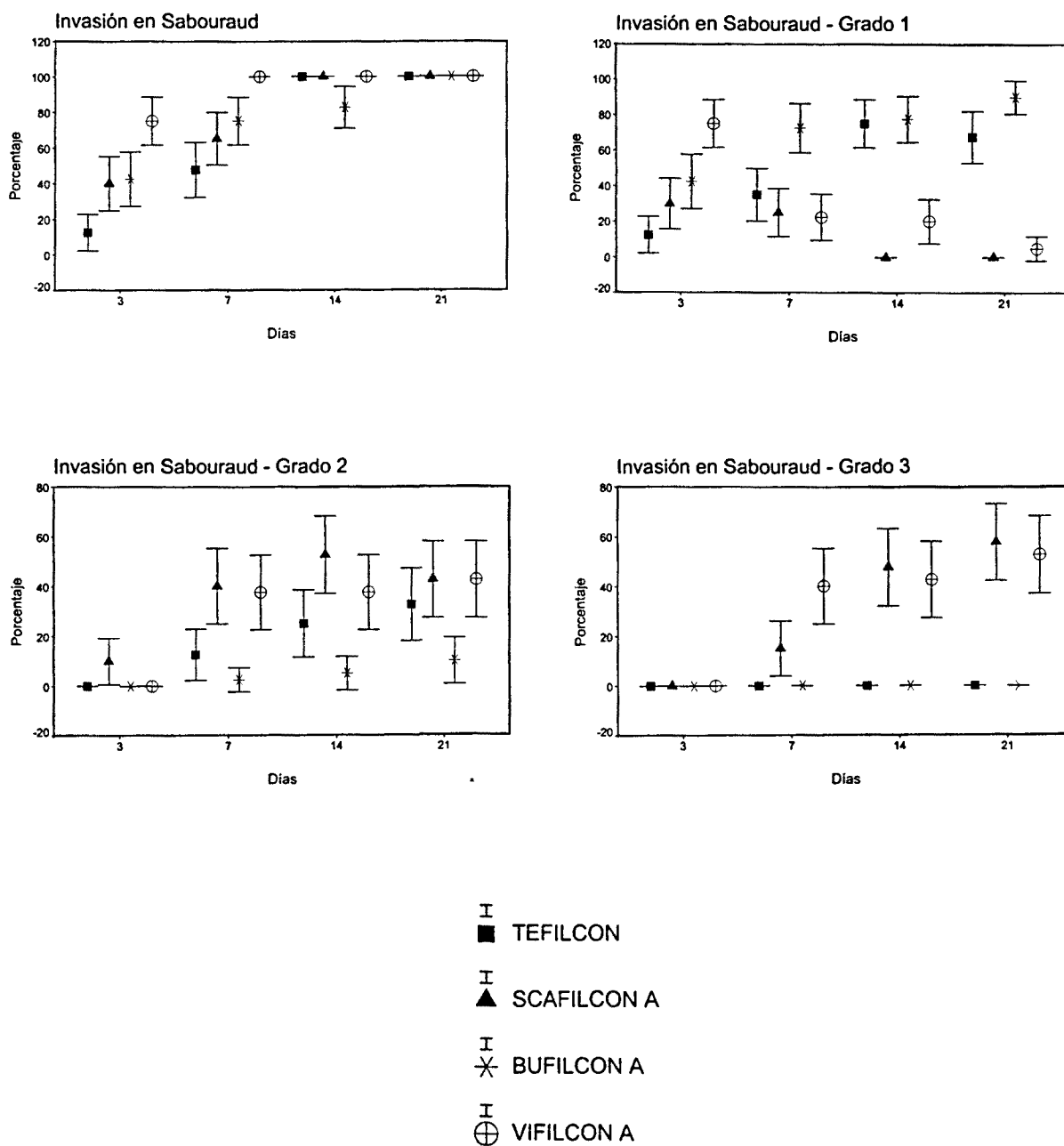


Figura 28.- Variación, a lo largo de los distintos periodos de incubación, de los porcentajes e intervalos de confianza (95%) correspondientes a la invasión de *Aspergillus niger* 2700 en cada uno de los materiales considerados, al ser cultivados en medio de Sabouraud.

consecuencia, no tuvo lugar su invasión.

Se determinó el valor del pH de los medios de cultivo utilizados y se comprobó que sus variaciones fueron mínimas a lo largo del periodo de estudio, aunque con tendencia a la acidificación. El pH del suero fisiológico osciló entre 5.0 y 5.5 y el del caldo de Sabouraud entre 4.5 y 5.5. Con ambos medios, los valores más bajos correspondieron en general a los cultivos de las lentes de vifilcon A y los más altos a las de tefilcon.

Adhesión

Las comparaciones estadísticas entre los dos medios de cultivo utilizados en relación al grado de adhesión de *A. niger* (tabla 13) revelaron la existencia de diferencias significativas independientemente del polímero y de los días de incubación. Por tanto, puede afirmarse que el medio de cultivo influye en la adhesión de *A. niger*, siendo ésta siempre significativamente más importante en caldo de Sabouraud que en suero fisiológico (figuras 23, 4.2.3.- 4.2.6.). Mientras en los cultivos con suero fisiológico el grado máximo de adhesión registrado fue el 2, en el Sabouraud líquido el micelio adherido mostró una densidad débil, media o elevada según los días de incubación y el material empleado (figura 23).

Invasión

Salvo en el cultivo con bufilcon A a los 7 y 14 días, las diferencias en las frecuencias de invasión entre ambos medios de cultivo fueron siempre significativas (tabla 13). En consecuencia, cabe asumir que, en términos generales, el tipo de medio de cultivo influye sobre la invasión de *A. niger*, siendo mayor en el Sabouraud líquido que en el suero fisiológico (figura 26). Ningún material consiguió que el 100% de las lentes presentara hifas internas cuando se incubaron con suero fisiológico ni manifestó una densidad elevada de hifas colonizadoras. Por el contrario, en la incubación con medio de Sabouraud la

Tabla 13.- Resultados de las comparaciones estadísticas χ^2 ; (grados de libertad), nivel de significación- efectuadas para determinar la relación entre los medios de cultivo utilizados en la incubación de los diferentes grupos de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario y la adhesión (ADH.) e invasión (INV.) de *Aspergillus niger* 2700 a lo largo del periodo de estudio. n.s.: diferencias no significativas.

	DIAS	TEFILCON	SCAFILCON A	BUFILCON A	VIFILCON A
ADH.	3	14.2608; (2), p<0.001	14.1606; (3), p<0.01	6.5639; (2), p<0.05	10.7942; (2), p<0.01
	7	16.5617; (3), p<0.001	38.4588; (3), p<0.001	17.4747; (3), p<0.001	50.0000; (3), p<0.001
	14	62.7027; (3), p<0.001	56.2581; (3), p<0.001	38.2363; (3), p<0.001	38.0952; (3), p<0.001
INV.	21	68.9730; (3), p<0.001	62.8571; (3), p<0.001	29.7000; (3), p<0.001	49.9016; (3), p<0.001
	3	5.3333; (1), p<0.05	8.9332; (2), p<0.05	4.7127; (2), p<0.05	4.3813; (1), p<0.05
	7	7.2549; (2), p<0.05	22.1069; (3), p<0.001	4.4462; (2), n.s.	25.5714; (3), p<0.001
	14	24.2857; (2), p<0.001	38.0000; (3), p<0.001	2.4429; (2), n.s.	23.9543; (3), p<0.001
	21	25.0182; (2), p<0.001	37.6889; (3), p<0.001	54.9231; (2), p<0.001	31.6061; (3), p<0.001

densidad del micelio invasor llegó a alcanzar el valor 3, aunque únicamente con el scafilcon A y el vifilcon A a partir del séptimo día de incubación (figura 26).

Colonización según los días de incubación

Adhesión

Las frecuencias de adhesión del micelio de *A. niger* a los distintos materiales aumentó de forma significativa a lo largo del periodo de incubación, independientemente del tipo de polímero y del medio de cultivo (tabla 14). Cabe recordar además, que la adhesión en líquido de Sabouraud fue en todas las condiciones de cultivo significativamente mayor que al emplear suero fisiológico (figura 23).

Todos los materiales presentaron los porcentajes más bajos de lentes con hifas adheridas a los 3 días de cultivo, independientemente del medio. Utilizando el suero fisiológico como medio de incubación, incluso a los 21 días de cultivo, siempre existió un porcentaje de lentes que no fueron invadidas por el hongo (figura 23). En caldo de Sabouraud, todas las lentes de scafilcon A y de vifilcon A tuvieron micelio adherido a los 7 días de incubación, mientras que en los cultivos de las lentes de tefilcon y de bufilcon A esta situación no se produjo hasta los 21 días (figura 23).

Invasión

Al igual que en el caso de la adhesión, las frecuencias de invasión aumentaron siempre de manera significativa ($p < 0.001$) con los días de incubación (tabla 14). En los cultivos con suero fisiológico nunca se dió la circunstancia de que todas las lentes fueran invadidas por *A. niger* (figura 26).

Por el contrario, con el caldo de Sabouraud a los 14 días de cultivo, el 100% de las lentes de tefilcon, scafilcon A y vifilcon A ya tenían hifas internas mientras que en el caso del bufilcon A esta situación no se dió hasta el final del periodo de incubación. Cabe indicar, asimismo, que la morfología y el tamaño de las hifas internas se modificó a lo largo del periodo de estudio, independientemente del material colonizado (figuras 4.2.12.- 4.2.16.).

Tabla 14.- Resultados de las comparaciones estadísticas χ^2 ; (grados de libertad), nivel de significación- efectuadas para determinar la relación entre los días de incubación de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario y el grado de adhesión (ADH.) y de invasión (INV.) de *Aspergillus niger* 2700, según el medio de cultivo y el tipo de material.

	MATERIAL	SUERO FISIOLÓGICO	MEDIO SABOURAUD
ADH.	Tefilcon	24.5000; (3), p<0.001	93.4933; (9), p<0.001
	Scafilcon A	64.2690; (6), p<0.001	90.0570; (9), p<0.001
	Bufilecon A	31.5515; (6), p<0.001	61.7243; (9), p<0.001
	Vifilcon A	40.1349; (9), p<0.001	107.2469; (9), p<0.001
INV.	Tefilcon	55.8333; (3), p<0.001	98.3684; (6), p<0.001
	Scafilcon A	76.8988; (6), p<0.001	110.6337; (9), p<0.001
	Bufilecon A	109.8241; (6), p<0.001	39.6938; (6), p<0.001
	Vifilcon A	52.0077; (6), p<0.001	91.2479; (9), p<0.001

4.2.1.3. ESTUDIO COMPARADO DE LA COLONIZACION DE LENTES DE CONTACTO POR *Candida albicans* Y *Aspergillus niger*

4.2.1.3.1. LENTES DE USO CONTINUADO

Para el seguimiento de los comentarios expuestos en el presente apartado valga recordar que en las tablas 4 y 9 se relacionan los resultados sobre la adhesión y la invasión de las lentes de contacto hidrofílicas de uso continuado por *C. albicans* y *A. niger*, cultivadas en suero fisiológico, caldo de Sabouraud y lágrima sintética, en cámaras de incubación y viales.

Colonización según el medio de cultivo y lugar de incubación

Adhesión

Las comparaciones entre las frecuencias de adhesión de *C. albicans* y *A. niger* a las lentes hidrofílicas nuevas de uso continuado al ser cultivadas con suero fisiológico, indicaron la existencia de diferencias significativas sólo cuando la incubación se realizó en cámara ($\chi^2 = 4.2105$, g.l. = 1, $p < 0.05$); de hecho, únicamente se registró una cierta adhesión (grado 1) en los cultivos del hongo filamentoso en cámara (figura 18). En medio de Sabouraud, *C. albicans* mostró frecuencias significativamente superiores que *A. niger*, tanto en cámara ($\chi^2 = 9.4233$, g.l. = 2, $p < 0.01$) como en vial ($\chi^2 = 5.5411$, g.l. = 1, $p < 0.05$), apareciendo la mayor adhesión (en frecuencia y en densidad) en los cultivos de la levadura efectuados en cámara (figura 18).

En los cultivos con lágrima sintética, las diferencias interespecíficas fueron estadísticamente significativas tanto en cámara ($\chi^2 = 14.0168$, g.l. = 2, $p < 0.001$) como en vial ($\chi^2 = 5.0000$, g.l. = 1, $p < 0.05$). En ambos casos, los mayores

porcentajes de adhesión y la mayor densidad de hifas se observaron en los cultivos de *A. niger* registrándose los valores máximos en la incubación en cámara (figura 18).

Invasión

En cuanto al grado de invasión en suero fisiológico, se detectaron diferencias interespecíficas de carácter significativo únicamente cuando se incubó el polímero en cámara ($\chi^2 = 4.2105$, g.l. = 1, $p < 0.05$); solamente se apreció una cierta invasión (grado 1) en la incubación de *A. niger* en cámara (figura 18).

En el cultivo de las lentes con caldo de Sabouraud, las diferencias entre ambas especies únicamente fueron significativas en el caso de las incubaciones realizadas en cámaras de incubación ($\chi^2 = 6.5411$, g.l. = 2, $p < 0.05$), apareciendo un mayor porcentaje de invasión y de densidad de hifas (grado 2) en el caso de *A. niger* (figura 18).

En los cultivos con lágrima sintética solamente aparecieron hifas internas cuando el cultivo se efectuó con *A. niger* en cámara, si bien la densidad tan sólo fue débil; respecto a *C. albicans* fueron en este caso significativas ($\chi^2 = 5.3333$, g.l. = 1, $p < 0.05$).

4.2.1.3.2. LENTES DE USO DIARIO

Colonización con suero fisiológico

Adhesión

Las comparaciones interespecíficas de las frecuencias de adhesión de los

filamentos fúngicos a los diferentes polímeros de las lentes incubadas con suero fisiológico revelaron, en todos los casos, la existencia de diferencias significativas (tabla 15). De aquí se desprende que bajo dichas condiciones, la adhesión fúngica en los distintos materiales considerados, varía en función de la especie colonizadora. Según puede apreciarse en las figuras 19 y 23 (véase también las tablas 5 y 10) mientras *C. albicans* únicamente se adhirió al scafilcon A y al vifilcon A, *A. niger* lo hizo a todos los polímeros y en un porcentaje de lentes siempre notablemente superior. Además, por lo que respecta al grado de adhesión, la densidad máxima de hifas/pseudohifas adheridas a las lentes alcanzó tan sólo el valor 1 (tanto en el scafilcon A como en el vifilcon A) en el caso de la levadura y el grado 3 en tres (scafilcon A, bufilcon A y vifilcon A) de los cuatro materiales considerados (figuras 19 y 23).

Invasión

Las diferencias interespecíficas en relación a la invasión fúngica en los distintos materiales tras su incubación en suero fisiológico fueron siempre de carácter significativo, hecha únicamente la excepción de los cultivos de 3 días de las lentes de tefilcon (tabla 15). Por tanto, el número de lentes invadidas y la densidad de hifas depende en la inmensa mayoría de los casos de la especie invasora. Así, mientras *C. albicans* no consiguió colonizar ninguno de los polímeros analizados, *A. niger* invadió, salvo la excepción comentada, los cuatro materiales aunque con una notable variabilidad en cuanto a la densidad de hifas y a los porcentajes de lentes invadidas (tablas 6 y 11, figuras 22 y 26). Tras los 21 días de incubación la densidad máxima fue de grado 2 en todos los materiales menos en el tefilcon, que sólo llegó hasta el valor 1 (figura 26).

Por otra parte, valga indicar que el tamaño de las colonias internas de las lentes y el diámetro de las hifas en ambas especies en cada periodo de incubación varió en función del medio de cultivo y del material de las lentes. Concretamente, la utilización del suero fisiológico condujo a la formación de colonias de *C. albicans* que no sobrepasaron los 3.0 μm en los materiales de

Tabla 15.- Resultados de las comparaciones estadísticas χ^2 ; (grados de libertad), nivel de significación- efectuadas entre *Candida albicans* 93150 y *Aspergillus niger* 2700 para analizar la adhesión (ADH.) e invasión (INV.) de los diferentes grupos de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario al ser cultivadas en suero fisiológico. n.s.: diferencias no significativas.

	DIAS	TEFILCON	SCAFILCON A	BUFILCON A	VIFILCON A
ADH.	3	20.0000; (1), p<0.001	27.6030; (2), p<0.001	28.4746; (2), p<0.001	20.0850; (2), p<0.001
	7	28.4746; (1), p<0.001	23.8461; (2), p<0.001	48.0000; (2), p<0.001	42.4107; (2), p<0.001
	14	53.3333; (1), p<0.001	48.3823; (2), p<0.001	56.1702; (2), p<0.001	45.1048; (2), p<0.001
INV.	21	59.1304; (1), p<0.001	57.5238; (2), p<0.001	68.8372; (2), p<0.001	54.8491; (3), p<0.001
	3	0; n.s.	5.3333; (1), p<0.05	8.8889; (1), p<0.001	28.4746; (1), p<0.001
	7	11.4286; (1), p<0.001	24.9180; (2), p<0.001	28.4746; (2), p<0.001	59.1304; (2), p<0.001
INV.	14	38.5185; (1), p<0.001	43.0769; (2), p<0.001	40.7547; (2), p<0.001	68.8372; (2), p<0.001
	21	43.0769; (1), p<0.001	50.6122; (2), p<0.001	50.6122; (2), p<0.001	68.8372; (2), p<0.001

mayor hidrofilia y los 2.0 μm en los de menor contenido acuoso. La levadura no formó colonias compactas sino simples filamentos que penetraron en determinadas zonas de la superficie de las lentes y que posteriormente se extendieron por la matriz con escasas ramificaciones. Asimismo, el diámetro máximo de sus hifas/pseudohifas internas, después de 21 días de cultivo, fue de 2.0 μm en los materiales con mayor contenido hídrico, no superando los 1.5 μm en aquellos cuyo contenido acuoso fue inferior al 50%.

Las colonias de *A. niger* y el diámetro de sus hifas invasoras fueron siempre mayores que los de *C. albicans*. Tras 21 días de incubación, en los polímeros más hidratados las colonias internas alcanzaron hasta 200 μm y las hifas diámetros máximos de 3.5 μm ; en los de menor porcentaje hídrico las colonias alcanzaron como máximo los 150 μm , mostrando diámetros de hasta 3.0 μm .

Colonización con medio líquido de Sabouraud

Adhesión

Las comparaciones interespecíficas en las frecuencias de adhesión en los distintos polímeros tras su incubación con líquido de Sabouraud indicaron la existencia de diferencias significativas en todos los casos considerados, excepto en los cultivos de 3 días de las lentes de bufilcon A y vifilcon A (tabla 16). En consecuencia, cabe admitir que, en términos generales, los cultivos en Sabouraud de *C. albicans* y de *A. niger* muestran pautas de adhesión significativamente distintas en cada uno de los materiales considerados.

Atendiendo a las frecuencias de adhesión, para cada polímero y cada periodo de incubación se registraron generalmente valores más elevados en los cultivos de *A. niger*. Por lo que respecta a la densidad de los filamentos fúngicos, se registró también un mayor grado de adhesión general del hongo filamentoso

en cada uno de los polímeros, especialmente a los 14 y 21 días de incubación; en *A. niger* se alcanzó frecuentemente el grado 3, mientras que en los cultivos de la levadura nunca se superó el grado 2 (figuras 19 y 23).

Invasión

Las comparaciones en relación al grado de invasión en los cultivos con Sabouraud líquido demostraron, al igual que en el caso de la adhesión, la existencia casi general de diferencias estadísticamente significativas (tabla 16); únicamente los cultivos de tefilcon y bufilcon A a los 3 días de incubación mostraron frecuencias semejantes. Por tanto, puede indicarse que generalmente, en las condiciones consideradas, la invasión varía notablemente según la especie fúngica utilizada en el cultivo de las lentes. De manera concreta valga indicar que para cada material y cada día de incubación, *A. niger* mostró siempre frecuencias de invasión más elevadas que *C. albicans* (tablas 6 y 11, figuras 22 y 26). Por otro lado, mientras en los cultivos la levadura las frecuencias de invasión permanecieron en cada material prácticamente constantes a lo largo del periodo de estudio, en el caso del hongo filamentoso existió siempre un incremento progresivo de los porcentajes de lentes invadidas. Asimismo, mientras la densidad de las hifas internas nunca fue superior al grado 1 en el cultivo de las lentes con la levadura, en la incubación del hongo filamentoso se llegó a alcanzar incluso el valor 3, concretamente durante la incubación del scafilcon A y el vifilcon A (figuras 22 y 26).

Al igual que en los cultivos con suero fisiológico, con el medio de Sabouraud, el tamaño de las colonias y el diámetro de las hifas internas en cada periodo de incubación estuvieron en función de la especie y del tipo de polímero. Dichos filamentos fueron siempre de menor magnitud en los cultivos de *C. albicans*. En concreto, mientras los filamentos de la levadura invasores de los materiales con mayor contenido hídrico tuvieron un diámetro de 2.5 μm al final del periodo de estudio, los de *A. niger* llegaron a alcanzar los 4.5 μm . Dichos valores fueron menores cuando los hongos invadieron las lentes de tefilcon y

Tabla 16.- Resultados de las comparaciones estadísticas χ^2 ; (grados de libertad), nivel de significación- efectuadas entre *Candida albicans* 93150 y *Aspergillus niger* 2700 para analizar la adhesión (ADH.) e invasión (INV.) de los diferentes grupos de lentes de contacto hidrofílicas nuevas de uso diario al ser cultivadas en medio de Sabouraud. n.s.: diferencias no significativas.

	DIAS	TEFILCON	SCAFILCON A	BUFILCON A	VIFILCON A
ADH.	3	24.7368; (2), p<0.001	14.0398; (3), p<0.01	5.1176; (2), n.s.	3.6615; (2), n.s.
	7	7.9556; (3), p<0.05	35.8120; (3), p<0.001	16.6571; (3), p<0.001	57.0435; (3), p<0.001
	14	56.0197; (3), p<0.001	69.3333; (3), p<0.001	36.5299; (3), p<0.001	50.0000; (3), p<0.001
	21	58.5714; (3), p<0.001	69.0909; (3), p<0.001	29.7000; (3), p<0.001	62.8889; (3), p<0.001
INV.	3	2.8829; (1), n.s.	12.1705; (2), p<0.01	3.6467; (1), n.s.	20.0000; (1), p<0.001
	7	12.7632; (2), p<0.01	37.7733; (3), p<0.001	18.3564; (2), p<0.001	59.4286; (3), p<0.001
	14	60.0000; (2), p<0.001	80.0000; (3), p<0.001	24.9682; (2), p<0.001	60.1905; (3), p<0.001
	21	60.3636; (2), p<0.001	80.0000; (3), p<0.001	48.6956; (2), p<0.001	73.1429; (3), p<0.001

bufilcon A (2.0 μm y 4.0 μm respectivamente). Asimismo, el tamaño medio de las colonias internas después de 21 días de incubación fue ostensiblemente mayor al cultivar las lentes de scafilcon y vifilcon A; mientras en estos polímeros se observaron valores de hasta 30 μm con *C. albicans* y 275 μm con *A. niger*, en los cultivos de las lentes de tefilcon y bufilcon A los máximos fueron de 20 μm y 225 μm , respectivamente. Con el objeto de cuantificar la penetración del hongo en el polímero se observaron también algunas lentes con microscopía confocal (véase apartado 3.2.1.2.8.).

4.2.1.4. ANALISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LAS LENTES DE CONTACTO

En este apartado se exponen los resultados obtenidos a partir de la observación mediante microscopía electrónica de barrido de las lentes de contacto hidrofílicas nuevas a las que se provocó la colonización de *Candida albicans* 93150 y de *Aspergillus niger* 2700 (véase apartado 3.2.). Dichos resultados son complementarios a las descripciones de la morfología del micelio invasor de ambos hongos realizados a partir de las observaciones efectuadas mediante microscopía óptica. El examen mediante microscopía electrónica de barrido de las lentes permitió observar el biodeterioro de su superficie cuando se produjo su colonización, así como comprobar las diferencias morfológicas entre las dos especies.

En los cultivos de *C. albicans*, se podían observar zonas de las lentes con abundantes blastoconidios formando grupos o aislados adheridos a la superficie (figura 4.2.17.) y otras con mayor abundancia de hifas y pseudohifas (figura 4.2.18.). En este caso, la disposición y morfología de las mismas siempre fue muy irregular y, en general, presentaron numerosas roturas. Cabe pensar que dicha alteración fue debida posiblemente a la acción mecánica a la que fueron sometidas las lentes durante su lavado antes de ser procesadas para su análisis mediante microscopía electrónica y/o al propio proceso de preparación para su

posterior observación. Los filamentos que en la figura 4.2.18. aparecen parcialmente rotos, podían ser superficiales o bien tratarse de fragmentos que se hallaban introducidos en la matriz de las lentes. Su diámetro fue variable, oscilando entre los 1.5 y 2 μm . Al igual que ocurrió con las lentes hidrofílicas procedentes de usuarios colonizadas por el género *Acremonium* (véase apartado 4.1.4.), se observaron también en *C. albicans* hifas internas rotas prácticamente a nivel de la superficie de las lentes (figura 4.2.19.) y que presentaban un elevado grado de alteración.

Por lo que respecta a *A. niger*, la observación de las lentes colonizadas permitió comprobar la presencia de hifas superficiales que cubrían zonas más o menos extensas de su superficie, con morfología similar a la de *Acremonium* sp (véase figura 4.1.26.). Su distribución fue más regular que la de *C. albicans*, aunque la mayoría de ellas también presentaron roturas, posiblemente debidas a las causas ya comentadas en el párrafo anterior. El diámetro de las hifas superficiales fue variable con valores medios de 4 μm . Rodeándolas quedaron patentes zonas con una densidad a los electrones distinta a la del propio micelio y a la de la superficie de las lentes, y que podían corresponder a la matriz extracelular o glucocálix liberada por el hongo. Numerosas hifas penetraron en la matriz del polímero quedando fuertemente asociadas a él, según se muestra en las figuras 4.2.20. y 4.2.21.

Estructuras helicoidales similares a las descritas en *Aureobasidium pullulans* (véase apartado 4.1.4.) también fueron observadas en algunas hifas superficiales de *A. niger* 2700. Su longitud osciló entre 1 y 1.5 μm , su diámetro medio fue algo superior (0.35 μm) y aparecían con muy poca frecuencia (figura 4.2.22.). La hélices estaban siempre asociadas a las hifas de las cuales parecían originarse y no se vieron nunca aisladas en el material. Procede indicar que las lentes colonizadas por *A. niger* no mostraron contaminación de tipo bacteriano.

4.2.2. LENES RIGIDAS PERMEABLES A LOS GASES

La colonización de las lentes rígidas permeables a los gases (véase apartado 1.1.1.1.) se analizó a partir de lentes acabadas y semiacabadas cultivadas durante 7 días en cámaras de incubación con caldo de Sabouraud y una concentración conocida de *Aspergillus niger* 2700 (véase apartado 3.2.2.).

Adhesión

No se detectaron diferencias significativas entre las lentes de contacto rígidas permeables a los gases acabadas y semiacabadas en relación a la densidad de hifas adheridas de *A. niger*. Así pues, cabe asumir que el pulido de los bordes de las lentes es independiente de la adhesión del hongo al polímero. Procede indicar que la observación microscópica de las lentes a 100 y 400 x fue altamente costosa dada la curvatura y rigidez de material, por tanto, entrañó una gran dificultad el enfoque de la zona central. No obstante, se puede afirmar que la adhesión de las hifas tuvo lugar principalmente por la periferia de las lentes. En todas las lentes se observó adhesión (tabla 17) y en ambos tipos de lentes la densidad máxima de hifas correspondió al grado 3 y la más frecuente, al grado 2 (tabla 17).

Deterioro

Ninguna de las lentes rígidas permeables a los gases utilizadas en el estudio fue invadida por el hongo, entendiendo por invasión la penetración del micelio en la matriz y el posterior desarrollo en el interior de la misma. Sin embargo, todas las lentes observadas con microscopía óptica convencional y confocal (véase apartados 3.2.1.2.8. y 3.2.2.7.) presentaron alteraciones del material, generalmente poco profundas, que ocasionaron su deterioro (figuras 4.2.23.- 4.2.26.). Por este motivo, se ha preferido utilizar dicho término en el estudio de las lentes rígidas permeables a los gases ya que, en realidad, no se

produce la penetración del micelio.

Tampoco en este caso se registraron diferencias significativas en relación al deterioro de las lentes rígidas permeables a los gases acabadas y semiacabadas; en consecuencia, el pulido de los bordes no parece estar relacionado con el deterioro del polímero. En ambos tipos de lentes, el grado máximo de deterioro fue el 3, si bien fue el grado 2 el más frecuente (tabla 17). Al igual que los resultados correspondientes a la adhesión fue muy difícil el enfoque de las mismas dada su curvatura y por ello fue costoso realizar una perfecta observación microscópica de la zona central. El enfoque, aunque poco preciso, efectuado por el centro de las lentes no permitió la observación de zonas deterioradas. No obstante, se puede afirmar que el deterioro de las lentes se produjo principalmente o exclusivamente, en la periferia.

Tabla 17.- Resultados sobre la adhesión (ADH.) y el deterioro (DET.) de las lentes de contacto rígidas permeables a los gases, acabadas y semiacabadas, por *Aspergillus niger* 2700. Grado 0, 1, 2, 3: grado de adhesión/deterioro.

		ACABADAS		SEMIACAB.		
		GRADO				
			n	%	n	%
ADH.	0		0	0	0	0
	1		1	10.00	1	10.00
	2		6	60.00	5	50.00
	3		3	30.00	4	40.00
	no adh.		0	0	0	0
	adh.tot.		10	100	10	100
DET.	0		0	0	0	0
	1		1	10.00	1	10.00
	2		7	70.00	7	70.00
	3		2	20.00	2	20.00
	no det.		0	0	0	0
	det.tot.		10	10.00	10	100

4.2.3. ANALISIS DE LAS LENTES DE CONTACTO NUEVAS, HIDROFILICAS Y RIGIDAS PERMEABLES A LOS GASES, MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

El tamaño y la morfología de las colonias de *A. niger* 2700 observadas en el interior de la matriz de las lentes de contacto hidrofílicas presentaron una gran diversidad, independientemente del material de fabricación de los polímeros invadidos. En todos los materiales podían existir pequeñas colonias escasamente ramificadas o, por el contrario, estar ampliamente distribuidas por la matriz. No obstante, cabe indicar que las colonias de mayor tamaño estuvieron presentes en las lentes de scaffilcon A (grupos II, no iónicas y contenido hídrico superior al 50%) y de vifilcon A (grupo IV, iónicas y contenido acuoso superior 50%). La cepa de *A. niger* analizada fue capaz de invadir los cuatro materiales utilizados cuando se incubó con medio líquido de Sabouraud (véase apartado 4.2.1.2.). Por tanto, el tamaño de las colonias internas parece venir determinado por el tipo de polímero, así como por el medio de cultivo utilizado. Asimismo, el momento en que tiene lugar la adhesión del hongo a la lente y su posterior invasión posiblemente también condicionen el tamaño de las colonias invasoras, si se analiza un material concreto. Lógicamente, las que se desarrollen en las primeras horas de incubación tendrán un tamaño mayor que aquéllas que lo hagan posteriormente, si el aporte nutritivo es adecuado. Ninguna de las lentes estudiadas fue invadida por colonias que desde una de sus caras se extendiera hasta la opuesta.

La colonia de mayor tamaño observada invadió una lente hidrofílica de vifilcon A cuyas hifas consiguieron penetrar 120.0 μm (figura 4.2.27.). Para observarla completa fue necesario efectuar 49 secciones ópticas en el plano horizontal x-y, perpendicular al eje óptico del microscopio. La distancia o intervalo entre ellas fue de 2.5 μm . Se utilizó un objetivo de 63 x con inmersión en aceite y una apertura numérica de 1.4. Se ajustó el tamaño del "pinhole" para trabajar en condiciones de máxima confocalidad y se consiguió una profundidad de foco de 0.41 μm . La imagen situada en el margen inferior derecho, sección 49, corresponde a la cara más externa de la lente. Puede comprobarse la fuerte

reflexión de luz emitida por las hifas y, algo menos intensa, la luz reflejada por la superficie de dicha cara. A medida que la colonia se adentra en la matriz lenticular desaparecen determinadas hifas y se observan otras nuevas como resultado de la gran ramificación colonial y del diferente grado de reflexión emitido por los fragmentos hifales según el plano seleccionado. La sección 1, situada en la parte superior izquierda, corresponde a la zona más interna de la colonia en la que todavía se observa un tenue reflejo emitido por las hifas.

La selección de las secciones ópticas 17, 24, 31 y 38 se observa en la figura 4.2.28. La porción de la colonia seleccionada comprendida entre los planos 17 y 38 se introduce en la matriz lenticular 52.5 μm .

Bajo las mismas condiciones de trabajo que con las figuras 1 y 2, se efectuó una sección óptica a través de la zona de origen de la colonia según el plano vertical x-z, paralelo al eje óptico del microscopio (figura 4.2.29.). La línea horizontal de color añil corresponde a la máxima reflexión del cubreobjetos. En el centro y en contacto con él se observa el origen de la colonia en la cara externa de la lente (la más próxima al cubreobjetos). Una pequeña porción de una hifa más madura refleja la luz a la izquierda de la anterior.

En la figura 4.2.30. se reconstruye de forma tridimensional y en proyección la imagen obtenida a partir de la asociación de las 49 secciones ópticas tomadas cada 2.5 μm y observadas en la figura 4.2.27. También se observa la luz reflejada por la cara externa de la lente. Queda patente que la intensidad de luz emitida por la colonia no es uniforme.

La penetración que alcanzan las hifas en la matriz de las lente se muestra en la figura 4.2.31. En la escala de profundidad aparecen diferentes colores atendiendo a los micrómetros que han penetrado las hifas, hecho relacionado con su grado de madurez. Las que originaron la colonia son las más maduras y también la más externas, es decir, las más próximas a la cara externa de la lente. Adoptan un color morado y se encuentran mayoritariamente en el centro de la colonia. Las hifas presentan diferente coloración a medida que la colonia

crece y se extiende internamente. Los extremos que han invadido la lente a mayor profundidad (120.0 μm) adoptan una coloración rojiza en la figura.

En la figura 4.2.32. se muestra una colonia de *A. niger*, de tamaño más reducido que la anterior, invasora de una lente de contacto hidrofílica de scafilcon A (grupo II). Fue observada con un objetivo de 63 x y apertura numérica de 1.4 utilizando aceite de inmersión. Se seleccionó un tamaño de "pinhole" que permitió trabajar con máxima confocalidad. Ya que las condiciones de trabajo fueron las mismas que en la colonia anterior, la profundidad de foco obtenida también fue de 0.41 μm . Se efectuaron 25 secciones ópticas en el plano horizontal x-y, con un intervalo entre planos de 1.2 μm . Por tanto, la colonia consiguió penetrar 28.8 μm en la matriz de la lente. La imagen 1 está situada en el ángulo superior izquierdo y corresponde a la parte más interna de la colonia. A medida que nos acercamos hacia la cara externa se observan hifas que reflejan intensamente la luz, mientras que pierden esta propiedad las más internas. La imagen 25 muestra los extremos de la hifas más externas ubicadas en la cara lenticular exterior.

La figura 4.2.33. es una composición constituida por cuatro imágenes. En la parte superior izquierda se observa la reconstrucción tridimensional y en proyección de toda la colonia, resultado de la asociación de las 25 secciones ópticas efectuadas y expuestas en la figura 4.2.32. El grado de ramificación es ostensiblemente menor al mostrado por la colonia de la figura 4.2.30. La misma imagen puede ser analizada en las figuras 4.2.34. y 4.2.35. Contigua a ella, en la parte superior derecha, se muestra la sección 12 de la serie. Sólo algunos fragmentos del micelio reflejan la luz y permiten ser observados. Las dos imágenes inferiores corresponden a las secciones efectuadas en el plano vertical x-z en dos zonas diferentes de la colonia. En la parte inferior izquierda se muestra la sección A realizada a través del origen de la colonia situado en el centro de la línea horizontal. Representa la zona de máxima reflexión de luz entre ambas caras de la lente y se corresponde con una pequeña superficie de su cara más externa, próxima al cubreobjetos. Inferior a ella aparece el cubreobjetos representado por dos líneas horizontales, de color añil, paralelas

entre sí y a la cara externa de la lente. Entre éste y la lente se encuentra el medio acuoso, en este caso suero fisiológico, que humecta la lente y que permite mantenerla unida al cubre y al portaobjetos para ser observada. En la parte inferior derecha de la misma figura se muestra la sección B efectuada a través de dos hifas y que, según la sección realizada en el plano x-z, aparecen como dos pequeños puntos.

La porción más madura del micelio se encuentra más próxima a la cara externa de la lente de contacto. Al ser la más superficial adopta el color morado en la figura 4.2.36. Corresponde al centro de la colonia, así como al extremo de una hifa que, desde el origen, se dirige hacia el ángulo inferior izquierdo de la imagen. Si se analiza el recorrido que efectúa dicha hifa en la matriz de la lente, se observa que desde la zona de origen penetra paulatinamente hasta las 10 μm aproximadamente (color turquesa) y de nuevo crece y se dirige hacia la cara exterior (color añil) hasta llegar a la superficie de la lente (color morado). Los diferentes micrómetros de penetración del micelio en la matriz son fácilmente identificables en la escala de colores.

Tal como se expuso en el apartado 4.2.1., los resultados de invasión conseguidos con *C. albicans* cuando se incubaron las lentes hidrofílicas nuevas con medio líquido de Sabouraud no fueron tan aparentes como los manifestados por *A. niger*. Con microscopía óptica convencional ya se valoró que las colonias de esta levadura que conseguían invadir dichos polímeros eran de menor tamaño que las del hongo filamentosos. De todas las colonias internas observadas, y ya que su tamaño fue muy parecido en los diferentes tipos de materiales, se eligió la que aparece en la figura 4.2.37. Se efectuaron 9 secciones ópticas en el plano horizontal x-y de una colonia que invadió una lente de vifilcon A (grupo IV) y con un intervalo entre ellas de 0.79 μm . La superficie de la lente de contacto aparece altamente deteriorada, según se desprende de la elevada reflexión de luz emitida por la imagen situada en la parte inferior izquierda. Pequeñas hifas, poco ramificadas, consiguieron penetrar 6.32 μm de profundidad en la matriz de la lente. Las imágenes se obtuvieron con un objetivo de 100 x, con inmersión en aceite y apertura numérica de 1.4. Se ajustaron las

dimensiones del "pinhole" para trabajar con máxima confocalidad y la profundidad de foco fue de 0.41 μm .

Resultados muy distintos a los expuestos se consiguieron cuando *A. niger* colonizó las lentes rígidas permeables a los gases (véase apartado 4.2.2.). Según pudo observarse con microscopía óptica convencional, el micelio fúngico no penetró en la matriz lenticular y únicamente se limitó a alterar su superficie. Este hecho queda de manifiesto en la figura 4.2.38. efectuada con el objetivo de 40 x y utilizando aceite de inmersión, condiciones con las que se obtuvo una apertura numérica de 1.0. El tamaño del "pinhole" seleccionado proporcionó máxima confocalidad y la imagen se obtuvo atendiendo al plano horizontal x-y. Únicamente quedó patente la reflexión de luz emitida por el borde de la lente y la alteración de esta zona provocada por el ataque enzimático del hongo en la superficie. Se intentó efectuar distintas secciones ópticas en el mismo plano y a diferente profundidad, pero como las hifas no consiguieron en ningún caso penetrar a través del polímero, no existió reflexión de luz en zonas más profundas de la matriz lenticular.