

Queratitis por *Acanthamoeba*

Julio Pérez-Irezábal¹, Patricia Isasa², Jorge Barrón¹ e Inés Martínez¹

Servicios de Microbiología y Parasitología¹ y de Oftalmología², Hospital de Cruces, Baracaldo, Vizcaya.

Algunas amebas de vida libre (AVL, *free-living amoebae*) de los géneros *Naegleria*, *Acanthamoeba* y *Balamuthia* (pertenecientes a la familia *Acanthamoebidae*) han sido identificadas como agentes infecciosos en humanos y animales. Sólo una especie de *Naegleria*, *N. fowleri*, algunas de *Acanthamoeba* (*A. castellani*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. healyi*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. astronyxis*, *A. divionensis*) y la única especie conocida de *Balamuthia*, *B. mandrillaris*, se sabe que causan enfermedades. Estas amebas se encuentran ampliamente distribuidas en el agua y suelo de los cinco continentes. La tierra húmeda y las aguas con abundante sustrato son un buen caldo de cultivo para su persistencia y multiplicación. Se han aislado tanto en aguas dulces como saladas, en aguas costeras de mares, en ríos, lagos, embalses, estanques y piscinas; contaminando sistemas y dispositivos (conducciones de agua, de calefacción, aire acondicionado, etc.), y secundariamente objetos y enseres comunes de nuestro entorno, por lo que son múltiples las ocasiones de entrar en contacto con estos pequeños protozoarios, que pueden ser causa de diversas afecciones.

Naegleria fowleri es el agente etiológico de la grave, y a menudo fatal, meningoencefalitis amebiana primaria de evolución sobreaguda (<10 días); *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, de la meningoencefalitis granulomatosa amebiana de curso subagudo o crónico, así como de granulomas en la piel y en otros órganos y tejidos, y de queratitis (recientemente se ha descrito un nuevo caso de meningoencefalitis amebiana originado por *Sappinia diploidea*). Muchas de estas infecciones son oportunistas y ocurren sólo en huéspedes inmunodeprimidos (meningoencefalitis por *Acanthamoeba* y *Balamuthia*, acantamebiasis cutánea), pero en otros casos no es así, puesto que la queratitis por *Acanthamoeba*, la meningoencefalitis por *Naegleria* y algunos casos de meningoencefalitis por *Balamuthia* pueden producirse en personas sanas (inmunocompetentes).

Por otro lado, se ha comprobado que las AVL interactúan con distintas especies bacterianas en el medio. *Acanthamoeba* ha sido identificada como depredadora de bacterias (enterobacterias, pseudomonas, vibrios, etc.). En otros casos, las bacterias utilizan a la ameba como hospedador y también como "refugio" en presencia de factores hostiles; igualmente, bajo condiciones favorables de temperatura, osmolaridad y pH, pueden multiplicarse e inducir la lisis de aquéllas, caso de *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Chlamydia pneumoniae*, *E.coli* O-157, etc., con las consecuencias que éste hecho puede tener para la propagación de patógenos al hombre.

El ciclo biológico de *Naegleria* consta de tres estadios: quiste, trofozoito y forma flagelada. Los otros dos géneros carecen de forma flagelada. Los trofozoitos de *Naegleria* infectan al hombre y animales atravesando el epitelio neuro-olfatorio, alcanzando así el sistema nervioso central (SNC), y pueden encontrarse en el líquido cefalorraquídeo (LCR). Los de *Acanthamoeba* pasan a través de pequeñas escoriaciones de la piel o de úlceras mucosas del tracto respiratorio y, posteriormente, por vía hematogena llegan a diversos órganos y tejidos del cuerpo, con un claro tropismo por la piel y SNC, en donde pueden multiplicarse activamente y originar una meningoencefalitis muy grave, por la frecuente demora en el diagnóstico (es muy infrecuente el hallazgo de trofozoitos en el LCR).

El diagnóstico de estas infecciones del SNC es complicado y se sustenta fundamentalmente en el examen directo y en los cultivos del LCR y de biopsia cerebral. Las técnicas de detección antigénica por hibridación con sondas o PCR y la inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos monoespecíficos o genoespecíficos marcados, están al alcance de muy pocos laboratorios (en centros de investigación o muy especializados). El tratamiento también es problemático puesto que no está estandarizado, y además varios antiamebianos de primera elección no se han comercializado en nuestro país.

BIOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

El género *Acanthamoeba* comprende protozoos ubicuos de vida libre que se encuentran en el aire, suelo, aguas dulces o saladas, residuales, e incluso en el agua del grifo o embotellada, unidades de diálisis, material odontológico, etc. También se encuentran como contaminantes de cultivos bacterianos o celulares y han sido aisladas de las vías respiratorias altas de humanos sanos, de lesiones de piel en inmunodeprimidos y de tejido corneal en pacientes con queratitis amebiana. Su ciclo biológico consta de dos estadios: una forma activa, con capacidad infecciosa y reproductora, que es el trofozoíto, y la forma latente, que es el quiste. El trofozoíto se alimenta de bacterias, algas, levaduras y partículas orgánicas ambientales por medio de la emisión de pseudópodos y posterior fagocitosis (en la córnea se piensa que se alimentan de queratocitos). La locomoción la realizan gracias a los acantopodios y se reproducen por fisión binaria. La formación del quiste ocurre bajo condiciones ambientales adversas, como la falta de alimento, desecación o cambios en la temperatura y pH. En estas condiciones, el microorganismo reduce drásticamente su actividad metabólica y así es capaz de sobrevivir a la acción de desinfectantes, antibióticos, cloración y bajas temperaturas, incluso de congelación, permaneciendo viables varios años a -20°C . Bajo condiciones ambientales apropiadas, los quistes se transforman en trofozoítos, los cuales sintetizan enzimas que favorecen la penetración y destrucción tisular.

Aunque el uso de lentes de contacto es el factor predisponente más frecuentemente asociado a la queratitis por *Acanthamoeba*, la incidencia de esta enfermedad entre los portadores de estas lentes sigue siendo muy baja, lo que indica que éste microorganismo es, relativamente, poco virulento, que existe inmunidad innata en el huésped y que el epitelio corneal ofrece una barrera frente a la penetración de las amebas en el estroma y el desarrollo consiguiente de queratitis. En los pacientes con antecedentes de traumatismo, las amebas pueden llegar directamente al estroma, y en portadores de lentes de contacto dicho acceso se facilita por microtraumatismos repetidos, aunque se ha visto que *A. castellanii* atraviesa el epitelio intacto de la córnea. No están bien caracterizados los mecanismos del sistema inmunitario que operan contra *Acanthamoeba*. En estudios experimentales con animales se ha visto que los neutrófilos y macrófagos constituyen la mayor respuesta inflamatoria celular en el área de la infección. Parece que los macrófagos conjuntivales tienen un papel muy importante en la primera línea de defensa y en la eliminación de los trofozoítos, ya que su desaparición aumenta la incidencia de la infección, agrava la enfermedad y determina que la queratitis se inicie más temprano y tenga un curso más prolongado. El primer caso de queratitis por *Acanthamoeba* fue descrito en 1974, y hasta 1984 se mantuvo como una enfermedad muy poco frecuente, en la mayoría de casos asociada a traumatismos de la córnea y a la exposición a aguas contaminadas. A mediados de los ochenta, aumentó de forma espectacular el número de casos y se atribuyó al incremento del uso de lentes de contacto y a su incorrecta desinfección.

Entre los factores predisponentes destacan los traumatismos corneales, el contacto con cuerpos extraños o la exposición al agua templada (de una bañera o piscina, por ejemplo); pero el factor de riesgo más importante para contraer esta infección es el uso de

lentes de contacto, sobre todo si se usan soluciones salinas caseras o agua corriente para el lavado de las mismas, el no desinfectarlas apropiadamente o con la frecuencia recomendada, y su utilización durante la práctica de la natación.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La queratitis amebiana es la manifestación clínica más habitual de la infestación por el género *Acanthamoeba*. Se caracteriza por ser dolorosa e invalidante. La infección progresa originando una ulceración de la córnea y puede dar como resultado ceguera en casos muy graves. Es una enfermedad difícil de diagnosticar y tratar, ya que las manifestaciones clínicas se confunden a menudo con las de las queratitis herpética, fúngica o micobacteriana, lo que provoca que el diagnóstico correcto y el comienzo del tratamiento se retrasen semanas o meses.

El cuadro clínico varía según el momento de la primera consulta. Al principio, las amebas se encuentran en el epitelio corneal, pero si la enfermedad progresa ocurre la invasión del estroma. En sus inicios, se caracteriza por limbitis, queratopatía punteada, infiltrados epiteliales, subepiteliales o perineurales (queratoneuritis radial). En este momento el paciente sufre enrojecimiento, lagrimeo, fotofobia y dolor de diversa intensidad, pero desproporcionado respecto a los signos oculares, así como visión borrosa. Si la enfermedad progresa, puede observarse ulceración, infiltrados anulares, placas endoteliales y uveítis anterior, con o sin hipopión (presencia de pus en la cámara anterior del ojo), y más infrecuentemente, edema corneal. Si el proceso se agrava, se pueden producir abscesos, escleritis, glaucoma, catarata e infección microbiana secundaria. Lo más característico es la presencia de un infiltrado anular compuesto por células inflamatorias (neutrófilos). Los pacientes que sufren esta infección son generalmente inmunocompetentes; no obstante, no desarrollan inmunidad protectora apreciable, por lo que es posible la reinfección.

DIAGNÓSTICO

Obtención de la muestra y envío al laboratorio

Ante una sospecha de queratitis por *Acanthamoeba*, o simplemente para descartarla en presencia de datos oftalmológicos y epidemiología sugestiva (tratamientos convencionales fallidos, antecedente de traumatismo ocular o portador de lentes de contacto), el oftalmólogo solicitará al laboratorio de Microbiología, el envío de un recipiente idóneo para el transporte y conservación de la muestra. Un tubo o frasco estéril de boca ancha (los contenedores de orina de 50-100 ml son apropiados) con 1 ml de solución de Page, previamente atemperada en estufa de cultivos durante 20 min, es válido para depositar las pequeñas virutas corneales recogidas asépticamente mediante microespátula oftálmica o similar, y también es adecuado para descartar queratitis de otra etiología, bacteriana o vírica, puesto que el fin primordial es evitar la desecación de la muestra. El recipiente se mantendrá a temperatura ambiente hasta su transporte al laboratorio, aunque también es posible hacerlo sin solución conservante si se asegura un rápido procesamiento (el personal está avisado de su llegada y de la naturaleza de la muestra).

Cultivo de la muestra

Una vez que la muestra (raspado corneal o biopsia) llega al laboratorio, se procederá así:

- Sacar de la nevera (4-8°C) un frasco con solución de Page (SP) y atemperar; caso de almacenar esta solución concentrada (10x, 50x), se diluye con agua bidestilada estéril hasta 1x (solución de uso). (ver anexo 1, al final del documento)

- Sacar de la nevera y atemperar una placa de Petri con medio de Page (MP, con base de agar no nutritivo) o un tubo con el mismo medio (solidificado en posición inclinada). El cultivo en placa es quizás algo más sensible y más precoz en detectar el crecimiento de *Acanthamoeba*, pero tiene el inconveniente de desecarse antes que el cultivo en tubo y por ello, necesita hidrataciones (con SP) y resiembras de *Escherichia coli* más frecuentes (cada 1-2 días); por todo ello, la mejor opción es utilizar ambos.
- Disponer, en un tubo estéril, 1 ml de la SP y emulsionar finamente 1-2 colonias de un cultivo de *E. coli* (o *Enterobacter aerogenes*), hasta obtener una turbidez media y homogénea. Conviene utilizar un cultivo reciente (18-24 h), bien identificado o una cepa de colección.
- Mediante una varilla de vidrio (u otro material estéril), fragmentar las virutas corneales en el frasco de recogida o, previo paso de éstas a otro recipiente más idóneo, con 0,5-1 ml de SP, dependiendo de la cantidad de muestra, que normalmente es escasa y debe ser inoculada también en medios ordinarios para bacterias.
- Inocular la placa de Petri (con medio de Page), con 0,2 ml de la solución de *E. coli* y con asa bacteriológica extender por toda la placa o por el medio inclinado, en caso de utilizar el tubo. Posteriormente, y con una pipeta tipo Pasteur, añadir un par de gotas de la solución con la muestra (virutas corneales disgregadas en SP) en el centro de la placa o dejando resbalar por el plano inclinado en el tubo. Esperar un tiempo para que se absorba y cerrar la placa con tira adhesiva porosa y el tubo con la tapa roscada floja para permitir una buena aireación. Luego, incubar ambos en estufa de 35-37°C)

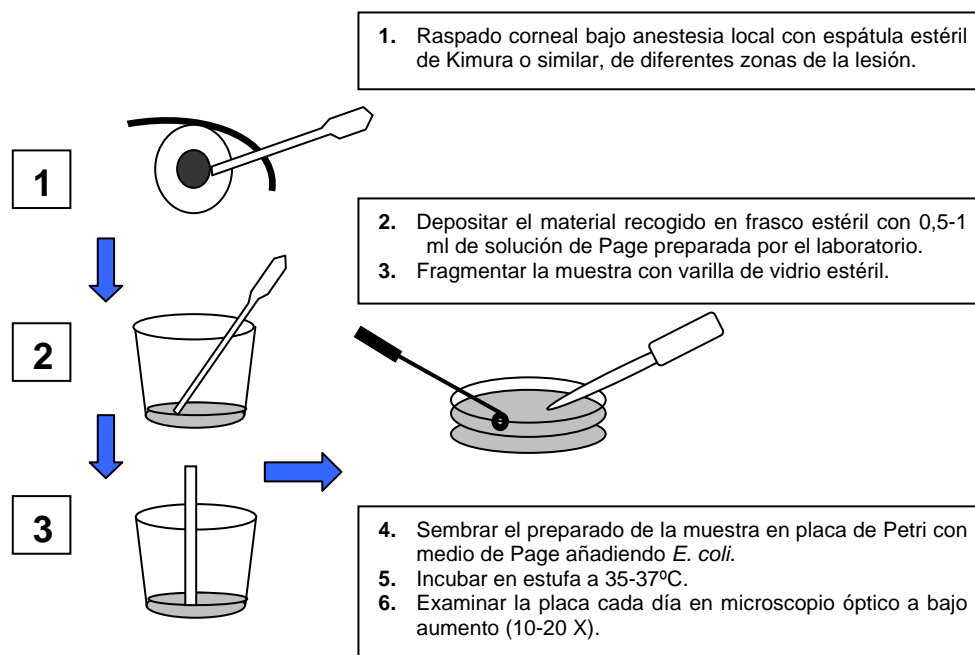


Figura1. Esquema del cultivo de *Acanthamoeba*

Si queda muestra, se puede realizar un examen directo en el microscopio óptico, utilizando objetivo seco de bajo aumento (10-20X), o conservarla en nevera a 4-8°C para ulteriores estudios, dependiendo de los resultados obtenidos en los cultivos previos. Si, además de muestra de raspado corneal, se dispone de lentillas o de líquido de conservación de éstas, se procederá así: en el caso de lentillas, se introducirán en un tubo estéril (con tapón) con 0,5-1,0 ml de SP y se agitará manualmente el tubo con energía (pero no en agitador *vortex*) y, finalmente, se depositará la lentilla y 0,3 ml de la SP en un tubo con MP inoculado con *E. coli*. Conviene realizar la siembra de inmediato tras la agitación (puesto que *Acanthamoeba* se adhiere con rapidez a las paredes del recipiente); en el caso de las

soluciones de conservación, está indicada una centrifugación suave y posterior examen microscópico y siembra del sedimento obtenido de forma directa o tras elución en un poco de SP. También está indicada, la filtración cuando se disponga de más volumen de líquido (filtros de acetato o nitrocelulosa de 20-22 μm de poro, con siembra posterior del filtro). En ambos casos (lentillas y líquido de conservación), se aconseja la siembra en tubo inclinado, en cambio para el filtro es más rentable la siembra en placa.

Examen de los cultivos

Los cultivos se deben examinar cada 24-48 h al principio (durante los primeros 7-8 días) y después cada semana, hasta un mínimo de 4-6 semanas porque, a veces, los quistes tardan en transformarse en trofozoítos y multiplicarse hasta alcanzar un número suficiente para ser detectados. Se debe examinar la placa en un microscopio óptico con objetivo seco de bajo aumento (10-20X); en el caso del tubo, se toma una pequeña cantidad de la fase líquida (25-50 μl) con una pipeta estéril, y previa agitación suave, se deposita en un porta limpio y se observa igualmente con objetivo seco. En caso de positividad, se aprecian los trofozoítos o quistes de morfología característica.

Identificación

Los trofozoítos de *Acanthamoeba* muestran un movimiento lento típicamente ameboide, por contracciones y relajaciones del citoplasma; un tamaño variable entre 15-45 μm , son tenues (hialinos), generalmente mononucleados y con una vacuola grande y visible, que se contrae y desaparece cada 45-50 seg. Con más aumento (40X) pueden observarse unas finas proyecciones citoplásmicas que parecen flagelos, pero que no lo son, que se extienden y retraen constantemente, denominadas acantopodios. Los quistes tienen un tamaño de 10-25 μm y, de forma característica, una doble pared: una externa, irregular y gruesa (ectoquiste), y otra interna redondeada, más fina y lisa (endoquiste). Cuando persisten las condiciones adversas, la pared interna del quiste va encogiéndose y adoptando formas geométricas, irregulares o estrelladas, frecuentemente en triángulo o pentágono (figura 2).

Subcultivos

Si los cultivos son negativos a los 6-8 días, está indicado el subcultivo, sobre todo si lo han sido también los cultivos ordinarios para bacterias y hongos. Para ello, tomar una porción de agar en forma de cuadrado de la placa de Petri, e introducirla en tubo con MP inclinado y previamente inoculado con *E. coli* y con 0,3 ml de SP atemperada; mover de modo suave y reincubar en estufa. En caso de subcultivo a partir de un tubo, tomar 0,1 ml de la fase líquida, previamente bien agitada, e inocular un nuevo tubo con MP (con *E. coli* y 0,2-0,3 ml de SP). Se deben mantener los subcultivos en estufa, durante un mínimo de 20 días antes de informarlos como negativos.

Para obtener cultivos ricos en trofozoítos, los mejores resultados se obtienen realizando subcultivos seriados en placa de Petri previamente inoculada con *E. coli* y humedecida con SP reciente, e incubar a 35°C. Para mantener quistes viables es conveniente realizar subcultivos cada 1-2 meses en MP en tubo con *E. coli* y en estufa de 30°C (reversiones a formas tróficas y sucesivas enquistaciones). La resiembra en medio de Page semisólido (0,5% de agar) nos ha reportado alguna ventaja al aumentar el tiempo necesario entre pases, debido a una menor desecación.

Otras consideraciones

El medio de Page es un medio de cultivo monoxénico (con una sola especie bacteriana, que hace de nutriente), clásico y con un buen rendimiento tanto para aislamiento primario como para mantenimiento; ha demostrado un alto porcentaje de éxitos en la recuperación de diversas AVL (66%, 2/3 de los casos en que técnicas de hibridación o PCR, más sensibles, han sido positivas), pero también se han comunicado resultados similares con la utilización de medios axénicos (sin bacterias) enriquecidos, como el BCYE (*Charcoal yeast extract agar* en solución tamponada) y medios con base de agar triptosa o agar peptona-extracto de levadura con sangre de conejo, cordero, o caballo. Estos medios tienen la ventaja de estar comercializados (en placa, no en tubo) y por ello son una buena alternativa al MP para laboratorios con muy escasa demanda de estos estudios.

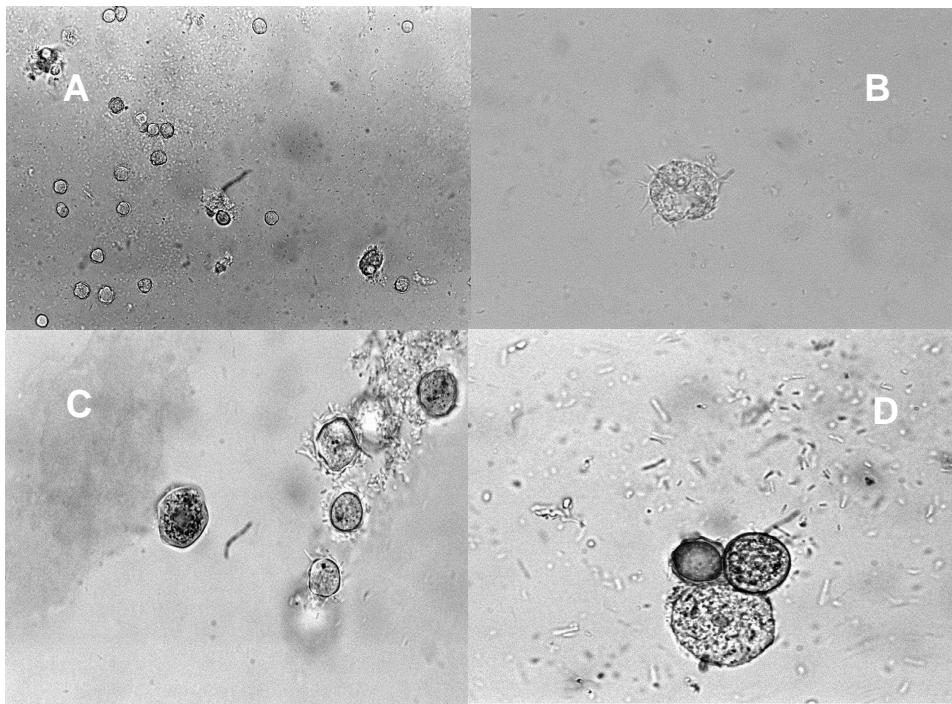


Figura 2. Examen en fresco de cultivo de *Acanthamoeba*. A: quistes y trofozoítos (400X); B: trofozoíto. Se aprecia el núcleo, la gran vacuola contráctil y los acantopodios (1000x); C: quistes poligonales, algunos irregulares y de diferentes tamaños (1000X); D: Quistes en diferentes grados de involución. En el pequeño se aprecia claramente la doble pared (1659X). Contraste: Lugol/Kop-color.

TRATAMIENTO

El tratamiento de la queratitis por *Acanthamoeba* es, fundamentalmente, médico. Desde la revisión de Bacon *et al.* hace más de 10 años, se sabe que los antiamebianos más eficaces, hasta la fecha, son las diamidinas y las biguanidas, estas últimas de primera elección, solas o asociadas a diamidinas (ambas son quisticidas). Entre las diamidinas disponibles se encuentran el isetionato de propamidina al 0,1% (Brolene, May and Baker, Dagenham, Reino Unido), y la hexamidina, también al 0,1% (Desomedine, Chauvin, Montpellier, Francia). Ambos preparados pueden obtenerse de estos países a través de solicitud de medicamentos extranjeros. Entre las biguanidas, las más activas son la clorhexidina (CHX, Ashton Chemicals Ltd., Aylesbury, Reino Unido) y la polihexametilenbiguanida (PHMB, Avecia HQ, Manchester, Reino Unido), ambas utilizadas en colirio al 0,02% y no disponibles comercialmente, por lo que deberán prepararse en la farmacia del hospital. La PHMB puede solicitarse al Moorfields Eye Hospital (Londres) ya que la obtención del principio activo puede resultar complicada.

Por lo general, es preferible un tratamiento combinado (diamidina+biguanida) e intensivo al principio, para lograr una rápida lisis de los trofozoítos, y que el menor número posible de ellos revierta a formas quísticas, más resistentes. Es aconsejable instilar una gota de ambos preparados cada hora, durante las primeras 48 h y luego una gota cada hora, sólo durante el día, en las siguientes 72 h. Posteriormente, es necesario bajar la dosis (por ejemplo, una gota de cada preparado cada 3 h) y adaptarla a cada paciente, puesto que es frecuente la aparición de fenómenos tóxicos, sobre todo asociados a las diamidinas a dosis altas; en este caso, es necesario suprimir la medicación durante 3 días y observar la evolución. Normalmente, la frecuencia de instilación puede ser reducida a cuatro veces al día en 3-4 semanas, pero debe mantenerse al menos 8 semanas más a partir de la resolución de la inflamación; por ello, en pacientes con buena/moderada respuesta, el tiempo medio de tratamiento es de 6 meses. La PHMB es menos tóxica que las diamidinas, y la clorhexidina, y aunque falta experiencia, parece igualmente poco tóxica a estas dosis.

Otras alternativas por vía tópica son los aminoglucósidos (neomicina y paromomicina) y los imidazoles (miconazol y clotrimazol, ambos al 1 %), aunque de menor actividad frente a los quistes. La neomicina en colirio está disponible en combinación con polimixina B y gramicidina (Oftalmowel, UCB, Barcelona, España). En cuanto al clotrimazol, se puede aplicar la pomada dermatológica al 1% (Canesten Crema, Bayer), pero si no se tolera debe prepararse en farmacia un colirio a esta concentración.

En casos de inflamación persistente, puede ser útil la aplicación tópica de corticoides a dosis bajas (metilprednisolona al 0,5%, cuatro veces al día), teniendo la precaución de mantener los antiamebianos 2-3 semanas antes, durante, y otras 6-8 semanas después de administrar los corticoides. La limbitis y escleritis persistente (sobre todo los casos muy dolorosos o necrosantes de escleritis) pueden requerir tratamiento oral con AINES, o incluso en el caso de la escleritis, pueden ser necesarios corticoides a dosis altas (prednisolona 1mg/kg/día). En estos casos, puede ser útil el itraconazol por vía oral.

El tratamiento quirúrgico, con la excepción de la perforación corneal que requiere intervención urgente, se limita a corregir los efectos residuales que puedan quedar, cicatrices corneales o astigmatismo y se debe instaurar tras la erradicación de la infección, puesto que si se realiza una queratoplastia precoz no es infrecuente el fracaso del injerto.

PREVENCIÓN

A partir de 1984, coincidiendo con el incremento del número de portadores de lentes de contacto, la incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* aumentó de forma espectacular. En la actualidad, la incidencia parece haberse estabilizado, probablemente porque los factores de riesgo entre los usuarios de estas lentes se han identificado y evitado. Aún así, más del 90% de los casos que se observan podrían evitarse utilizando un sistema eficaz de desinfección, como el calor o el peróxido de hidrógeno de dos pasos, el empleo de soluciones comerciales de suero fisiológico y la regular desinfección y limpieza del estuche de las lentes.

BIBLIOGRAFÍA

BACON AS, FRAZER DG, DART JKG *ET AL.* A review of 72 cases of *Acanthamoeba* keratitis 1984-1992. *Eye* 1993; 7:719-725.

GARCIA LS. Protozoa from other body sites. En: *Diagnostic medical parasitology*, 4ª ed. ASM Press: Washington DC, 2003; pp 106-131, 855-860.

- MARCIANO-CABRAL F, CABRAL G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16:273-307.
- PAGE FC. A new key to fresh water and soil *Gymnamoeba*. Fresh Water Biological Association: Cumbria, England, 1985.
- RADFORD CF, MINASSIAN DC, DART JKG. *Acanthamoeba* keratitis in England and Walles: incidence, outcome, and risk factors. Br J Ophthalmol 2002; 86:536-542.
- SCHUSTER FL, VISVESVARA GS. Free-living amoebae as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals. Int J Parasitol 2004; 34:1001-1027.
- SCHUSTER FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev 2002; 15:342-354.
- SEAL DV. *Acanthamoeba* keratitis: update-incidence, molecular epidemiology and new drugs for treatment. Eye 2003; 17:893-905.
- STEHR-GREEN JK, BAILEY TM, BRANDT FH, CARR JH, BOND WW, VISVESVARA GS. *Acanthamoeba* keratitis in soft contact lens wearers: a case-control study. JAMA 1987; 258: 57-60.
- VISVESVARA GS. Pathogenic and opportunistic free-living amoebae. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (eds). Manual of clinical microbiology, 8ª ed. ASM Press: Washington DC, 2003; pp 1981-1989.

Anexo 1. Preparación del medio de cultivo de Page para amebas de vida libre.

1. Solución salina de Page 10X (SP):

Cloruro sódico (NaCl)	60 mg
Sulfato magnésico (MgSO ₄ .7H ₂ O)	2 mg
Fosfato sódico, dibásico (Na ₂ PO ₄ H)	71 mg
Fosfato potásico, monobásico (KPO ₄ H ₂)	68 mg
Cloruro cálcico (CaCl ₂ .2 H ₂ O)	2 mg
Agua bidestilada	500 ml

- Disolver los ingredientes, por este orden, en un recipiente de vidrio apropiado (por ejemplo, un matraz de 2 L) y con agitación constante (agitador magnético). Hay que tener especial cuidado de comprobar la adecuada disolución del CaCl₂. Puede estar indicado su disolución por separado en una cantidad de agua bidestilada, previamente calentada a 40°C, con agitación constante y añadir la solución al frasco principal con el resto de sales disueltas (mantener la agitación).
- Esterilizar en autoclave (121°C/20 min), dejar enfriar, alicuotar y rotular: SP10X. La caducidad de la solución es de 6-8 meses y hay que almacenarla a 4°C. También pueden congelarse las alícuotas con escasa pérdida de actividad (1 año: 5-10%).
- **Nota:** dada la dificultad de pesar con precisión cantidades tan pequeñas como 2 mg, puede prepararse en un matraz aparte el sulfato magnésico y el cloruro cálcico a 50X. Posteriormente, se añadirá al matraz principal con el resto de sales sólo una quinta parte de esta disolución.

2. Agar no nutritivo de Page (MP):

SP, solución de Page 10X	50 ml
Bacto-Agar, Difco 0140-01 ^a	7,5 g
Agua bidestilada	450 ml

^aU otro agar purificado

- Mezclar la SP 10X con el agua bidestilada en frasco idóneo, con agitación. Calentar y añadir el agar. Mezclar bien hasta su completa disolución. Autoclavar (121°C/20 min). Sacar del autoclave, atemperar a 60°C y distribuir asépticamente en placas de Petri o en tubos de 10 ml con tapón de rosca. Tapar las placas y cerrar los tubos. Dejar solidificar (en posición inclinada los tubos), sellar las placas y rotular (MP, caducidad: 8-12 meses los tubos, 3 meses las placas en nevera a 4°C).