

Procedimiento de Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica



31a. Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares

Editores

Emilia Cercenado Mansilla
Rafael Cantón Moreno

Coordinador

Fernando García Garrote

Autores

María Dolores Díaz López
Fernando García Garrote
Ildefonso Perales Palacios
Paula Pescador Martín



ISBN: 978-84-09-15877-5

EDITORES:

Emilia Cercenado Mansilla. Servicio de Microbiología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.
Rafael Cantón Moreno, Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Ramón y Cajal e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS). Madrid.

SUGERENCIA DE CITACIÓN:

Díaz López MD, García Garrote F, Perales Palacios I, Pescador Martín P. Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. 2019. 31 a. Fernando García Garrote (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2019.

AVISO:

Reservados todos los derechos. Los documentos SEIMC o cualquiera de sus partes no podrán ser reproducidos, almacenados, transmitidos, distribuidos, comunicados públicamente o transformados mediante ningún medio o sistema sin la previa autorización de sus responsables, salvo excepción prevista por la ley. Cualquier publicación secundaria debe referenciarse incluyendo “Este documento ha sido elaborado por la SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica) y su contenido puede encontrarse en la página web www.seimc.org”

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de
Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores:

Emilia Cercenado Mansilla

Rafael Cantón Moreno

31a. Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. 2019

Coordinador:

Fernando García Garrote¹

Autores:

María Dolores Díaz López²

Fernando García Garrote¹

Ildelfonso Perales Palacios³

Paula Pescador Martín⁴



¹Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Lucus Augusti, Lugo; ²Unidad de Enfermedades Infecciosas-Servicio de Medicina Interna. Complejo Hospitalario Universitario de Ourense; ³Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Cruces, Barakaldo; ⁴Servicio de Microbiología y Enfermedades Infecciosas. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

INDICE DE CONTENIDOS

1.	Introducción.....	6
2.	Microbiota ocular. Patógenos oculares.....	6
3.	Infecciones perioculares	9
	3.1.Celulitis de estructuras extraoculares. Blefaritis y orzuelo. Consideraciones clínicas. Etiología y diagnóstico microbiológico.....	9
	3.2. Infecciones del aparato lacrimal. Dacriocistitis y dacrioadenitis. Canaliculitis. Consideraciones clínicas. Etiología y diagnóstico microbiológico.....	10
	3.3.Celulitis preseptal y orbital. Consideraciones clínicas. Etiología y diagnóstico microbiológico.....	10
4.	Conjuntivitis.....	11
	4.1 Introducción. Consideraciones clínicas.....	11
	4.2 Conjuntivitis vírica. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	12
	4.3 Conjuntivitis bacteriana. Consideraciones clínicas. Etiopatogenia. Diagnóstico microbiológico.....	13
	4.4 Conjuntivitis por <i>Chlamydia trachomatis</i> . Consideraciones clínicas. Diagnóstico microbiológico.....	15
	4.5 Conjuntivitis fúngica. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	16
	4.6 Conjuntivitis por parásitos. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	16
5.	Queratitis.....	16
	5.1 Introducción y tipos. Epidemiología. Consideraciones clínicas.....	16
	5.2 Queratitis bacteriana. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	17
	5.3 Queratitis vírica. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	17
	5.4 Queratitis fúngica. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	18
	5.5 Queratitis por parásitos Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	18
6.	Endoftalmitis.....	19
	6.1 Introducción y tipos.....	19
	6.2 Endoftalmitis postquirúrgica aguda tras cirugía de cataratas. Consideraciones clínicas Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	19
	6.3 Endoftalmitis postquirúrgica tras cirugía de cataratas de comienzo tardío o crónica. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	20
	6.4 Endoftalmitis postvitrectomía. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	21
	6.5 Endoftalmitis postqueratoplastia. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico..	21
	6.6 Endoftalmitis postinyección intravítrea. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	22
	6.7 Endoftalmitis postraumática. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	22
	6.8 Endoftalmitis relacionada con cirugía corneal filtrante. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	23
	6.9 Endoftalmitis relacionada con queratitis. Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	23
	6.10 Endoftalmitis endógena Consideraciones clínicas. Etiología. Diagnóstico microbiológico.....	24
	6.10.1 Endoftalmitis bacteriana endógena.....	24
	6.10.2 Endoftalmitis fúngica endógena.....	24
	6.11 Técnicas de microbiología molecular para el diagnóstico de la endoftalmitis infecciosa.....	25
7.	Uveítis infecciosa y retinitis.....	26
	7.1 Introducción y cuadros clínicos.....	26
	7.2 Retinitis por toxoplasma y citomegalovirus. Consideraciones clínicas. Diagnóstico microbiológico..	27
	7.3. Uveítis anterior por virus herpes, virus varicela-zoster. Consideraciones clínicas. Diagnóstico microbiológico.....	28
	7.4 Sífilis ocular. Consideraciones clínicas. Diagnóstico microbiológico.....	29
	7.5 Tuberculosis ocular. Consideraciones clínicas. Diagnóstico microbiológico.....	29

8.	Procesamiento general de las muestras para el diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares..	30
8.1	Obtención de las muestras.....	30
8.1.1	Exudado palpebral.....	31
8.1.2	Muestras del aparato lacrimal.....	31
8.1.2.1	Dacriocistitis.....	31
8.1.2.2	Dacrioadenitis.....	31
8.1.2.3	Canalikulitis.....	31
8.1.3	Celulitis preseptal y orbital.....	31
8.1.4	Exudado y raspado conjuntival.....	32
8.1.5	Raspado corneal.....	32
8.1.6	Biopsia corneal.....	33
8.1.7	Lentes de contacto, estuches y soluciones de mantenimiento.....	33
8.1.8	Tejidos de donante córnea, medio de conservación y suturas.....	33
8.1.9	Humor acuoso.....	33
8.1.10	Humor vítreo.....	33
8.1.11	Biopsias de tejidos intraoculares.....	34
8.1.12	Lentes intraoculares, cuerpo extraño, prótesis, implantes y otros biomateriales.....	34
8.1.13	Otras muestras con valor diagnóstico.....	34
8.2	Transporte y conservación de las muestras.....	34
8.3	Recepción de la muestra.....	35
8.3.1	Criterios de rechazo.....	35
8.4	Procesamiento de las muestras.....	36
8.4.1	Comunicación entre el laboratorio de Microbiología y el oftalmólogo.....	36
8.4.2	Procesamiento de las muestras oculares.....	36
8.4.3	Examen microscópico de las muestras oculares.....	38
8.4.4	Medios de cultivo.....	39
8.4.5	Inoculación y condiciones de incubación.....	40
8.5	Interpretación de los resultados.....	41
8.6	Criterios para la interpretación de los resultados.....	41
8.7	Determinación de la sensibilidad frente a los antimicrobianos.....	43
8.8	Información de los resultados.....	45
9.	Técnicas rápidas de diagnóstico.....	45
10.	Bibliografía.....	46

DOCUMENTOS TÉCNICOS

1. PNT-IO-01. Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica
2. PNT-IO-02. Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de *Acanthamoeba* spp.
3. PNT-IO-03. Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico molecular de infecciones oculares por *Chlamydia trachomatis*, virus herpes, virus varicela-zoster, adenovirus, *Acanthamoeba* spp.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones oculares son uno de los problemas oftalmológicos más frecuentes que producen una alta morbilidad ocular y que, en determinadas situaciones, pueden causar disminución de la visión y ceguera. Según su gravedad presentan un amplio abanico de formas clínicas que van desde procesos superficiales leves, que se pueden tratar sintomáticamente, hasta cuadros graves que ponen en riesgo la visión del paciente y que precisan de una intervención inmediata. Las infecciones oculares se definen por las estructuras anatómicas que se ven afectadas. Pueden afectar a las estructuras superficiales que rodean el ojo (conjuntivitis, blefaritis, canaliculitis, dacriocistitis, celulitis orbitaria y periorbitaria), a la superficie ocular (queratitis) o a los líquidos y tejidos intraoculares (endofthalmitis y uveítis). Además, una amplia variedad de bacterias, hongos, virus y parásitos pueden causar algún tipo de infección ocular.

El diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares es complejo por varias razones. El ojo no constituye una estructura de fácil acceso para obtener muestras por su peculiar anatomía y fisiología. La recogida de las muestras sin contaminación por la microbiota comensal es difícil y la situación se complica aún más en algunas infecciones en las que los microorganismos etiológicos más frecuentes son parte de esta microbiota. El volumen de muestra obtenido es normalmente muy escaso por lo que es recomendable que, en vez de enviar la muestra al laboratorio, sea el médico que realiza la toma quien inocule los medios de cultivo. Las recomendaciones para el diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares a menudo se basan en estudios retrospectivos u observacionales que incluyen pocos pacientes por lo que la evidencia de algunas recomendaciones es reducida. Además, los estudios que comparan varios métodos para el diagnóstico etiológico de la queratitis y la endofthalmitis están aún más limitados por el escaso volumen de muestra.

En este contexto, para que el rendimiento de las pruebas diagnósticas microbiológicas en las muestras oculares sea óptimo, es esencial una buena colaboración entre el laboratorio de Microbiología y el oftalmólogo. El microbiólogo clínico debe tener un conocimiento básico de la anatomía del ojo y la terminología utilizada por los oftalmólogos para describir las infecciones oculares y sus síntomas y signos clínicos. Debe conocer las técnicas oftalmológicas de toma de muestras, y si estas proceden de una zona normalmente estéril o no. También debe saber cuáles son los principales agentes etiológicos de una infección ocular incluso si estos microorganismos forman parte de la microbiota comensal. Los oftalmólogos por su parte deben conocer los procedimientos microbiológicos para seleccionar la muestra adecuada, inocular correctamente los medios de cultivo, identificar las placas de los medios de cultivo con precisión y transportar la muestra, o los medios inoculados, sin demora al laboratorio. Esta estrecha colaboración permitirá el procesamiento adecuado de las muestras oculares y el uso apropiado de las pruebas diagnósticas disponibles según el tipo de infección y la sospecha clínica.

El presente documento describe los síndromes clínicos asociados con las infecciones oculares, los microorganismos asociados con estos cuadros clínicos y la recogida y el procesamiento de las muestras para el aislamiento de estos agentes infecciosos. Este procedimiento complementa y actualiza la información recogida en el procedimiento de la SEIMC nº 31 titulado “Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares” publicado en 2008.

2. MICROBIOTA OCULAR. PATÓGENOS OCULARES

A diferencia de otras microbiotas, como las correspondientes a la intestinal, oral y de la piel, el estudio de la microbiota ocular ha recibido escasa atención. Los primeros estudios de la presencia de microorganismos en la superficie ocular se realizaron mediante cultivos, generalmente de la conjuntiva y mostraron una escasa presencia bacteriana. Las muestras positivas suelen oscilar entre el 50% y el

80% y los recuentos son muy bajos. En los casos en los que se obtiene crecimiento mediante cultivo, predominan las bacterias grampositivas, siendo las más frecuentes los estafilococos coagulasa negativa (con predominio de *Staphylococcus epidermidis*), seguido de *Cutibacterium* spp. y *Corynebacterium* spp., encontrándose también *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp. y *Micrococcus* spp. Las bacterias gramnegativas son mucho menos frecuentes, pudiéndose detectar *Pseudomonas* spp., *Haemophilus* spp. y algunas enterobacterias. Estos resultados contrastan con los que se obtienen de otras superficies corporales, que presentan cantidades y variedades de microorganismos mucho más numerosas, incluida la superficie de la piel próxima a los ojos. Una explicación a esta escasa microbiota puede ser la acción de las sustancias antimicrobianas presentes en las lágrimas y la acción mecánica de los párpados.

En los últimos años han comenzado a aplicarse técnicas basadas en secuenciación para la caracterización del microbioma ocular, especialmente la técnica del ARNr 16S. Como era de esperar, estos estudios han puesto de manifiesto la presencia de una mayor variedad de microorganismos, llegándose a detectar más de 50 géneros y más de 200 especies, pero aun así mucho menos diversa que en otras superficies. Los estudios realizados han sido escasos y, a diferencia de los cultivos, apuntan a un mayor predominio de los gramnegativos, ya que el filo Proteobacteria es mucho más frecuente que en los cultivos, aunque los grampositivos con los filos Firmicutes y Actinobacteria siguen siendo los predominantes. Algunos autores apuntan a que las Proteobacteria en general y *Pseudomonas* spp. en particular podrían ser más frecuentes en la conjuntiva más profunda. Los hongos y virus representan un porcentaje muy reducido del microbioma, aunque llama la atención la detección del virus Torque Teno en un estudio. La limitación de estos estudios radica en que al ser el ocular un microbioma paucimicrobiano, puede sobrevalorarse la importancia de microorganismos transitorios y no viables, que son eliminados por los mecanismos de defensa del ojo y del sistema inmune.

Hay que tener en cuenta que una verdadera microbiota de la superficie ocular debería estar caracterizada por la persistencia de un consorcio estable de microorganismos a lo largo del tiempo, por lo que es importante diferenciar los microorganismos estables de los meramente transitorios. Ha habido pocos estudios longitudinales, pero parecen indicar que la superficie ocular no soporta un microbioma base estable, aunque sí podría existir un microbioma base individual específico.

La implicación de la resistencia de la microbiota ocular a la enfermedad es diferente a la de otras microbiotas debido a su característica paucimicrobiana, por lo que es difícil que se oponga a la colonización. Sin embargo, se ha apuntado que la microbiota ocular pueda jugar un papel protector mediante funciones homeostáticas e inmunorreguladoras. También se ha sugerido que la edad y el sexo pueden modelar el microbioma conjuntival y cambiar la homeostasia inmune de la superficie ocular.

PATÓGENOS OCULARES

Las infecciones oculares pueden estar causadas por una amplia variedad de microorganismos. Los microorganismos presentes habitualmente en la conjuntiva o en zonas perioculares pueden ser el origen de infecciones oculares, especialmente si se alteran los sistemas defensivos por la presencia de lentes de contacto, operaciones quirúrgicas, inyecciones intraoculares u otras técnicas invasivas. Los microorganismos que producen infecciones oculares también pueden ser exógenos y llegar al ojo por las manos, fómites o heridas traumáticas. Por último, pueden acceder por vía hematógena a partir de focos de otra parte del cuerpo.

En la tabla 1 se presentan algunos de los microorganismos que se pueden aislar en las infecciones oculares, aunque pueden existir importantes diferencias geográficas. En los siguientes apartados se detallan los más frecuentes en cada una de las entidades clínicas.

Tabla 1. Agentes etiológicos potenciales de las infecciones oculares más frecuentes

Microorganismos	Infecciones*
Cocos grampositivos	
<i>Staphylococcus aureus</i>	B, O, DC, DA, CE, P, C, Q, E
<i>Staphylococcus epidermidis</i> y otros estafilococos coagulasa negativa	B, P, Q, E
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DC, DA, CE, P, C, Q, E
<i>Streptococcus pyogenes</i> y otros estreptococos β -hemolíticos	DA, CE, P, C, Q, E
Estreptococos del grupo <i>viridans</i>	P, Q, E
<i>Enterococcus</i> spp.	Q, E
<i>Peptostreptococcus</i> spp.	DC, CE, Q
Bacilos grampositivos	
<i>Bacillus cereus</i> , <i>B. thuringiensis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>B. coagulans</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. mycoides</i>	C, Q, E
<i>Brevibacillus (Bacillus) brevis</i> , <i>Brevibacillus (Bacillus) laterosporus</i>	Q
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	C, Q
<i>Corynebacterium</i> spp.	B, P, C, E
<i>Propionibacterium</i> spp.	B, DC, CA, P, E
<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium</i> spp.	Q, E
Micobacterias	
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>M. chelonae</i> , <i>M. abscessus</i> , <i>M. goodii</i> , <i>M. mucogenicum</i> , <i>M. fortuitum</i>	DA, P, Q, U/R CA, CE, Q
Actinomycetos	
<i>Nocardia</i> spp.	CA, P, Q, E
<i>Actinomyces</i> spp.	CA, P, E
Cocobacilos gramnegativos	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	C, Q, E
<i>Neisseria meningitidis</i>	C, E
<i>Moraxella</i> spp.	B, C, Q, E
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Q
Bacilos gramnegativos	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas</i> spp.	DC, DA, P, C, Q, E
<i>Burkholderia (Pseudomonas) mallei</i>	Q
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , <i>Xanthomonas</i> spp.	E
<i>Proteus mirabilis</i>	P, C, Q
<i>Serratia marcescens</i> , <i>S. liquefaciens</i>	Q, E
<i>Escherichia coli</i>	DC, P, C, Q, E
<i>Citrobacter koseri</i>	C
<i>Enterobacter</i> spp.	P, C, Q
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P, C, Q, E
<i>Morganella morganii</i>	Q
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Q, E
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Q
<i>Haemophilus influenzae</i>	DC, CE, P, C, Q, E
<i>Pasteurella multocida</i>	Q, C
<i>Bartonella henselae</i>	Q, E, U/R
<i>Fusobacterium</i> spp.	DC, CA, CE, Q
<i>Prevotella</i> spp.	DC
<i>Bacteroides</i> spp.	CE
Clamidas	
<i>Chlamydia trachomatis</i>	C, Q, U/R
Espiroquetas	
<i>Treponema pallidum</i>	P, Q, U/R
<i>Borrelia</i> spp.	Q, U/R

Tabla 1. Agentes etiológicos potenciales de las infecciones oculares más frecuentes. **Continuación**

Microorganismos	
Virus	
Virus herpes simplex	P, C, Q, U/R
Virus varicela-zoster	C, Q, U/R
Adenovirus	C, Q
Virus Epstein-Barr	C, P, Q
Rubeola	C, Q
Enterovirus	Q
Virus Coxsackie	Q
Citomegalovirus	U/R
Hongos	
<i>Candida</i> spp.	C, Q, E, U/R
<i>Cryptococcus</i> spp.	P, Q, E, U/R
<i>Encephalitozoon</i> spp.	C, Q
<i>Fusarium</i> spp.	C, Q, E
<i>Rhodotorula</i> spp.	Q
<i>Aspergillus</i> spp.	CE, C, Q, E
<i>Acremonium</i> spp.	Q
<i>Alternaria</i> spp.	Q
<i>Penicillium</i> spp.	Q, E
<i>Paecilomyces</i> spp.	Q
<i>Psedallescheria</i> spp.	Q
<i>Curvularia</i> spp.	Q
<i>Phialophora</i> spp.	Q
<i>Acrophialophora fusicapna</i>	Q
<i>Cephalosporium</i> spp.	E
<i>Bipolaris</i> spp.	Q, E
<i>Nosema</i> spp.	Q
<i>Vittaforma (Nosema) corneae</i>	Q
Mucorales	CE, P, Q
Hongos dimórficos: <i>Histoplasma capsulatum</i> , <i>Blastomyces dermatitidis</i> , <i>Coccidioides immitis</i> , <i>Sporothrix schenckii</i>	C, E
Parásitos	
<i>Acanthamoeba polyphaga</i> , <i>A. castellanii</i>	Q
<i>Leishmania</i> spp.	C, Q, U/R
<i>Trypanosoma</i> spp.	Q
<i>Toxoplasma gondii</i>	U/R
<i>Onchocerca volvulus</i>	Q, U/R
<i>Loa loa</i>	C
<i>Toxocara</i> spp.	Q, U/R
<i>Taenia</i> spp. (cisticercosis)	P, U/R
<i>Echinococcus granulosus</i>	C, P
<i>Demodex</i> spp.	B, C, P
* Abreviaturas: P: Perioculares; C: Conjuntivitis; Q: Queratitis; E: Endoftalmitis; U/R: Uveítis y Retinitis; DC: Dacriocistitis; DA: Dacrioadenitis; CA: Canaliculitis; CE: Celulitis	

3. INFECCIONES PERIOCULARES

3.1 CELULITIS DE ESTRUCTURAS EXTRAOCULARES. BLEFARITIS Y ORZUELO. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La **blefaritis** es una inflamación difusa del margen del párpado asociada a irritación ocular. La etiología y la fisiopatología de la blefaritis varía en función del tipo (posterior vs. anterior). La blefaritis posterior, el tipo más común, se caracteriza por la inflamación de la porción interna del párpado a nivel de las glándulas de Meibonio, que son disfuncionales. Puede estar asociada a rosácea o a dermatitis seborreica. La blefaritis anterior afecta la piel de los párpados, la base de las pestañas y sus folículos y puede asociarse con colonización estafilocócica o dermatitis seborreica. Las bacterias aisladas con mayor frecuencia se relacionan con la colonización de la piel, *S. aureus* y *S. epidermidis*, y con menor frecuencia *Cutibacterium (Propionibacterium) acnes* y corinebacterias. En la blefaritis posterior también se han aislado hongos como *Malassezia* spp. y parásitos como *Demodex folliculorum* y *Demodex brevis*, que se han implicado en casos de blefaroconjuntivitis crónica.

El diagnóstico microbiológico, con cultivo de los márgenes de los párpados, estaría indicado en pacientes con blefaritis anterior recurrente e inflamación severa, así como en pacientes que no responden al tratamiento. En el caso de sospecha de infección por ácaros del género *Demodex*, puede ser útil la evaluación microscópica de las pestañas. Esto se puede realizar colocando las pestañas extraídas entre porta y cubre agregando una gota de suero fisiológico o fluoresceína.

El orzuelo es una infección aguda de una glándula sebácea palpebral, generalmente causada por *S. aureus*. El orzuelo interno es la infección de una glándula de Meibonio y el externo de una glándula de Zeis. Suelen responder a tratamiento tópico y en general no se realiza diagnóstico microbiológico ya que la incisión y drenaje raramente son necesarios.

3.2 INFECCIONES DEL APARATO LACRIMAL. DACRIOCISTITIS Y DACRIOADENITIS. CANALICULITIS. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La dacriocistitis o inflamación del saco lacrimal representa la infección más frecuente del sistema lacrimal. Se produce como consecuencia de la obstrucción del conducto lacrimal que propicia la acumulación de la secreción lacrimal en el saco lacrimal y su posterior infección. La obstrucción puede ser congénita o adquirida como consecuencia de traumatismos, tumores, infecciones o inflamaciones del conducto lacrimal. Se caracteriza por epifora, dolor e inflamación de tejidos blandos en el canto interno. Los agentes etiológicos más frecuentes en la dacriocistitis aguda son *S. aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, aunque también pueden aislarse *Haemophilus influenzae*, enterobacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas* spp. y anaerobios. La etiología fúngica es poco habitual y en raras ocasiones pueden estar implicadas las micobacterias. Para el diagnóstico etiológico es útil la muestra obtenida por dacriocistorrinostomía o por presión del saco lacrimal.

La dacrioadenitis es la inflamación de la glándula lacrimal. Las infecciones son poco frecuentes y pueden ser agudas o crónicas. En la dacrioadenitis aguda, el tercio externo del párpado superior presenta eritema e hinchazón, y en su evolución puede dar lugar a un cuadro de celulitis preseptal u orbitaria, o bien puede supurar y producir un absceso. El patógeno causal más frecuente es *S. aureus*, aunque los estreptococos (*S. pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*) también pueden verse implicados. Existen casos descritos de dacrioadenitis supurativa aguda producida por *Pseudomonas* spp. o en el contexto de una brucelosis o una cisticercosis. La mononucleosis producida por el virus de Epstein-Barr puede acompañarse de una dacrioadenitis aguda no supurativa, uni- o bilateral, que puede dar lugar a una queratoconjuntivitis seca. La dacrioadenitis infecciosa crónica es poco frecuente y la mayor parte de los casos están causados por *Mycobacterium tuberculosis*. Sin embargo, casi todas las dacrioadenitis crónicas son de origen inflamatorio y no infeccioso.

La caniculitis o inflamación del canaliculo lacrimal puede producirse espontáneamente (generalmente en personas de edad avanzada) o bien tras la colocación de material de silicona en los canaliculos (por ejemplo, los tapones de punto lacrimal empleados en el tratamiento del síndrome del ojo seco) o en el sistema lacrimonasal (los tubos para drenaje lacrimal). El canaliculo inferior se afecta con más frecuencia que el superior. Se caracteriza por hiperemia conjuntival en el área que rodea al canaliculo afectado, y el punto lacrimal esta rojo, dilatado, edematoso y desviado hacia afuera. Con la manipulación del mismo puede obtenerse un exudado amarillo-verdoso y a veces, concreciones o dacriolitos de color amarillento. El agente causal más frecuente es *Actinomyces israelii*. Otros agentes etiológicos son: *Mycobacterium chelonae*, normalmente asociados a tapones de punto lacrimal, y con menor frecuencia se han descrito casos producidos por *Propionibacterium propionicum*, *Nocardia* spp. y anaerobios, como *Fusobacterium* spp.

3.3 CELULITIS PRESEPTAL Y ORBITAL. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La celulitis preseptal afecta a los tejidos anteriores al septo orbitario (párpados) y no a la órbita, mientras que la celulitis orbitaria afecta a los tejidos blandos (grasa, músculo) contenidos en el interior de la órbita

ósea. La órbita ósea está rodeada por los senos paranasales, y esta relación anatómica explica que la sinusitis etmoidal sea la causa más frecuente de infecciones orbitarias. La celulitis preseptal es mucho más frecuente que la celulitis orbitaria y ambas son más frecuentes en los niños de menor edad; aproximadamente el 75% se ven en menores de 5 años.

La celulitis preseptal generalmente se debe a la extensión de infecciones contiguas producidas por traumatismos faciales o palpebrales, picaduras de insectos o mordeduras de animales, sobreinfección de una lesión herpética, conjuntivitis, chalazión o sinusitis. Los agentes patógenos suelen ser *S. aureus* o los estreptococos del grupo A. Otras causas poco frecuentes de celulitis preseptal son las dermatofitosis, las micobacterias atípicas y el carbunco.

Las celulitis orbitarias generalmente son secundarias a la extensión de la infección de los senos adyacentes, especialmente el seno etmoidal. Con menos frecuencia pueden deberse a una infección directa por traumatismo local penetrante o a una cirugía, a diseminación de infecciones faciales o dentales contiguas o a diseminación hematológica.

Los patógenos implicados varían según la etiología y la edad: en los casos asociados a sinusitis el microorganismo más frecuente es *S. pneumoniae*, mientras que en las infecciones secundarias a traumatismos locales predomina *S. aureus* y *S. pyogenes*. La infección por *H. influenzae* tipo b, tras la implantación de la vacunación en niños es mucho menos frecuente. En niños la infección suele ser monomicrobiana y en la edad adulta es más frecuentemente polimicrobiana con infecciones mixtas por aerobios y anaerobios (*Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp.).

Casos especiales son las micosis invasivas que pueden afectar a los senos paranasales e invadir por contigüidad la zona orbitaria como la mucormicosis y la aspergilosis invasiva de los senos. La mucormicosis cerebral con frecuencia se manifiesta como una celulitis orbitaria y debe sospecharse en todo paciente con una celulitis orbitaria y factores de riesgo para sufrir dicha infección (por ejemplo, diabetes mellitus mal controlada, neoplasias hematológicas, inmunodepresión o tratamiento con deferoxamina). La aspergilosis invasiva sinusal también puede producir celulitis orbitaria tras invadir a partir del seno esfenoidal.

El diagnóstico microbiológico suele ser difícil. Los hemocultivos tienen bajo índice de positividad (entre 0%-30% según las series), más frecuentemente en niños que en adultos. Las muestras en las que se obtiene un mayor rendimiento microbiológico son la aspiración del área preseptal, la secreción conjuntival y el material obtenido por drenaje, en los casos en que se realice cirugía. Los cultivos obtenidos por punción-aspiración o durante la cirugía de los senos, también pueden ser útiles en el caso de que la infección sea secundaria a sinusitis.

4. CONJUNTIVITIS

4.1 INTRODUCCIÓN. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La conjuntivitis se define como la inflamación de la conjuntiva, membrana mucosa que recubre la superficie palpebral interna y la parte anterior del globo ocular. Esta membrana está formada por un epitelio superficial y una sustancia propia con tejido conjuntivo laxo y muy vascularizado, lo que hace que los cuadros clínicos de conjuntivitis sean muy llamativos. La conjuntivitis infecciosa supone la entidad más frecuente de infección ocular, afectando a todos los grupos de edad, con una distribución geográfica universal. Su etiología puede ser vírica, bacteriana, fúngica o por parásitos, siendo las dos primeras, con diferencia, las más habituales en nuestro entorno.

El cuadro clínico cursa con escozor y prurito ocular en grado variable, irritación o sensación de cuerpo extraño en el ojo, edema e hiperemia conjuntival y secreción ocular. El tipo de secreción presente orienta hacia un tipo u otro de etiología, siendo la secreción mucopurulenta característica de las conjuntivitis

bacterianas y la secreción serosa o acuosa, característica de las infecciones víricas. A diferencia de la queratitis, el dolor ocular no es un signo frecuente en los casos de conjuntivitis. El tratamiento antibiótico tópico en casos de conjuntivitis bacteriana se asocia a cuadros más leves, de resolución más temprana y menor transmisión de la infección.

Puede clasificarse, atendiendo a su forma de aparición y a la severidad de las manifestaciones, en conjuntivitis aguda (menos de 4 semanas de evolución), hiperaguda o crónica. La mayoría de las conjuntivitis agudas son entidades benignas y autolimitadas, aunque algunas pueden suponer graves problemas oculares y complicaciones extraoculares. El diagnóstico microbiológico de las conjuntivitis infecciosas no suele ser necesario siendo suficiente el diagnóstico clínico. Excepciones en las que sí está indicado hacer un diagnóstico etiológico son los casos de conjuntivitis neonatal (aquella que se presenta en las 4 primeras semanas de vida), conjuntivitis graves, recurrentes, refractarias a la medicación o conjuntivitis crónica purulenta.

4.2 CONJUNTIVITIS VÍRICA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La conjuntivitis vírica supone hasta el 80% de los casos de conjuntivitis aguda, siendo el tipo más frecuente de conjuntivitis en la edad adulta. El diagnóstico es eminentemente clínico y su curso autolimitado. Se caracteriza por secreción acuosa e hiperemia conjuntival y a menudo existe una adenopatía preauricular en el lado afectado. Los virus más frecuentemente implicados son los adenovirus, virus respiratorios y virus del grupo herpes.

Los Adenovirus humanos son los agentes causales más frecuentes (65-90% de los casos de conjuntivitis vírica). Son virus de ADN lineal bicatenario, sin envuelta, protegidos por una nucleocápside icosaédrica formada por 240 capsómeros hexagonales (hexones). Pertenecen a la familia Adenoviridae y al género Mastadenovirus. Hasta la fecha, se han descrito al menos 56 serotipos diferentes. Estos microorganismos se propagan con facilidad a través de fómites, ya que sobreviven varios días e incluso semanas en superficies o soluciones líquidas a temperatura ambiente, o por contacto directo con las secreciones conjuntivales. Las dos formas clínicas más frecuentes son la fiebre faringoconjuntival (serotipos 3, 4 y 7 fundamentalmente), caracterizada por aparición abrupta de fiebre, faringitis y conjuntivitis folicular bilateral que suele resolverse espontáneamente en dos semanas, y la queratoconjuntivitis epidémica (serotipos 8 y 19 entre otros). Esta segunda entidad supone mayor riesgo, pudiendo producir secuelas corneales durante meses.

La conjuntivitis por virus herpes simple (VHS) suele ser unilateral, difusa, con secreción serosa y acompañada a menudo de la aparición de vesículas herpéticas en la piel periocular o en el borde palpebral. Junto con *Chlamydia trachomatis* y *Neisseria gonorrhoeae* supone una de las causas más frecuentes de infección conjuntival en el recién nacido a nivel mundial. El VVZ (virus varicela-zoster) tiene poco protagonismo como causante de conjuntivitis, aunque hasta un 4% de los pacientes con varicela poseen alteraciones conjuntivales y/o corneales, presentándose papilas en los párpados, la conjuntiva y el limbo.

La conjuntivitis hemorrágica aguda es una entidad asociada a Enterovirus D70 y a Coxsackievirus A24 (Enterovirus). Hay una rápida aparición de conjuntivitis papilar grave, dolorosa, con quemosis, lacrimo y hemorragias subconjuntivales que se vuelven confluentes. Los casos se dan fundamentalmente en países en vías de desarrollo y es muy poco frecuente en nuestro medio.

El diagnóstico microbiológico de las conjuntivitis víricas no suele llevarse a cabo, y si se hace es fundamentalmente con fines epidemiológicos. Debe recogerse un exudado o raspado conjuntival con un hisopo estéril de dacrón y transportarse con medio de transporte adecuado para virus, evitándose los hisopos de alginato cálcico y aquellos con bastón de madera. El *gold standard* clásico se ha considerado el cultivo en líneas celulares, aunque hoy en día las técnicas moleculares de PCR lo han desplazado por poseer una mayor sensibilidad y un mucho menor tiempo de respuesta. Actualmente existen diferentes protocolos de PCR a tiempo final o a tiempo real diseñadas *in-house* y técnicas comerciales con marcado CE-IVD que

se emplean para la detección molecular de adenovirus y virus del grupo herpes en muestras conjuntivales. Entre las técnicas comerciales destacan las PCR a tiempo real diseñadas con tecnología Taqman, muchas con formato multiplex, (Fast Track Diagnostics® de Siemens, RealStar® Adenovirus de Altona, Adenovirus R-Gene®, HSV1-HSV2-VZV R-Gene® de Biomérieux, entre otros) o PCR y detección por sondas de captura en *arrays* (CLART® ENTHERPLEX de Genomera). Debe tenerse en cuenta que el uso de sustancias tóxicas con frecuencia empleadas en la consulta de oftalmología previo a la toma de muestra como ciertos anestésicos o tinciones con fluoresceína pueden tener efectos inhibidores de la PCR a tiempo real, por lo que si estos se han empleado, se recomienda lavar el ojo con solución salina previo a la toma de muestra.

El cultivo se puede realizar en diferentes líneas celulares comunes en los laboratorios de virología, seleccionando la línea celular más adecuada al tipo de virus que se quiera cultivar. La muestra de exudado conjuntival se debe agitar en vortex durante 30-60 segundos para que las partículas virales se desprendan de la torunda hacia el medio de transporte de virus que posteriormente se inoculará en los cultivos celulares. Tras el tiempo de incubación puede observarse el efecto citopático viral y realizar su identificación por diferentes métodos. El diagnóstico puede acelerarse si se realiza el cultivo con el sistema *shell-vial* y posterior tinción con el anticuerpo monoclonal específico. Este sistema se recomienda especialmente en caso de detección de VVZ, donde el tiempo de cultivo puede ser más largo, aunque debe tenerse en cuenta que en el caso de los adenovirus la sensibilidad se ve disminuida respecto al cultivo convencional.

Las técnicas de detección de antígeno por inmunofluorescencia directa o indirecta en muestras de exudado conjuntival no están indicadas hoy en día para el diagnóstico de conjuntivitis víricas por su baja sensibilidad.

En cuanto a las técnicas *point-of-care*, tanto la FDA como la CE han aprobado una prueba de inmunocromatografía (AdenoPlus™ -RPS ADP; Rapid Pathogen Screening Inc.) capaz de detectar antígeno de Adenovirus en lágrimas del paciente. Está concebido para su realización en las consultas de oftalmología o de atención primaria con un tiempo de respuesta de 10 minutos. Los datos de sensibilidad y especificidad varían según los estudios publicados entre un 40-93% y un 95-98% respectivamente.

4.3 CONJUNTIVITIS BACTERIANA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOPATOGENIA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La presentación clínica de la conjuntivitis bacteriana se caracteriza por la aparición rápida de edema palpebral unilateral, hiperemia conjuntival y secreción mucopurulenta, que suele hacerse bilateral en el periodo de un par de días. Éstas se dan con mayor frecuencia en población pediátrica que en adultos. La conjuntivitis bacteriana puede contraerse por contacto directo con secreciones de individuos infectados, a través de fómites o por inoculación al frotar los ojos con las manos contaminadas, o puede deberse en otros casos a la proliferación anormal de la microbiota saprofita de la conjuntiva.

En condiciones normales el epitelio conjuntival intacto supone un mecanismo de defensa frente a la mayor parte de las bacterias, pero hay factores como la sequedad ocular, traumatismos epiteliales o inmunosupresión, predisponentes para la infección de la conjuntiva. Las lesiones en la conjuntiva y los métodos de unión especializados de algunas bacterias permiten la adherencia de los microorganismos, causando la entrada de productos y toxinas bacterianas. Desde un punto de vista clínico las conjuntivitis bacterianas pueden clasificarse en agudas, hiperagudas o crónicas.

La conjuntivitis aguda bacteriana está producida principalmente por *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*. En niños, es más frecuente la infección por *H. influenzae*, *S. pneumoniae* y *Moraxella catarrhalis*, a menudo asociadas a infecciones de vías respiratorias altas. *S. pyogenes*, enterobacterias y otros bacilos gramnegativos también se encuentran entre los microorganismos causales más frecuentes. La microbiota habitual de la piel, como las corinebacterias pueden verse implicadas en cuadros de conjuntivitis. Es el caso de *Corynebacterium macginleyi*, bacteria lipofílica que desde que se describió por primera vez por Riegel y cols. en 1995, se ha aislado de forma significativa en cultivos de muestras conjuntivales y corneales de pacientes sintomáticos en diferentes países, entre ellos el nuestro.

La conjuntivitis bacteriana hiperaguda supone un desarrollo muy rápido de un cuadro severo de conjuntivitis hiperpurulenta, con marcado edema palpebral y disminución de la visión que evolucionan con infiltrados y úlceras corneales, y que puede llegar a perforar la córnea. El agente etiológico fundamental es *N. gonorrhoeae*, que tiene la capacidad de penetrar epitelio corneal sano. Estos cuadros se han dado tradicionalmente con más frecuencia en neonatos (*oftalmia neonatorum*) al infectarse en el canal del parto, pero actualmente su incidencia en países desarrollados es muy baja, debido a los programas de cribado en la mujer embarazada y a la profilaxis oftálmica neonatal, dándose la mayoría de los casos en adultos jóvenes sexualmente activos por contacto con secreciones genitales. *Neisseria meningitidis* también está asociada a conjuntivitis hiperaguda, aunque produce cuadros menos agresivos.

Por último, la conjuntivitis bacteriana crónica se define como aquella que se prolonga durante más de 4 semanas. Suele cursar con engrosamiento conjuntival, hiperemia difusa y secreción mucopurulenta escasa. Los principales microorganismos asociados son *S. aureus*, *Moraxella lacunata* y las enterobacterias.

El tipo de muestra requerido para el diagnóstico microbiológico es un exudado o raspado conjuntival. La recogida debe hacerse siempre que sea posible antes de la instauración de tratamiento antibiótico y evitando el uso de colirios previo a la toma de muestra. Debido a que los párpados y la conjuntiva están colonizados normalmente por microbiota bacteriana, la recogida en paralelo de exudado conjuntival del ojo afectado y del ojo sano, ayuda en la interpretación de los resultados.

La muestra debe inocularse en placas de agar sangre de carnero 5% y de agar chocolate. Si se sospecha la presencia de *N. gonorrhoeae* puede sembrarse adicionalmente un medio selectivo (agar Thayer-Martin, Martin Lewis o New York City). En el caso de pacientes hospitalizados puede añadirse también una placa de agar MacConkey. La muestra se inocula directamente frotando la torunda en un tercio de la placa y se procede al reaislamiento al menos con tres estrías. Si se sospecha infección por *N. gonorrhoeae*, debe tenerse en cuenta que es un microorganismo muy lábil a las condiciones ambientales por lo que las placas de cultivo deben estar atemperadas antes de la inoculación de la muestra. Las placas se incubarán inmediatamente en estufa con un 5-7% de CO₂ a 35-37°C durante 48-72 horas.

En los casos de conjuntivitis hiperaguda y de *oftalmia neonatorum* está indicado hacer una tinción de Gram, ya que la evolución de la infección puede ser muy rápida. Además, es de ayuda a la hora de interpretar los aislamientos microbiológicos, ya que la visualización de bacterias en las tinciones generalmente indica un inóculo significativo. La presencia de leucocitos y bacterias intracelulares también son indicativos de infección por esos microorganismos. Para su realización, además de recogerse la muestra para cultivo bacteriano, deberá remitirse una segunda torunda sin medio de transporte para realizar el frotis (rotando la torunda por el portaobjetos) y tinción.

A la hora de interpretar los aislamientos microbiológicos debe tenerse en cuenta que, en ausencia de infección, la conjuntiva está normalmente colonizada por estafilococos coagulasa negativa (SCN), *Corynebacterium* spp. y *Cutibacterium (Propionibacterium)* spp. fundamentalmente, pero también en menor proporción por otros microorganismos típicamente productores de conjuntivitis como *S. aureus*, *H. influenzae* o *Moraxella* spp.

Se valora siempre como significativa la presencia de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, y enterobacterias. El aislamiento de otros microorganismos típicamente colonizadores puede interpretarse como significativo si se observa un crecimiento confluyente en la placa de medio de cultivo, si el cultivo en paralelo con el ojo sano muestra diferencias significativas y/o si en el análisis microscópico por tinción de Gram se encontraron morfotipos bacterianos concordantes con el cultivo.

4.4 CONJUNTIVITIS POR *Chlamydia trachomatis*. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La infección ocular por *C. trachomatis* produce tanto patologías agudas como crónicas. Existen diversos serotipos de *C. trachomatis* (según la proteína principal de la membrana externa) que se engloban en diferentes biovars. El biovar tracoma incluye los serotipos A-C, el biovar linfogranuloma venéreo los serotipos L1-L2-L3 y el biovar de la enfermedad oculogenital no invasiva los serotipos D-K.

Las infecciones repetidas por los serotipos A-C son causantes del tracoma, una queratoconjuntivitis folicular crónica que supone la primera causa de ceguera evitable en el mundo. Esta enfermedad, endémica en algunas zonas de África subsahariana, Asia, Oriente medio, sur y centro de América y Australia, está asociada al hacinamiento y a condiciones higiénico-sanitarias deficientes. La enfermedad consta de una fase aguda (más común en niños menores de 5 años) de conjuntivitis folicular en el párpado superior con descarga mucoide, seguida de una fase crónica caracterizada por cicatrices en la conjuntiva, cornea y párpados, con pérdida de visión e incluso ceguera irreversible. Gracias a la iniciativa de la OMS de erradicación del tracoma para el año 2020 (programa "SAFE"), la prevalencia de esta enfermedad ha ido descendiendo considerablemente en los últimos años, a pesar de lo cual la cifra de tracoma activo actualmente en el mundo se estima en 21 millones de casos y 1,2 millones de casos de ceguera.

Los serotipos D-K (primera causa de infección de transmisión sexual bacteriana a nivel mundial) pueden causar conjuntivitis folicular o de inclusión en el adulto, o conjuntivitis neonatal. En el adulto la mayoría de los casos de conjuntivitis de inclusión se dan concomitantemente con la infección genital. Suele producir una conjuntivitis unilateral, con hiperemia marcada, secreción mucopurulenta y reacción folicular. Generalmente tiene un curso benigno, aunque algunos casos pueden cronificar. En el caso de los neonatos, la infección se adquiere desde la madre al atravesar el canal del parto. Las estrategias de prevención de la conjuntivitis neonatal con agentes tópicos como la pomada de eritromicina al 0,5% o tetraciclina al 1% muestran escasa eficacia frente a *C. trachomatis*, aconsejándose actualmente el cribado sistemático de la mujer embarazada. Suele aparecer un exudado mucopurulento entre los 5 y 14 días tras el parto y a diferencia de la conjuntivitis de inclusión del adulto no se produce reacción folicular. La infección puede producir cicatrización de la conjuntiva y la córnea y acompañarse de otros cuadros clínicos como neumonía y otitis media.

El diagnóstico de estas conjuntivitis puede realizarse por cultivo celular, inmunofluorescencia directa o, más frecuentemente, por técnicas moleculares. Debido a que *Chlamydia* spp. es una bacteria intracelular, para su diagnóstico es necesario que la muestra tomada arrastre células conjuntivales y no sea simplemente del exudado. El cultivo se realiza en líneas celulares, el cual aporta una sensibilidad entre el 70-85% con una especificidad cercana al 100%. Es una técnica lenta y laboriosa por lo que se encuentra en desuso. La inmunofluorescencia directa (IFD) para la detección de *C. trachomatis* en frotis de exudado conjuntival es una técnica rápida, con una sensibilidad algo menor que el cultivo y que requiere de personal entrenado en la visualización microscópica. En aquellos laboratorios en los que no se dispone de técnicas moleculares la IFD es una técnica adecuada que puede aportar un diagnóstico rápido. Las técnicas de PCR se emplean con mayor frecuencia y se consideran de elección para la detección de estos microorganismos debido a su gran sensibilidad y rapidez. Hay numerosos sistemas comercializados por diferentes laboratorios (GeneXpert® de Cepheid, Aptima® Hologic, Amplicor® de Roche entre otros) para la detección molecular de *C. trachomatis* (la mayoría de ellos en combinación con *N. gonorrhoeae*), que se basan en la amplificación de dianas en un plásmido críptico, DNA cromosómico y/o ARNr y que detectan los diferentes biovars de *C. trachomatis*. A pesar de que la gran mayoría de estas técnicas no están aprobadas por la FDA ni por la CE para su uso en muestras conjuntivales, su uso está ampliamente extendido en los laboratorios de microbiología clínica.

La detección de *C. trachomatis* en una muestra conjuntival es siempre significativa y en estos casos está indicado el tratamiento antibiótico sistémico.

4.5 CONJUNTIVITIS FÚNGICA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La conjuntivitis fúngica se trata de una entidad muy poco frecuente y relacionada fundamentalmente con especies del género *Candida* que pueden crecer de manera oportunista tras el tratamiento tópico con corticoides y antibióticos. *Sporothrix schenckii* y *Blastomyces dermatitidis* son otros de los hongos que se han descrito como causa de conjuntivitis granulomatosa. Para el cultivo de estos microorganismos se puede emplear una placa de Sabouraud o agar BHI con o sin sangre de carnero, incubándolas a 30°C en aerobiosis hasta 7 días.

Los microorganismos del filo Microsporidia, tradicionalmente clasificados como protozoos, son hongos intracelulares obligados formadores de esporas. Algunas especies de este filo pueden producir un cuadro de queratoconjuntivitis en pacientes inmunodeprimidos. Su diagnóstico requiere de alta sospecha clínica y pueden detectarse las esporas en la muestra clínica por microscopía óptica, con una tinción fluorescente con blanco de calcoflúor o mediante tinción tricrómica modificada.

4.6 CONJUNTIVITIS POR PARÁSITOS. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Diferentes parásitos pueden producir una conjuntivitis como infección primaria. *Leishmania* spp. produce una blefaroconjuntivitis que puede comenzar como un edema e hiperemia que progresa a la formación de vesículas conjuntivales. Estas pueden evolucionar a la formación de abscesos e incluso llegar a perforar la córnea. El helminto *Loa Loa* supone otra causa de conjuntivitis parasitaria endémica en el oeste y centro de África. Su diagnóstico se confirma por la visualización de la filaria por parte del oftalmólogo entre la conjuntiva y la esclera. Otras conjuntivitis se producen secundariamente a la presencia de un parásito en las pestañas, como reacción al mismo o a sus excrementos. Es el caso de las producidas por la presencia de *Phthirus pubis* en las pestañas o *Demodex follicularum*.

5. QUERATITIS

5.1 INTRODUCCIÓN Y TIPOS. EPIDEMIOLOGÍA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

La queratitis es una inflamación de la córnea que puede o no tener origen infeccioso. Según la porción de la córnea afectada puede clasificarse en epitelial, cuando afecta a la capa más superficial, y del estroma o endotelial cuando afecta a las siguientes capas más profundas. Puede ser leve, moderada o grave y puede ser aguda o crónica y afectar a uno solo de los ojos o a los dos. Cuando se asocia a la inflamación de la conjuntiva, se denomina queratoconjuntivitis y cuando afecta a la úvea, queratouveítis.

La queratitis infecciosa puede amenazar la visión y requiere un diagnóstico rápido. Ciertos microorganismos pueden producir perforación de la córnea en menos de dos días y provocar una endoftalmitis que puede ocasionar pérdida de visión o incluso del ojo. Es importante distinguir la queratitis infecciosa de la producida por otras causas, los signos clínicos que lo permiten son la presencia o ausencia de un defecto epitelial, si hay o no inflamación del estroma, si esta es supurativa o no y su localización.

Cualquier microorganismo conocido podría causar queratitis microbiana, siempre que se den las condiciones y los factores predisponentes adecuados. Generalmente los microorganismos no causan queratitis en individuos inmunocompetentes y que conserven intacta la superficie corneal, a excepción de algunas bacterias invasivas. Uno de los principales factores de riesgo es la alteración de la superficie corneal, por trauma (quirúrgico o no) o por lentes de contacto. Los factores del hospedador que facilitan la queratitis son la inmunodeficiencia, diabetes mellitus, queratopatías, alteraciones de la superficie y anomalías anatómicas.

En los países en desarrollo los principales factores de riesgo son los traumas oculares no quirúrgicos. Por el contrario, en los países desarrollados el principal factor predisponente es el empleo de lentes de contacto. La incidencia anual de queratitis en usuarios de lentes de contacto de un solo uso se estima en 0,04%, pero se multiplica entre diez y quince veces en lentes de uso extendido y por doce si las de un solo uso se mantienen durante la noche. También son factores de riesgo el mantener las lentes durante la inmersión en bañeras de hidromasaje, la mala higiene de las lentes de uso extendido, el no frotarlas y enjuagarlas adecuadamente durante la limpieza, emplear agua no estéril y la mala higiene de las cajas donde se guardan.

5.2 QUERATITIS BACTERIANA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Las bacterias son responsables de la mayoría de los casos de queratitis microbiana, entre el 65% y 90% según diferentes estudios. La mayoría están producidas por microorganismos grampositivos, especialmente por cocos grampositivos. Entre ellos, los más frecuentes son los estafilococos. *S. aureus* puede invadir la córnea y los estafilococos coagulasa negativa pueden causar queratitis en pacientes inmunodeprimidos. *S. epidermidis* y algunos *Streptococcus* spp. podrían causar úlceras por reacciones de hipersensibilidad a alguna exotoxina o antígeno del microorganismo y no ser por ello de etiología infecciosa. *S. pneumoniae* era más frecuente en el pasado, pero su incidencia ha disminuido, al igual que los estreptococos β -hemolíticos. Los estreptococos del grupo *viridans* tienen una menor implicación, aunque son los microorganismos más frecuentemente aislados en la queratopatía cristalina infecciosa. Los bacilos grampositivos, son infrecuentes y en algunas series, sólo *Bacillus* spp. está presente.

En algunos países la queratitis por bacterias gramnegativas está aumentando, entre ellas *P. aeruginosa* es la más habitual. Debido a su adherencia a ciertas lentes, esta bacteria es resistente a su limpieza con soluciones de lavado. *P. aeruginosa* es de especial virulencia y puede causar conjuntivitis y queratitis de evolución rápida, pudiendo producir panoftalmitis con pérdida del globo ocular. La lesión puede estar rodeada de un anillo inflamatorio de neutrófilos característico, similar a la queratitis por virus, hongos o amebas. *P. aeruginosa* también puede producir queratitis en unidades de cuidados intensivos. Enterobacterias, otras *Pseudomonas* spp. otros bacilos gramnegativos no fermentadores, *H. influenzae* y *Moraxella* spp. también pueden producir queratitis. Otros gramnegativos podrían producirla de forma más inhabitual.

Con el empleo de la cirugía refractiva, especialmente la queratomileusis *in situ* asistida por láser (LASIK), ha aumentado las queratitis por *Nocardia* spp. y especialmente por algunas especies de micobacterias no tuberculosas, sobre todo *Mycobacterium chelonae*, pero también *M. fortuitum* y *M. abscessus*. Estas infecciones siguen un curso indolente y a veces son difíciles de erradicar por su resistencia a los antibióticos. *M. tuberculosis* puede producir queratitis intersticial. Otras causas de queratitis intersticial pueden ser la sífilis congénita y la enfermedad de Lyme. Las infecciones repetidas por ciertos serotipos de *C. trachomatis* pueden causar una queratoconjuntivitis folicular crónica denominada tracoma. En nuestro país las publicaciones de amplias series indican que los agentes etiológicos más frecuentes son los estafilococos (*S. aureus* y estafilococos coagulasa negativa), *P. aeruginosa*, *Streptococcus* spp. y *Cutibacterium (Propionibacterium)* spp.

El diagnóstico microbiológico se realiza habitualmente mediante siembra en agar sangre, agar chocolate y caldo tioglicolato. Cuando se sospeche la presencia de otros microorganismos se pueden añadir medios para anaerobios, micobacterias, o emplear las técnicas serológicas o técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (TAAN) adecuadas.

5.3 QUERATITIS VÍRICA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Los principales virus relacionados con queratitis son el virus del herpes simple (VHS), el de la varicela-zoster (VVZ) y adenovirus. El primero de ellos es el más frecuente en países desarrollados. El tipo 1 suele ser el implicado y produce dolor brusco, visión borrosa, sensación de quemazón conjuntival y erosiones

dendríticas. La queratitis puede deberse a una infección primaria o a una reactivación. Suele limitarse a la capa epitelial, pero puede extenderse al estroma corneal produciendo cicatrices y opacificación. La queratitis herpética recidivante es la causa más frecuente de ceguera corneal. Debido a la vacunación contra la varicela, la queratitis por el virus de la varicela-zóster es cada vez más infrecuente. Ha de sospecharse en el caso de una varicela aguda o reciente. Puede producir queratitis punteada o pseudodendrítica. Varios serotipos de adenovirus pueden producir queratoconjuntivitis epidémica, muy contagiosa. Los enterovirus y también otros virus, con menor frecuencia, pueden estar relacionados con queratitis epitelial leve (Tabla 1). El diagnóstico microbiológico se basa habitualmente en las TAAN.

5.4 QUERATITIS FÚNGICA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La etiología fúngica de las infecciones corneales es menos habitual que las producidas por bacterias y virus. La queratitis por *Candida* spp. suele adquirirse de la propia microbiota, teniendo un origen endógeno. Las producidas por hongos filamentosos son más frecuentes en lugares calurosos y húmedos y suelen penetrar en la córnea por infecciones traumáticas con plantas o vegetales (origen exógeno). En general, los pacientes con queratitis fúngica comienzan con síntomas y signos de inflamación más leves que los de la queratitis bacteriana. Sin embargo, cuando progresan pueden producir una amplia supuración similar a la producida por bacterias, y la inflamación puede extenderse a la cámara anterior. La variedad de hongos que pueden causar queratitis exógena es muy amplia (Tabla 1), ya que en el caso de los hongos filamentosos depende de su presencia en el cuerpo extraño que ha causado el trauma. *Fusarium* spp. es el que se aísla con más frecuencia, seguido de *Aspergillus* spp.

La queratitis por *Candida* spp. se ve favorecida por ulceraciones prolongadas, corticoides tópicos, cirugía clásica o con láser, herpes ocular previo, inmunosupresión y el empleo de algunas lentes de contacto, a las que puede adherirse. Las producidas por *Fusarium* spp. pueden tener el origen en las lentes de contacto, también se ha descrito un extenso brote entre los usuarios de un tipo de solución de lentes de contacto. El diagnóstico microbiológico se basa habitualmente en la visualización microscópica con naranja de acridina, blanco de calcofluor o azul de lactofenol y en la siembra en un medio sin inhibidores, como el agar glucosado de Sabouraud

5.5 QUERATITIS POR PARÁSITOS. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Varios protozoos, helmintos y ectoparásitos pueden producir infecciones de la córnea (Tabla 1). La epidemiología de estas infecciones parasitarias refleja el hábitat del agente causal. En nuestro país el que tiene más importancia es el protozoo perteneciente al género *Acanthamoeba* que puede producir la denominada queratitis amebiana.

La infección por esta ameba de vida libre suele asociarse al uso de lentes, que provocan pequeños traumatismos o ulceraciones en el epitelio corneal, como factor predisponente, y a la utilización de soluciones contaminadas. La queratitis amebiana produce mucho dolor, fotofobia, lacrimo y visión borrosa. Las amebas se adhieren primeramente al epitelio de la córnea y pueden posteriormente invadir el estroma, pudiendo producir pérdida de visión e incluso enucleación. Suele ser recurrente y debe diferenciarse de la queratitis producida por el VHS. Para prevenirla ha de evitarse preparar en casa soluciones de lentes de contacto, ya que el agua del grifo puede contener *Acanthamoeba* spp. En un brote descrito, la queratitis amebiana se asoció a una determinada solución para lentes de contacto, que fue posteriormente retirada del mercado.

Otros protozoos (Tabla 1) pueden producir queratitis durante su infección sistémica, como es el caso de la leishmaniasis visceral, o por la migración de las larvas de *Toxocara* spp. o las microfilarias de *Onchocerca volvulus* y *Loa-loa* a la córnea. Estos parásitos son de menor incidencia en nuestro país.

En el caso de la queratitis amebiana, el diagnóstico se realiza mediante tinción y visualización al microscopio, cultivo en medio no nutritivo con *E. coli* o TAAN.

6. ENDOFTALMITIS

6.1. INTRODUCCIÓN Y TIPOS

La endoftalmitis es la inflamación de la cavidad vítrea y de los componentes retiniano y uveal del ojo. Según la causa de la inflamación puede ser de dos tipos: infecciosa o no infecciosa. La endoftalmitis infecciosa se define como la infección del humor vítreo y/o del humor acuoso por bacterias u hongos. Las infecciones intraoculares por virus o parásitos usualmente se consideran como tipos de uveítis. Según el modo de entrada del microorganismo en el globo ocular las endoftalmitis se clasifican en exógenas y endógenas. La endoftalmitis exógena se produce por inoculación directa desde el exterior del microorganismo, mientras que la endógena se produce por diseminación hematológica de bacterias u hongos, desde un foco infeccioso primario hasta el globo ocular. Dependiendo del evento causal la endoftalmitis exógena se divide en: postquirúrgica (principalmente tras cirugía de cataratas), postvitrectomía, postqueratoplastia, postinyección intravítrea, postraumática (si es después de un trauma ocular), asociada a cirugía corneal filtrante y relacionada con queratitis. Es importante identificar el tipo de endoftalmitis, ya que influye en la presentación clínica, la etiología, el abordaje terapéutico y el pronóstico visual.

6.2 ENDOFTALMITIS POSTQUIRÚRGICA AGUDA TRAS CIRUGÍA DE CATARATAS. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La endoftalmitis postoperatoria es una de las complicaciones más graves de la cirugía de cataratas que requiere un diagnóstico rápido y tratamiento inmediato. En conjunto, la endoftalmitis postquirúrgica se presenta entre el 40- 80% del total de los casos de endoftalmitis. La endoftalmitis tras cirugía de cataratas es la forma clínica más frecuente y su incidencia es de aproximadamente el 0,1%. Clínicamente se manifiesta dentro de las primeras 6 semanas tras el procedimiento quirúrgico. Suele cursar con disminución de la visión, dolor ocular con intensa fotofobia, hipopión y edema conjuntival. Pero la característica fundamental es la vitritis progresiva con opacidad del polo anterior.

La infección bacteriana se origina por contaminación del interior del globo ocular con la microbiota de la superficie ocular o de los párpados tras la incisión quirúrgica. En un tercio de las muestras de humor acuoso tomadas al final de la cirugía hay crecimiento bacteriano. Sin embargo, solo en una de cada mil cirugías de cataratas se desarrolla una endoftalmitis. Esto se cree que es debido a la capacidad del sistema inmunológico para eliminar pequeños inóculos de bacterias de baja virulencia y al constante recambio del humor acuoso. La patogénesis de la endoftalmitis resulta de una interacción entre la virulencia del microorganismo, la cantidad de inóculo del microorganismo y la respuesta inmune del huésped.

Los microorganismos más frecuentemente aislados en la endoftalmitis aguda tras cirugía de cataratas son los cocos grampositivos (hasta en el 95% de los casos) con un predominio claro de los estafilococos coagulasa negativa (70%). La precocidad en la presentación (en los dos primeros días) debe hacer sospechar de microorganismos más virulentos como *S. aureus* (10%) y estreptococos (9%). Normalmente son infecciones monomicrobianas, aunque en una pequeña proporción de casos la infección puede ser polimicrobiana, con bacterias grampositivas (5%) y bacilos gramnegativos (6%). La infección postoperatoria por hongos es poco frecuente excepto en regiones tropicales.

El diagnóstico de la endoftalmitis tras cirugía de cataratas es inicialmente clínico. Una vez diagnosticada clínicamente, el papel del laboratorio de Microbiología es confirmar el diagnóstico lo antes posible para guiar la selección y administración de los antimicrobianos más apropiados. Para ello se deben recoger de forma inmediata muestras intraoculares para el cultivo, las tinciones, y las pruebas de diagnóstico molecular. La toma de las muestras del humor acuoso se realiza por paracentesis con aguja y jeringa de la cámara anterior. El humor vítreo se puede obtener por punción-aspiración con aguja y jeringa para obtener

una biopsia vítrea. Sin embargo, no siempre es posible obtener una muestra de este modo ya que, el humor vítreo al ser un gel, puede ser difícil de aspirar. En estos casos, y si hay indicación clínica, se pueden obtener las muestras vítreas quirúrgicamente mediante una vitrectomía vía *pars plana* (VPP). Los cultivos vítreos tras una vitrectomía tienen mayor rentabilidad que un aspirado vítreo con aguja y jeringa (90% vs. 75%). La vitrectomía juega un papel importante en el manejo de la endoftalmitis, tanto diagnóstica como terapéuticamente. Permite obtener una mayor cantidad de muestra y reducir la carga microbiana y la inflamación. Aunque el *endophthalmitis vitrectomy study* (EVS) sólo recomendaba la vitrectomía cuando la agudeza visual fuera de “percibe luz”, las guías de la *European Society of Cataract and Refractive Surgeons* (ESCRS) la recomiendan también en casos agudos aunque la visión sea mejor. Actualmente algunos autores indican que una vitrectomía VPP es apropiada en casos de vitritis donde el diagnóstico es incierto, en casos de infección por hongos y en la endoftalmitis bacteriana que no responde al tratamiento antimicrobiano intravítreo.

La vitrectomía vía *pars plana* se realiza en el quirófano con un vitreotomo, que es un instrumento mecanizado que corta y aspira rápidamente el vítreo mientras se mantiene la turgencia ocular por sustitución simultánea del contenido vítreo con solución salina balanceada. Si no se dispone de un quirófano se puede realizar la vitrectomía o una biopsia vítrea en la consulta oftalmológica con un vitreotomo portátil. Al inicio de la vitrectomía se recoge una muestra vítrea no diluida en una jeringa antes de que se active la infusión de solución salina balanceada. Esta muestra de vítreo no diluido es recomendable que se inocule directamente en los medios de cultivo por el oftalmólogo en el momento de su extracción. En caso de no ser posible puede enviarse al laboratorio para su cultivo o inocularlo en viales de hemocultivos. La rentabilidad del uso de hemocultivos con vítreo no diluido oscila entre el 69-100%.

Al final de la vitrectomía lo que se obtiene es una muestra de vítreo diluido que se debe enviar al laboratorio, en el *cassette* de vitrectomía o en un envase estéril, para su cultivo. Para aumentar la rentabilidad del cultivo los vítreos diluidos se concentran por centrifugación o por filtración al vacío a través de papel de filtro de 0,45 µm. El cultivo del filtrado del vítreo diluido tiene un rendimiento superior al cultivo del vítreo no diluido. Una alternativa al cultivo de las muestras vítreas diluidas es su inoculación en viales de hemocultivo. La rentabilidad diagnóstica de la inoculación en botellas de hemocultivo es similar a la obtenida mediante la filtración, aunque con algunas diferencias cualitativas. Mientras que con el sistema de filtro de membrana se recuperan mejor algunos microorganismos como los hongos y las micobacterias, en las botellas de hemocultivo crecen mejor las bacterias grampositivas. Por tanto, el uso de ambos métodos es complementario y proporciona mayor número de resultados positivos.

Las tinciones de Gram y calcoflúor proporcionan una confirmación inmediata de la naturaleza infecciosa de la inflamación postoperatoria. No obstante, a pesar de su alto valor predictivo positivo tiene una sensibilidad baja. En el estudio EVS, la tinción de Gram fue positiva en el 43% de las muestras de humor vítreo y en el 19% de las de humor acuoso.

6.3 ENDOFTALMITIS POSTQUIRÚRGICA TRAS CIRUGÍA DE CATARATAS DE COMIENZO TARDÍO O CRÓNICA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La endoftalmitis postcataratas de comienzo tardío se caracteriza por una inflamación insidiosa que se manifiesta semanas o meses después de la cirugía en forma de una iridociclitis o vitritis crónica. Este tipo de endoftalmitis es menos frecuente que la forma aguda y puede estar causada tanto por bacterias como por hongos. Se presenta con signos y síntomas clínicos más leves que la endoftalmitis aguda.

El microorganismo más frecuentemente aislado en este tipo de endoftalmitis es *C. acnes*. Otros microorganismos aislados son *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp. y *Actinomyces* spp. Entre los hongos son las especies del género *Candida* las que se aíslan con mayor frecuencia. La presentación clínica puede dar indicios de si se trata de una infección bacteriana o fúngica. Las formas bacterianas presentan un patrón de respuesta aparente a los corticoides tópicos seguida de una recidiva cada vez que son retirados. En el caso de las infecciones por hongos, la inflamación puede empeorar incluso con el uso de corticoides.

Además, el aspecto "agrupado" de la inflamación intraocular y el hipopión en forma de pirámide son típicos de una causa micótica. La presencia de microplacas blanquecinas sobre la cápsula posterior de la lente es un indicio de la endoftalmitis crónica por *C. acnes*. Mientras que la vitritis densa difusa es típica de la endoftalmitis crónica por *S. epidermidis*.

El diagnóstico microbiológico de la endoftalmitis postcataratas de comienzo tardío es similar al descrito en la endoftalmitis postquirúrgica aguda. Se inicia con recogida de muestras de la cámara anterior y de una biopsia vítrea con aguja, que suele ser negativa, por lo que es necesario realizar una vitrectomía. La toma de muestras debe estar dirigida a aspirar material lo más cerca de la cápsula y la lente intraocular. Si no es posible la obtención de un aspirado y se observa placa capsular, ésta puede ser extraída durante la vitrectomía. El aspirado de la placa capsular es la muestra con mayor rentabilidad diagnóstica para el aislamiento de *C. acnes*. Muchos de los microorganismos asociados con la endoftalmitis crónica postoperatoria son de crecimiento lento por lo que, ante la sospecha de una infección de este tipo, los cultivos se deben incubar hasta 10 días. Aun así, los cultivos pueden ser negativos. En este caso se recomienda el uso de técnicas moleculares que ofrecen una mayor sensibilidad para la detección de inóculos bajos de microorganismos.

6.4 ENDOFTALMITIS POSTVITRECTOMÍA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La endoftalmitis postvitrectomía es menos frecuente que la endoftalmitis tras cirugía de cataratas con una incidencia que oscila del 0,02 al 0,06%. Sin embargo, su presentación clínica y etiología son similares. Se manifiesta habitualmente dentro de las primeras 48 horas tras el procedimiento quirúrgico. La mayoría de los casos están causados por estafilococos coagulasa negativa. Los métodos de diagnóstico microbiológico son los mismos que los ya descritos en la endoftalmitis postcirugía de cataratas. La positividad del cultivo en la endoftalmitis tras vitrectomía VPP ha sido bastante variable a través de los años. En casi todos los estudios casi el 50% de los cultivos son positivos.

6.5. ENDOFTALMITIS POSTQUERATOPLASTIA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La endoftalmitis infecciosa postqueratoplastia es una complicación grave del trasplante de córnea que puede conducir a la pérdida del injerto. Puede ser aguda (dentro de 6 primeras semanas) o tardía (sucede después de las 6 semanas tras el trasplante). Su incidencia en los casos agudos es del 0,2%, pero puede llegar hasta el 0,7% si se incluyen los casos de inicio tardío. El diagnóstico es clínico y se basa en el examen del injerto que aparece opaco y edematoso. En los casos de inicio agudo se presenta una grave reacción en cámara anterior, hipopión y pérdida de reflejo rojo. En los casos de inicio tardío aparecen infiltrados o abscesos en la sutura. La ecografía B puede facilitar el diagnóstico si se observan en la cavidad vítrea imágenes que sugieran exudado.

Los microorganismos más frecuentemente aislados son los cocos grampositivos como estreptococos, estafilococos y enterococos. La etiología, hasta en un 30% de los casos, es fúngica en su mayoría causados por *C. albicans*. Los bacilos gramnegativos como *Pseudomonas* spp. se aíslan con menor frecuencia. Todo caso de endoftalmitis postqueratoplastia diagnosticado clínicamente debe confirmarse mediante cultivo de las muestras intraoculares y si procede, de la lente intraocular. El área del tejido donante con infiltrados debe ser raspado para microscopía y cultivo. Si hay un absceso de sutura o una zona de sutura infectada, también se debe retirar y cultivar.

Se ha descrito colonización bacteriana en forma de biopelículas sobre las lentes intraoculares en ojos de pacientes sin síntomas de infección. También se estima que el 19% de las córneas donadas para trasplante están colonizadas por biopelículas bacterianas, en especial las obtenidas de donantes con sepsis o de pacientes sometidos a ventilación mecánica. El valor de enviar rutinariamente para cultivo muestras del anillo corneal y del medio de conservación previo a la queratoplastia es controvertido porque se descono-

ce hasta qué punto un cultivo positivo se asociará a una infección posterior. Aunque el significado clínico de los cultivos no está del todo claro, hay evidencia de que un cultivo positivo previo se relaciona con un mayor riesgo de infección ocular. Pero quizás más relevante sea el hecho de que un ojo que recibe una córnea cuyo borde se cultiva y crece *Candida* spp. tiene un 3% de probabilidad de desarrollar endoftalmitis por este microorganismo.

6.6 ENDOFTALMITIS POSTINYECCIÓN INTRAVÍTREA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS, ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

El uso de inyecciones intravítreas con fármacos antiangiogénicos, como los inhibidores del factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) o los corticosteroides para el tratamiento de las enfermedades retinianas prevalentes, ha aumentado en los últimos años. La endoftalmitis es la complicación más grave tras una inyección intravítrea. La incidencia de endoftalmitis postinyección intravítrea anti-VEGF se estima que es del 0,05% por inyección, pero como las inyecciones se repiten a intervalos regulares el riesgo es acumulativo y la tasa de incidencia por paciente es mayor. En el caso de la inyección de corticosteroides, un estudio indica que el riesgo de endoftalmitis es mayor que en la inyección de fármacos antiangiogénicos (0,13% vs. 0,02%). Sin embargo, este estudio ha sido cuestionado porque no presenta los resultados de los cultivos. La endoftalmitis después de inyecciones intravítreas suele presentarse habitualmente dentro de los 5 días posteriores a la inyección.

Las bacterias pueden entrar en la cavidad vítrea en el momento de la inyección. Por lo que los microorganismos proceden de la superficie ocular, de los anejos oculares del paciente, de la microbiota orofaríngea del personal que realiza la inyección, o menos frecuentemente, de la contaminación de la aguja, los instrumentos o el medicamento inyectado. La etiología de la endoftalmitis postinyección incluye estafilococos coagulasa negativa (65%) y estreptococos *viridans* (30%). Otros microorganismos que se aíslan con menor frecuencia son: *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus cereus*. Cuantitativamente la microbiología es similar a la de la endoftalmitis tras cirugía de cataratas, excepto que la incidencia de los estreptococos del grupo *viridans* es en este caso mucho mayor. Se cree que este alto porcentaje de casos se debe a que las inyecciones intravítreas se realizan generalmente en salas limpias y no en el quirófano y en algunos casos sin el uso adecuado de mascarilla. De esta manera se explicaría el mecanismo de infección por contaminación de la superficie ocular por bacterias orofaríngeas del personal sanitario que se transmiten por aerosoles. En raras ocasiones, la endoftalmitis postinyección puede ser parte de un brote debido al uso de soluciones contaminadas. Se han descrito casos por bacilos gramnegativos como *E. coli* y *Citrobacter* spp., estreptococos y hongos como *Bipolaris hawaiiensis*. El diagnóstico microbiológico de la endoftalmitis postinyección intravítrea es el mismo al descrito en la endoftalmitis tras cirugía de cataratas.

6.7 ENDOFTALMITIS POSTRAUMÁTICA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La endoftalmitis después de un traumatismo ocular penetrante es una complicación infrecuente, pero muy grave, del traumatismo ocular abierto. Es más frecuente en niños que en adultos. La presentación clínica de la endoftalmitis postraumática es compleja puesto que se solapan los signos inflamatorios de la infección intraocular con los del propio traumatismo. Los síntomas de la endoftalmitis postraumática incluyen disminución de la visión y dolor ocular. En el examen oftalmológico se observa hipopión e inflamación intraocular y a veces una herida ocular con drenaje purulento. Las manifestaciones clínicas y la gravedad de este tipo de infecciones van a depender de los microorganismos implicados.

En principio cualquier microorganismo que penetre en el ojo en suficiente cantidad tras un trauma ocular podría producir endoftalmitis. Los microorganismos más frecuentes son los estafilococos coagulasa negativa y las especies de *Bacillus* que pueden representar hasta el 20% de todos los casos. Las infecciones por *Bacillus* spp. son más agresivas y suelen asociarse con un absceso en el anillo corneal debido a que producen toxinas y enzimas proteolíticas que destruyen los tejidos oculares. Otros microorganismos habituales en estas infecciones son los estreptococos y los bacilos gramnegativos como *Pseudomonas* spp. y

Klebsiella spp. La presencia de burbujas de gas en la cámara anterior y un hipopión verde pardo se asocia a contaminación telúrica por *Clostridium* spp. Los hongos también tienen un papel relevante en este tipo de endoftalmitis y se aíslan principalmente en lesiones abiertas del globo ocular en contacto con materia vegetal o del suelo. Tienen un inicio más tardío, semanas o meses después del traumatismo, y suelen cursar con menos dolor y presencia de infiltrados en cámara anterior, iris y vítreo. Las especies de *Candida* son los hongos que se aíslan con mayor frecuencia. Las infecciones polimicrobianas son frecuentes y oscilan entre el 11% al 30% de los casos.

El diagnóstico microbiológico se basa en las tinciones y el cultivo de las muestras intraoculares. La tinción de Gram puede ser diagnóstica si se observan bacilos grampositivos sugestivos de *Bacillus* spp. ya que en este contexto rara vez se trata de un contaminante. Sin embargo, no es raro que pacientes con clínica sugestiva de endoftalmitis tengan cultivos negativos, y que pacientes con traumatismo ocular abierto tengan cultivos positivos en el humor acuoso y no desarrollen endoftalmitis. En los casos de trauma con cuerpo extraño es recomendable su cultivo ya que es positivo en alrededor del 28% de los casos en que el cultivo de las muestras intraoculares es negativo.

6.8 ENDOFTALMITIS RELACIONADA CON CIRUGÍA CORNEAL FILTRANTE. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Cuando el glaucoma es refractario al tratamiento con fármacos se realiza la cirugía de glaucoma de filtrado, que genera un orificio de drenaje en la esclerótica, que permite que el humor acuoso fluya fuera del ojo hacia una ampolla filtrante (*bleb*) cubierta por la conjuntiva. Las infecciones relacionadas con la ampolla de filtración pueden localizarse solo en el área de la ampolla (blebitis) o tener afectación intraocular que puede causar una endoftalmitis. La infección de la ampolla suele ser el paso previo a la infección intraocular. La endoftalmitis suele aparecer de forma tardía, pero con una presentación clínica aguda.

El diagnóstico clínico se inicia con el examen oftalmológico de la ampolla con lámpara de hendidura y la prueba de Seidel para detectar cualquier fuga de la ampolla. La presencia de células inflamatorias dentro del vítreo es clave para diferenciar la endoftalmitis de las infecciones de la ampolla.

Los estreptococos del grupo *viridans* y *S. pneumoniae* se aíslan en más de un tercio de las endoftalmitis relacionadas con la ampolla de filtración. Otros microorganismos frecuentes en este tipo de infecciones son *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* y los enterococos.

El diagnóstico microbiológico se inicia con la recogida de una muestra de la conjuntiva sobre la ampolla con un hisopo y una aspiración de la cámara anterior para tinción de Gram y cultivo antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano. La aspiración del vítreo también se debe realizar si hay hipopión o alguna indicación de afectación vítrea.

6.9 ENDOFTALMITIS RELACIONADA CON QUERATITIS. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La endoftalmitis asociada con la queratitis se observa generalmente en úlceras corneales grandes, profundas y crónicas que no responden al tratamiento tópico. La progresión a la endoftalmitis es poco frecuente y generalmente se produce por extensión de la infección de la córnea al humor acuoso. Clínicamente se presenta con úlcera corneal, hipopión e infiltrados en la cámara anterior o en el vítreo.

La mayoría de los casos de endoftalmitis relacionada con la queratitis se debe a hongos filamentosos con una frecuencia que varía según la localización geográfica y condiciones climáticas. En las zonas de clima frío y seco su incidencia es menor que en zonas de clima cálido y húmedo (17% vs. 53%). *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. son los géneros aislados más frecuentemente. Los casos de etiología bacteriana se producen por *P. aeruginosa* y *Staphylococcus* spp. Las micobacterias se pueden presentar por extensión de la queratitis o en infecciones asociadas con biomateriales (queratoprótesis). Casi todos los casos son

producidos por micobacterias atípicas. El diagnóstico microbiológico de la endoftalmitis asociada con la queratitis es similar al descrito para la cirugía de cataratas pero añadiendo siempre tinciones y cultivo para hongos y micobacterias.

6.10 ENDOFTALMITIS ENDÓGENA. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. ETIOLOGÍA. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La endoftalmitis endógena es una enfermedad grave, y con mal pronóstico visual, producida por la diseminación hematológica de bacterias u hongos, desde un foco infeccioso primario hasta el globo ocular. La endoftalmitis endógena es menos frecuente que la endoftalmitis exógena y su frecuencia oscila entre 5% al 15% de todos los casos de endoftalmitis. Este tipo de endoftalmitis es rara en individuos sanos y es una indicación para el estudio de otro tipo de infecciones sistémicas. La etiología de la endoftalmitis endógena puede ser tanto bacteriana como fúngica.

6.10.1 Endoftalmitis bacteriana endógena

La endoftalmitis bacteriana endógena se presenta de forma aguda con pérdida de visión, dolor en la mitad de los casos y vitritis e hipopión en un tercio de ellos. Los síntomas sistémicos pueden estar ausentes, y es por ello por lo que en más de la mitad de los pacientes el diagnóstico lo realiza el oftalmólogo. Clínicamente se inicia como una lesión coriorretiniana focal o multifocal que se extiende hacia el vítreo.

Puede estar causada por una amplia gama de bacterias que varían según la región geográfica y el origen del foco infeccioso. Entre las bacterias gramnegativas las especies más frecuentes son *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*. *K. pneumoniae* serotipo K1 y K2 predominan en el Este asiático y se asocian con absceso hepático piógeno. Entre los grampositivos predomina *S. aureus*, que a menudo está relacionado con infecciones de la piel o enfermedad sistémica crónica, como diabetes mellitus o insuficiencia renal. Los estafilococos coagulasa negativa rara vez causan endoftalmitis endógena. Con menos frecuencia se aíslan los estreptococos del grupo *viridans*, *S. pneumoniae* y los estreptococos beta hemolíticos de los grupos A y B. Las especies de *Bacillus*, y en concreto *Bacillus cereus* se asocian a casos de uso de drogas por vía intravenosa. Otras causas menos frecuentes de endoftalmitis endógena son *Nocardia* spp., *Actinomyces* spp. y *Mycobacterium tuberculosis*.

El diagnóstico microbiológico de la endoftalmitis bacteriana endógena se basa en el aislamiento del microorganismo en sangre y/o en los líquidos intraoculares. En estos pacientes también está indicada la toma de otro tipo de muestras con el fin de determinar el foco infeccioso. En caso de sospecha de infección por *Nocardia* spp. para establecer el diagnóstico puede ser necesario realizar una VPP con biopsia subretiniana.

6.10.2 Endoftalmitis fúngica endógena

Los hongos pueden causar hasta el 50% de todos los casos de endoftalmitis endógena. Al principio la clínica suele ser inaparente con síntomas que se desarrollan solo después de una vitritis significativa. La manifestación inicial suele ser la coriorretinitis, que se presenta con lesiones coroidales de color blanco-amarillento, únicas o múltiples, en forma de bolas de pelusa que pueden aparecer en forma de "cadena de perlas". Estas lesiones vítreas tan características son diagnósticas en pacientes con factores de riesgo incluso sin confirmación microbiológica.

Por su tropismo por los compartimentos internos del ojo, *C. albicans* es la causa más frecuente (75%-80% de los casos de hongos) de endoftalmitis fúngica endógena. *Cryptococcus neoformans* se asocia a pacientes inmunodeprimidos, especialmente con SIDA, después de una infección pulmonar primaria. Otros hongos patógenos como *B. dermatitidis*, *C. immitis*, *H. capsulatum* y *Sporothrix schenckii* pueden causar infecciones en individuos previamente sanos pero están restringidos a sus áreas endémicas. La endoftalmitis por hongos filamentosos es rara y se presenta en pacientes inmunocomprometidos (neutropénicos

y trasplantados) o usuarios de drogas intravenosas. *Aspergillus* spp. y *Fusarium* spp. son los géneros que se aíslan con más frecuencia. Más raros son los casos causados por: *Scedosporium* spp., *Sporotrichum* spp. y *Mucor* spp.

El diagnóstico microbiológico de la endoftalmitis fúngica endógena se basa en el aislamiento del microorganismo en sangre y/o en los líquidos intraoculares. Los hemocultivos positivos pueden preceder a los síntomas oculares pero no es raro que sean negativos. En ausencia de un hemocultivo positivo puede ser necesaria la aspiración vítrea para establecer el diagnóstico etiológico. Para la recuperación de los hongos, el vítreo es más rentable que una aspiración de humor acuoso. Las muestras vítreas se deben obtener por vitrectomía VPP porque en las aspiraciones vítreas es difícil recuperar las agrupaciones fúngicas. La tinción de calcoflúor con hidróxido potásico tiene una buena sensibilidad y permite identificar la estructura fúngica y su morfología. Sin embargo, la microscopía directa es menos sensible que el cultivo y una tinción negativa no descarta la infección por hongos. El uso de una PCR panfúngica es especialmente útil en aquellos casos en que la microscopía y los cultivos son negativos.

6.11 TÉCNICAS DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR PARA EL DIAGNÓSTICO DE LA ENDOFTALMITIS INFECCIOSA

El cultivo de los líquidos intraoculares es la prueba más fiable y se considera el patrón de referencia para el diagnóstico de la endoftalmitis postquirúrgica tras cirugía de cataratas. Sin embargo, se estima que aproximadamente el 30% de los cultivos son negativos. Esto se debe normalmente al pequeño volumen de muestra, a la baja carga bacteriana, al uso previo con antimicrobianos o a que se trate de microorganismos nutricionalmente exigentes que no crecen con los métodos de cultivo convencionales. En estos casos se recomienda realizar una prueba de amplificación de ácidos nucleicos. En comparación con el cultivo, estas técnicas tienen mayor sensibilidad por lo que son más adecuadas para trabajar con pequeños volúmenes de muestra, y con un bajo inóculo de microorganismos, como sucede habitualmente en las infecciones intraoculares. Además, la especificidad de la PCR no depende de la viabilidad de los microorganismos presentes en la muestra y es especialmente útil en pacientes con tratamiento antimicrobiano previo.

Hay diferentes formatos de PCR que se han utilizado para el diagnóstico de la endoftalmitis bacteriana en los líquidos intraoculares. La técnica de PCR panbacteriana convencional, que implica la amplificación del gen del ARNr 16S seguido de secuenciación del ADN amplificado, es particularmente adecuada para el diagnóstico de la endoftalmitis en la que pueden estar implicadas un amplio grupo de bacterias y en las que el examen clínico no puede predecir a priori el microorganismo involucrado. En muestras de humor vítreo y de humor acuoso, la PCR panbacteriana ha demostrado ser un método complementario al cultivo, ya que con la combinación de ambas técnicas se consigue aumentar el porcentaje de identificación de cada una de ellas individualmente. Por el contrario, en el caso de muestras vítreas recogidas después de una o más inyecciones intravítreas de antibióticos, el rendimiento de la PCR es significativamente mucho mayor (70% por PCR en comparación con el 9% para el cultivo).

Sin embargo, la PCR panbacteriana convencional tiene algunos inconvenientes. El riesgo de contaminación durante el procesamiento de la muestra, la falta parcial de estándares de control de calidad, su incapacidad de detectar infecciones polimicrobianas y el hecho de que puede llevar varios días la identificación. Para paliar en parte este último inconveniente se ha diseñado una PCR panbacteriana en tiempo real que reduce algo el tiempo de detección ya que se elimina la etapa de postamplificación. También se han desarrollado técnicas de PCR en tiempo real que permiten la detección de microorganismos concretos empleando cebadores específicos. En esta línea se han utilizado PCRs "caseras", aunque más habitual ha sido el uso de sistemas comerciales dirigidos a los microorganismos más frecuentes o a las especies más virulentas. Su principal inconveniente es la necesidad de orientar *a priori* la etiología de la infección a determinados microorganismos, aunque con este enfoque se aumenta la sensibilidad.

En un intento de conseguir una prueba única que permita la detección de la mayoría de los patógenos asociados a las infecciones intraoculares, se ha desarrollado un protocolo que combina una PCR multiplex

con una PCR panbacteriana y panfúngica que analiza simultáneamente bacterias, hongos, virus herpes y toxoplasma. Esta prueba demostró ser más sensible que el cultivo con un valor predictivo positivo del 99% y un valor predictivo negativo del 93%. Su principal inconveniente es que, si bien la amplificación de la PCR se puede hacer de manera relativamente rápida, la identificación de algunos microorganismos a nivel de especie puede llevar varios días.

Las aplicaciones de las técnicas moleculares en la endoftalmitis se han centrado principalmente en los patógenos bacterianos, pero también se puede utilizar una PCR panfúngica con amplificación de la región conservada ITS1-5.8S-ITS2 y la posterior secuenciación de los productos amplificados. Para reducir el tiempo de detección y aumentar la sensibilidad de la técnica se han desarrollado protocolos de PCR en tiempo real con cebadores con una amplia especificidad interespecífica.

En los últimos años se están empezando a utilizar técnicas de secuenciación. Recientemente se ha utilizado la técnica de secuenciación BriSK (*Biome Representational en Silico Karyotyping*) que detecta cualquier ADN presente en una muestra. En comparación con el cultivo convencional, la PCR panbacteriana y la técnica BRiSK identificaron especies bacterianas idénticas o estrechamente relacionadas en el 71% de los casos, pero con falsos negativos en el 29%. De los 7 casos de cultivo negativo, 2 fueron positivos por BRiSK pero negativos por PCR. Con esta técnica se identificaron numerosas secuencias que no coincidían con ninguna secuencia conocida lo que abre la puerta a posibles nuevos patógenos oculares. Además, se detectó ADN del Torque Teno virus en el 57% de los cultivos positivos y en el 100% de los casos de endoftalmitis con cultivo negativo pero en ninguno de los controles. El significado de este hallazgo es desconocido, aunque se especula que este virus podría ser potencialmente patógeno, inmunogénico o un marcador de inflamación. La ventaja de la técnica BriSK es que permite detectar todos los microorganismos presentes y su respectiva abundancia relativa en la muestra.

También se han empezado a utilizar técnicas de secuenciación metagenómica de ARN y ADN que permiten detectar en los líquidos intraoculares bacterias, hongos, parásitos, y virus de ADN y ARN. Hasta ahora su uso ha sido experimental en un número pequeño de casos. Las técnicas de secuenciación de ADN han demostrado que pueden incrementar la identificación de microorganismos en un 22% de los casos que no han sido detectados mediante otras PCRs específicas. También se han utilizado otras metodologías como la construcción de genotecas de ARNr 16S y su secuenciación posterior que permite identificar en líquidos intraoculares las bacterias presentes en infecciones polimicrobianas. El uso de las técnicas de secuenciación complementa al cultivo convencional y mejora el diagnóstico microbiológico de la endoftalmitis y de la uveítis. Sin embargo, hace falta más experiencia porque hasta el momento los estudios publicados son escasos y se centran en el análisis retrospectivo de un pequeño número de muestras.

7. UVEÍTIS INFECCIOSA Y RETINITIS

7.1 INTRODUCCIÓN Y CUADROS CLÍNICOS

Las uveítis es una inflamación intraocular que afecta al tracto uveal y a estructuras adyacentes como el vítreo y la retina, producida por múltiples causas y que principalmente se agrupan en entidades puramente oftalmológicas, causas infecciosas y enfermedades inflamatorias. El diagnóstico etiológico de la uveítis es importante para el pronóstico y el tratamiento, pero su etiología es desconocida hasta en el 28% al 45% de los casos, dependiendo del tipo anatómico de uveítis. Las uveítis se clasifican anatómicamente en función de la parte del ojo afecto en anteriores (el tipo más frecuente), intermedias, posteriores y panuveítis (tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de las uveítis y principales etiologías infecciosas por categoría

Clasificación de las uveítis y principales etiologías infecciosas en cada categoría		
Tipo	Signos oculares	Etiologías principales
Anterior (iritis, ciclitis, iridociclitis)	Leucocitos en humor acuoso, precipitados queratínicos, nódulos en iris, sinequia	Virus herpes simple, VVZ, sífilis, tuberculosis, enfermedad de Lyme
Intermedia	Leucocitos o bolas de nieve en vítreo, bancos de nieve en la <i>pars plana</i>	Enfermedad de Lyme
Posterior (coroiditis, coriorretinitis, retinitis)	Lesiones en coroides y/o retina, vitritis en algunos casos	<i>Toxoplasma</i> spp., CMV, necrosis retiniana aguda, <i>Toxocara</i> spp., sífilis, <i>Candida</i> spp.
Panuveítis	Leucocitos en el acuoso y en el vítreo	Sífilis, tuberculosis, <i>Candida</i> spp.

7.2 RETINITIS POR TOXOPLASMA Y CITOMEGALOVIRUS. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La toxoplasmosis ocular es la primera causa de uveítis posterior tanto en adultos como niños. Se debe a la infección por el parásito *Toxoplasma gondii*, un protozoo unicelular que se desarrolla como parásito obligado. El diagnóstico en la mayoría de los casos es clínico y se basa en el aspecto funduscópico de las lesiones. La forma más común de presentación es la aparición de un foco de retinitis necrotizante adyacente a una cicatriz coriorretiniana, con vitreítis asociada y, a menudo, acompañada de una uveítis anterior granulomatosa. Los pacientes inmunodeprimidos y ancianos suelen presentar formas atípicas y más graves de toxoplasmosis ocular.

Las pruebas complementarias para la confirmación de toxoplasmosis incluyen la determinación de anticuerpos IgM, Ig G, Ig A o Ig E específicos para *Toxoplasma gondii* en sangre periférica o fluidos intraoculares o la detección directa del parásito mediante inmunofluorescencia, tinción Giemsa, análisis histopatológico o técnicas de amplificación de ácido nucleico de *T. gondii*.

Las pruebas serológicas que se realizan más frecuentemente son la determinación de anticuerpos específicos frente a *T. gondii* por ELISA o IFI. Los criterios de la fase aguda incluyen la presencia de anticuerpos IgM, mientras que la fase crónica se define por la elevación de anticuerpos IgG. La IgM aparece en la primera semana y se mantiene varios meses en la enfermedad adquirida. La IgG, aparece en la primera semana con una elevación máxima a las 8 semanas, y suele persistir a lo largo de la vida aunque a concentraciones más bajas. Por tanto, la presencia de títulos de IgG en un paciente puede indicar tanto infección antigua como reciente. La seropositividad a *T. gondii* es frecuente y por tanto no es útil para confirmar el diagnóstico de enfermedad activa, tan sólo indica exposición actual o previa al microorganismo, sin embargo, su ausencia permite descartar la enfermedad. En la infección congénita la IgM suele aparecer en los primeros meses después del nacimiento y su presencia en el recién nacido indica infección.

El índice serológico de Goldmann-Witmer-Desmots (GW) valora la producción intraocular de anticuerpos IgG, comparando los valores con los anticuerpos en sangre periférica. El coeficiente establece una relación entre concentraciones de anticuerpos específicos (en humor acuoso o vítreo)/IgG total (acuoso o vítreo) respecto a las concentraciones de anticuerpo específico (sangre)/IgG total (sangre) cuantificados mediante ELISA. Un resultado mayor a 2 se considera diagnóstico de producción humoral local, por lo que es indicativo de toxoplasmosis ocular. Debido a que precisa la realización de punción de la cámara anterior para extraer el humor acuoso, no se suele utilizar como prueba diagnóstica sistemática.

La PCR permite identificar *T. gondii* tanto en fluidos oculares (humor acuoso o vítreo) como en el tejido retiniano en parafina. La escasa muestra de humor acuoso obtenida limita la sensibilidad de la PCR de *T. gondii*, que oscila entre el 31%-46%. Esta prueba está especialmente recomendada en el caso de pacientes inmunodeprimidos con focos atípicos extensos, en los que la capacidad para producir anticuerpos está comprometida. La técnica de PCR para *T. gondii* tiene más valor en el humor vítreo.

La retinitis por citomegalovirus (CMV) es la infección oportunista ocular más frecuente en paciente inmunocomprometidos, especialmente en pacientes con infección por el VIH. Antes de la introducción de la triple terapia antirretroviral (TARGA) un 25-40% de los pacientes desarrollaban retinitis por CMV en algún momento, pero el uso de dicha terapia a partir de la mitad de la década de los 1990s ha reducido considerablemente su incidencia. La retinitis por CMV se presenta casi exclusivamente en pacientes con menos de 50 células CD4/mm³. Un tercio de los pacientes debuta con enfermedad bilateral. Los síntomas de presentación dependen de la localización de las lesiones, e incluyen disminución de la agudeza visual, fopsias, dolor ocular y escotomas. Tradicionalmente se han descrito tres patrones de lesiones cororretinianas acitvas: hemorrágico, en el que predominan las hemorragias retinianas intercaladas con la necrosis retiniana; expansiva o fulminante, con zonas de necrosis que progresan centrífugamente desde el polo posterior y el granular o indolente, con áreas atróficas centrales rodeadas de lesiones satélites granulares. Es típico encontrar infiltrados retinianos plumosos, de color blanco, vasculitis retiniana y las hemorragias retinianas múltiples. Una característica clínica importante es la ausencia de una inflamación vítrea significativa, a diferencia de la toxoplasmosis ocular, donde es frecuente la vitritis.

El diagnóstico es fundamentalmente clínico, ante una retinitis necrotizante aguda compatible con el cuadro típico en un paciente con SIDA y cifras de CD4 inferiores a 50/mm³. Se puede confirmar la sospecha diagnóstica por PCR en humor acuoso, con una sensibilidad próxima al 100%. Las concentraciones de DNA de CMV en humor acuoso son 10 veces menores que en vítreo, y muestran relación con el área de retinitis activa.

7.3 UVEÍTIS ANTERIOR POR VIRUS HERPES, VIRUS VARICELA-ZOSTER. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

Los virus herpes constituyen una de las causas principales de uveítis, estando implicados en un 5-10% de las uveítis anteriores. La uveítis herpética puede mostrar diferentes características clínicas, desde una uveítis anterior hipertensiva granulomatosa con cambios iridianos hasta cuadros severos de retinitis necrotizante periférica con intensos fenómenos inflamatorios.

Algunos virus del grupo herpes, como citomegalovirus, también pueden causar diferentes formas de uveítis. Además de la retinitis por CMV en pacientes inmunodeprimidos, el CMV se está relacionando con un cuadro de uveítis anterior en individuos inmunocompetentes.

La uveítis anterior herpética es la causa principal de la uveítis anterior infecciosa en todos los grupos de población. El patrón clínico es muy similar en ambos tipos de virus (VHS y VVZ). Cuando la uveítis anterior coexiste con afectación corneal herpética (60% de los casos) o con un episodio activo o pasado de herpes oftálmico, es suficiente para considerar el diagnóstico de uveítis anterior herpética.

Los episodios de uveítis anterior herpética son casi siempre unilaterales, y la mayoría de pacientes refieren dolor ocular, enrojecimiento y fotofobia. Los episodios tienen una duración variable entre 1 semana y varios meses y las recurrencias son frecuentes.

La uveítis por VVZ suele aparecer cierto tiempo después de las lesiones cutáneas características, aunque también existen casos sin afectación cutánea previa. Suele ocurrir en edades más avanzadas y con un curso más crónico y menos recurrente.

El diagnóstico es fundamentalmente clínico: unilateral, disminución de la sensibilidad corneal, sinequias posteriores, elevación aguda de la presión intraocular y atrofia iridiana. Las pruebas de laboratorio, especialmente el análisis del humor acuoso mediante técnicas de PCR para detectar material genético del virus, se reservan para casos con dudas diagnósticas o refractarios al tratamiento habitual. Estas técnicas han desplazado al cultivo viral, por su mayor rapidez, facilidad y sensibilidad, que oscila entre 25-100% con una especificidad cercana al 100%. La toma de muestra de humor acuoso debe realizarse coincidiendo con alguna reactivación para aumentar la rentabilidad diagnóstica.

En los últimos años se están describiendo casos de uveítis anterior por CMV en individuos inmunocompetentes con cuadro de uveítis anterior hipertensiva. No existen signos clínicos característicos que permitan realizar el diagnóstico sin análisis de humor acuoso para estudio de PCR para CMV.

7.4 SÍFILIS OCULAR. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La uveítis es el tipo de afectación ocular más frecuente de la sífilis. Puede presentarse en las fases secundaria, latente o terciaria, aunque es más frecuente en la fase latente tardía, años después de la infección inicial y generalmente sin otras manifestaciones sistémicas acompañantes.

La uveítis sifilítica puede ser anterior, intermedia, posterior o panuveítis, uni o bilateral. Las uveítis anteriores pueden presentarse como inflamación granulomatosa y se han descrito nódulos del iris. Un hallazgo característico es la roséola sifilítica del iris en la que se produce una dilatación de los vasos superficiales del iris en el tercio medio del mismo. Suelen presentarse en la fase secundaria. Otros hallazgos son las sinequias posteriores o la atrofia del iris. En relación con la afectación posterior se han descrito los siguientes hallazgos clínicos aislados o en combinación: vitritis, desprendimientos exudativos de retina, retinopatía necrotizante, vasculitis retiniana, neurorretinitis, neuritis óptica, coriorretinitis focal y multifocal. Aunque antiguamente el tipo más frecuente era la uveítis anterior en las series más recientes se señala que sería la uveítis posterior.

Teniendo en cuenta el amplio abanico de manifestaciones de la uveítis sifilítica, ésta es una etiología que casi siempre debe estar en el listado del diagnóstico diferencial de cualquier caso de inflamación intraocular, especialmente en pacientes con antecedentes de manifestaciones clínicas previas sugestivas de sífilis (chancro, rash palmoplantar) o de enfermedades de transmisión sexual, especialmente la infección por el VIH o cuadros clínicos característicos (retinitis interna punteada, coriorretinitis focal de polo posterior, coriorretinitis placoides posterior sifilítica, vitritis en pacientes infectados por el VIH, roséola del iris).

El screening y diagnóstico de la sífilis se realiza mediante serología: pruebas de ELISA para detección de anticuerpos anti-*Treponema*. Si son positivos es obligatorio realizar una prueba reagínica (RPR o VDRL) y los sueros que no concuerden se deben reevaluar con una treponémica (FTA-ABS, TPHA). La determinación de anticuerpos es muy sensible pero no diferencia entre infección reciente o remota, o entre infección tratada y no tratada.

Puesto que la mayoría de los casos de uveítis sifilítica se producen en la fase latente tardía y en esta fase la tasa de falsos negativos de las pruebas reagínicas es de hasta un 25%, siempre se realizará una prueba treponémica ante la sospecha de esta etiología. Además, la uveítis sifilítica se considera una complicación de la neurosífilis por lo que se deberá realizar una punción lumbar en busca de la misma. Los criterios de neurolúes son aumento de leucocitos, hiperproteínorraquia ó VDRL positivo (el VDRL es la única prueba no treponémica que está validada para la detección de anticuerpos no treponémicos en LCR).

7.5 TUBERCULOSIS OCULAR. CONSIDERACIONES CLÍNICAS. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO

La afectación ocular en la tuberculosis es muy variable, tanto en sus manifestaciones como en su frecuencia de presentación, siendo la forma más frecuente la uveítis tuberculosa.

En base a los mecanismos patogénicos subyacentes, existen fundamentalmente tres formas de enfermedad: las debidas a la invasión del tejido ocular por el propio bacilo y las secundarias a mecanismos de hipersensibilidad frente a antígenos de *M. tuberculosis*.

La uveítis tuberculosa suele presentarse como una uveítis posterior o panuveítis. Los hallazgos más frecuentes incluyen focos de coroiditis (solitarios o múltiples) y la vasculitis retiniana. Con frecuencia es bilateral y se presenta con edema macular quístico. Otras manifestaciones asociadas con la tuberculosis,

son la uveítis anterior, la coroiditis serpiginosa-*like*, edema macular, neurorretinitis y neuropatía óptica, la endoftalmitis y la panoftalmitis.

El diagnóstico de tuberculosis ocular es complejo por la ausencia de uniformidad de criterios así como por la gran heterogeneidad de sus manifestaciones. Además, la mayor parte de los pacientes no tiene historia previa de tuberculosis y en más de la mitad, la radiografía de tórax es normal. En la mayoría de los casos el diagnóstico se establece en base a una sospecha clínica, junto con evidencias complementarias y en algunos casos, por la identificación de la micobacteria en muestras intraoculares. Se podría considerar como probable tuberculosis ocular la presencia de hallazgos clínicos compatibles (uveítis, coroiditis, vasculitis, etc.) y al menos uno de los siguientes: evidencia de tuberculosis sistémica; Mantoux y/o IGRA positivo, lesiones activas o cicatriciales en radiología simple de tórax y/o tuberculosis extrapulmonar activa confirmada por técnicas microbiológicas, exclusión de otras causas de uveítis y respuesta positiva a tratamiento con 4 fármacos durante 4-6 semanas. El diagnóstico de tuberculosis ocular definitiva, incluye además de los hallazgos clínicos compatibles, al menos uno de los siguientes: demostración de bacilos en microscopía o aislamiento de *M. tuberculosis* en cultivo de muestras oculares o PCR positiva en muestras intraoculares.

Tanto el humor acuoso como el humor vítreo serían muestras adecuadas para la confirmación microbiológica. En ellas se pueden realizar tinciones específicas (Zielh-Neelsen o auramina), aunque tienen muy baja sensibilidad en el caso de estas muestras oculares dado el reducido número de bacilos en ellas. El cultivo es la prueba de referencia, siendo capaz de detectar entre 10-100 bacilos/mL. La sensibilidad de la PCR para la detección de *M. tuberculosis* varía del 33% al 77%, dependiendo del tipo de uveítis: 33% para vasculitis retiniana, 66% para panuveítis granulomatosa, 54% para coroiditis multifocal y 57% para lesiones retinocoroidales sospechosas de origen tuberculoso. La PCR también se ha aplicado sobre tejidos intraoculares como las membranas epirretinianas.

8. PROCESAMIENTO GENERAL DE LAS MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES OCULARES

8.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

La calidad de las muestras clínicas recibidas en el laboratorio depende en gran medida del cumplimiento de una serie de normas, referidas sobre todo a la selección, recogida y transporte de las mismas. Para ello se deben seguir las recomendaciones generales detalladas en el Procedimiento en Microbiología Clínica de la SEIMC nº 1b (2ª edición): "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de microbiología". Además, se tendrán en cuenta las siguientes consideraciones generales aplicables a las muestras oculares.

Las muestras se recogerán antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano y de la instilación de anestésicos tópicos y colorantes vitales, siempre que las condiciones clínicas del paciente lo permitan. Si ya se han utilizado, se deben eliminar por lavado con agua o solución salina estéril no bacteriostática, antes de efectuar la toma de la muestra porque estas sustancias pueden inhibir el crecimiento de algunos microorganismos. Se recomienda que la recogida de las muestras oculares, excepto los exudados conjuntivales, la realice un oftalmólogo con las máximas condiciones de asepsia y evitando la contaminación con la microbiota comensal y ambiental. Además, siempre que sea posible, se recomienda la inoculación inmediata de estas muestras en los medios de cultivo en el momento de su recogida. Para ello deberán estar disponibles en las áreas clínicas, donde habitualmente se recogen las muestras oculares, los medios de cultivo y materiales adecuados para la recogida, transporte y cultivo de estas muestras clínicas.

En los pacientes con afectación unilateral se debe especificar claramente cuál es el ojo afectado del que se ha recogido la muestra.

Se debe evitar el uso de torundas de algodón que pueden inhibir el crecimiento de ciertos microorganismos. Debe tenerse en cuenta que las torundas de alginato cálcico y aquellas con bastón de madera resultan tóxicas para virus y puede inhibir técnicas moleculares de PCR, por lo que se evitará su uso para estas finalidades.

Tradicionalmente las muestras que se pueden utilizar para el diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares se dividen por convención en dos grupos. En el primer grupo incluye las procedentes de las estructuras oculares externas que están en contacto directo con la piel y los párpados y que, por tanto, no son estériles. En este grupo se incluyen las muestras conjuntivales y de los anexos oculares. En un segundo grupo se incluyen las muestras corneales y de las estructuras internas del ojo que son estériles. Ejemplos de muestras del segundo grupo son las muestras de úlceras corneales tomadas con hisopos, los raspados corneales y los líquidos intraoculares. Si bien es cierto que la parte más externa del epitelio corneal no es estéril, su íntima asociación con el estroma corneal, que si que lo es, hace difícil, si no imposible, obtener una muestra corneal sin recoger también algo del epitelio corneal. Sin embargo, desde el punto de vista microbiológico y a efectos de interpretación de resultados las muestras corneales deben considerarse estériles.

8.1.1 Exudado palpebral

Las muestras de los exudados palpebrales se recogen frotando con una torunda de dacrón o de alginato cálcico previamente humedecida con caldo triptona-soja (TSB) o solución salina estéril a lo largo del margen superior e inferior del párpado con el ojo cerrado. Se recomienda también la toma de muestras conjuntivales del ojo no afectado para comparación en la interpretación de los resultados.

8.1.2 Muestras del aparato lacrimal

8.1.2.1 *Dacriocistitis*. El exudado del saco lacrimal se obtiene por presión en el conducto o en el saco lacrimal para drenar la secreción purulenta que se recoge con aguja y jeringa o con un hisopo de dacrón o de alginato cálcico. En caso de dacriocistorrinostomía clínicamente indicada, la muestra se puede obtener en el procedimiento quirúrgico, aspirando el absceso con aguja y jeringa. Se recomienda también la toma de muestras conjuntivales.

8.1.2.2 *Dacrioadenitis*. Las muestras de exudados de la glándula lacrimal se recogen frotando una torunda por la conjuntiva tarsal inferior y el fórnix, recogiendo las secreciones con una torunda de dacrón o de alginato cálcico. Dada la presencia habitual de microbiota comensal se recomienda la toma de muestras de la conjuntiva contralateral no involucrada para comparación. Si se forma un absceso en la glándula lacrimal se puede obtener la muestra quirúrgicamente por aspiración con aguja y jeringa. En la inflamación crónica de la glándula lacrimal se puede obtener una biopsia de esta glándula.

8.1.2.3 *Canaliculitis*. Las muestras se recogen presionado el párpado y el canaliculo para drenar el material purulento. Una vez extraído este material, se recoge con una torunda de dacrón o de alginato cálcico, con aguja y jeringa, o se transfiere con una espátula directamente a los medios de cultivo. También se puede aspirar el material obtenido durante una canaliculotomía. Parte de los aspirados se inocularán en viales de transporte de anaerobios.

8.1.3 *Celulitis preseptal y orbital*. Si hay herida abierta se puede recoger el exudado de la misma aspirando con aguja y jeringa. En el caso de la formación de un absceso palpebral, tras desinfectar la piel se puede realizar una punción con aguja y jeringa en el punto de máxima fluctuación, y enviar la muestra en la misma jeringa o en un vial de transporte para anaerobios. Si la celulitis es secundaria a infección sinusal puede obtenerse muestra de los senos paranasales por punción y aspiración durante la cirugía o por endoscopia, no siendo útil el exudado del seno por vía nasal por estar contaminado con la microbiota respiratoria normal. Si se precisa drenaje quirúrgico se enviarán muestras del exudado en vial de transporte para anaerobios y de tejido en un contenedor estéril con solución salina. La biopsia de tejido es

esencial para el diagnóstico microbiológico de la mucormicosis. Puede ser útil para la interpretación de los resultados el cultivo del exudado conjuntival. También deben obtenerse siempre muestras de sangre para la realización de hemocultivos.

8.1.4 Exudado y raspado conjuntival

La recogida del exudado conjuntival se realizará frotando una torunda por la conjuntiva tarsal inferior y el fórnix, recogiendo las secreciones que pudieran estar presentes. Si la mucosa está seca puede embeberse previamente el hisopo en solución fisiológica estéril, o en caldo TSB para que resulte más tolerable al paciente. Durante la toma de la muestra se debe evitar el contacto con el borde del párpado para no contaminar la muestra con la microbiota comensal.

Es importante especificar a qué ojo corresponde la muestra tomada. En caso de afectación de los dos ojos, se recogerá una muestra de cada ojo, cada una irá con un número de petición y se procesarán de manera independiente. Se recomienda la toma de muestras conjuntivales de ambos ojos incluso en el caso de conjuntivitis unilateral. La comparación del crecimiento microbiano del ojo no afectado con el del ojo afectado puede facilitar en algunos casos la determinación del agente etiológico.

En caso de solicitarse estudio microscópico se deberán recoger dos torundas, una se conservará en medio de transporte para cultivo y una segunda muestra que se enviará al laboratorio sin medio de transporte para el examen microscópico.

8.1.5 Raspado corneal

Se suele emplear una lámpara de hendidura o un microscopio quirúrgico. Se instila un anestésico tópico y debería dejarse un intervalo de tiempo antes de la recogida de la muestra para evitar una posible influencia en algunos microorganismos. Para la toma hay que evitar el empleo de torundas de algodón. En caso de emplear una torunda, las preferidas son las de alginato cálcico o de nylon flocado. Para evitar contaminaciones, los párpados deben estar totalmente separados durante la recogida. Antes de realizar los raspados, se puede retirar el posible exudado con una torunda. No hay una recomendación estándar sobre el procedimiento para la toma de muestras. Se suelen realizar raspados corneales empleando habitualmente la parte no cortante de una hoja de bisturí nº 15 con mango Bard-Parker, con espátula de platino flexible de Kimura esterilizada o con una aguja estéril. Se debe raspar tanto el centro del área inflamada de la úlcera como los bordes, realizando golpes cortos y moderadamente firmes en una dirección. Aunque en algunas ocasiones se ha recomendado tomar muestras de los párpados y de la conjuntiva de ambos ojos para relacionar los resultados con los cultivos corneales, en la práctica pueden dar lugar a información contradictoria.

Si la siembra se hace en la consulta del oftalmólogo, cada raspado se emplea para una extensión en porta o para un medio de cultivo. Generalmente se obtiene muy poco material por el riesgo de adelgazamiento de la córnea o perforación. Por ello es preferible priorizar un medio no selectivo, como el agar chocolate y situar algún material en el centro de uno o dos portas y extendiéndolo finamente para teñirlos en el laboratorio. Si la clínica es compatible con infección por ameba, se inocula un agar no nutritivo. Si sospecha de infección por virus, se recogerá una muestra separada recogida en un medio de transporte apropiado.

Alternativamente, para los oftalmólogos de ambulatorios que no tienen acceso a sembrar directamente los medios de cultivo, se ha propuesto realizar una sola toma con torunda flocada y medio de transporte líquido, aunque sólo se ha realizado un estudio referido casi exclusivamente a queratitis bacteriana. También se puede emplear el medio de transporte Amies sin carbón, para bacterias y hongos. Hay que tener en cuenta que las muestras obtenidas con torunda no son útiles para el diagnóstico de queratitis amebiana.

8.1.6 Biopsia corneal

Está indicada si la infección no responde al tratamiento, no se han obtenido resultados del raspado y continúa la sospecha de queratitis infecciosa o si la infección se localiza en las capas profundas del estroma. Se obtiene mediante queratectomía con microscopio quirúrgico.

8.1.7 Lentes de contacto, estuches y soluciones de mantenimiento

En el caso de las infecciones corneales, el estudio de las lentes de contacto, su estuche o soluciones de mantenimiento, pueden aportar información importante. Esto es de especial importancia en el caso de las infecciones por amebas, ya que un resultado negativo puede ayudar a descartar dicha infección. El cultivo de lentes de contacto permite identificar la etiología de muchos casos de queratitis asociada a lentes de contacto especialmente cuando los resultados del raspado corneal son negativos y el paciente ya inició el tratamiento.

Si las lentes están situadas en el ojo, se recogerán asépticamente con guantes estériles y se introducirán en un frasco estéril con una pequeña cantidad de suero fisiológico estéril. Los estuches y soluciones de mantenimiento de las lentes de contacto del paciente se reciben y sin ninguna manipulación previa se envían al laboratorio.

8.1.8 Tejidos de donante de córnea, medio de conservación y suturas

Las muestras del anillo corneal se recogen con un bisturí estéril y se introducen en un contenedor estéril con caldo TSB o similar. Del medio de conservación se toma una alícuota de 2 mL. Tras la queratoplastia si aparecen infiltrados en el área del tejido donante se deben realizar raspados de esta zona para tinción y cultivo. Si hay un absceso de sutura o una de sutura infectada, esta debe ser retirada y cultivada. Las suturas se retiran con pinzas estériles o se pueden cortar primero con una aguja estéril de 25 G. Las suturas se introducen en envase estéril con medio Amies. En estos casos, también se recomienda tomar un cultivo de la conjuntiva palpebral inferior y bulbar con un hisopo con medio Amies.

8.1.9 Humor acuoso

El humor acuoso es un líquido, de un volumen aproximado de 0,3 mL, que se regenera continuamente. Se obtiene por paracentesis de la cámara anterior con una aguja de pequeño calibre (de 25 a 30 G). El volumen obtenido es muy pequeño, suele oscilar entre 0,1-0,2 mL, por lo que el oftalmólogo deberá priorizar los estudios solicitados en base a la sospecha clínica.

8.1.10 Humor vítreo

El humor vítreo es un gel de un volumen aproximado de 4 mL que se forma durante el desarrollo embrionario y no se regenera. Se puede obtener una muestra vítrea para cultivo de dos formas: por punción-aspiración con aguja y jeringa, en la que se obtiene una biopsia vítrea, o por vitrectomía *vía pars plana*, en caso de que exista indicación clínica para realizarla. Con este último procedimiento se obtienen dos tipos de muestras vítreas. Al inicio de la vitrectomía se recoge una muestra vítrea no diluida en una jeringa (0,2-0,3 mL), antes de que se active la infusión de solución salina balanceada. El resto será muestra vítrea diluida (50 a 100 mL).

8.1.11 Biopsias de tejidos intraoculares

Se pueden obtener muestras de tejido coroidal y retinal para diagnóstico de tumores o de infección con el vitreotomo cuando no se obtiene un diagnóstico etiológico con el cultivo de las muestras vítreas.

8.1.12 Lentes intraoculares, cuerpo extraño, prótesis, implantes y otros biomateriales

Se pueden enviar para cultivo diferentes tipos de prótesis, lentes, implantes y otros biomateriales. Estos incluyen, entre otros: las lentes intraoculares, las queratoprótesis, los implantes corneales y orbitales, los dispositivos de drenaje de glaucoma y los cerclajes esclerales. Estas muestras se recogen mediante procedimientos quirúrgicos y se introducen en contenedores estériles con suero salino o TSB. El cuerpo extraño, tras su extracción, se debe recoger para cultivo porque puede proporcionar información de los microorganismos causantes de la infección. Si el cuerpo extraño ha penetrado en la cavidad ocular, también se deben tomar muestras de la herida con una torunda, del líquido intraocular y de los tejidos necróticos de la lesión durante el procedimiento de extracción.

8.1.13 Otras muestras con valor diagnóstico

En los casos de sospecha de endoftalmitis endógena tanto bacteriana como fúngica deben obtenerse siempre muestras de sangre para la realización de hemocultivos. Además, se pueden procesar otras muestras no oculares según los síntomas sistémicos del paciente con el fin de determinar el foco de infección. Entre otros se pueden realizar: cultivos de orina si hay signos de una infección urinaria, cultivos faríngeos o de esputo en caso de infección del tracto respiratorio, coprocultivos en pacientes con infección gastrointestinal, muestras de piel y tejidos blandos en pacientes con heridas, líquido cefalorraquídeo en pacientes en los que no se puede descartar meningitis, punción en caso de absceso hepático, cultivo de catéteres vasculares y cualquier otro tipo de muestra que pueda ser útil para determinar el foco de infección.

8.2 TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LAS MUESTRAS

El transporte adecuado de las muestras es determinante en la fiabilidad de los resultados microbiológicos. En la medida de lo posible las muestras oculares para cultivo de origen normalmente estéril se deben inocular directamente en los medios de cultivo en el lugar de su recogida en vez de ser enviadas para su siembra en el laboratorio. Tanto las muestras como los medios de cultivo ya inoculados deben transportarse al laboratorio de Microbiología y procesarse lo más rápidamente posible en medios y/o contenedores de transporte adecuado. De manera general las muestras conjuntivales y de los anexos oculares se deben recibir en el laboratorio dentro de las 2 horas siguientes tras su recogida. Las muestras corneales y líquidos intraoculares se deben recibir en el laboratorio dentro de los 30 minutos tras su extracción. Si no se pueden lograr estos tiempos para el transporte, las muestras deben almacenarse a temperatura ambiente no más de 24 horas.

Las muestras de exudados y abscesos obtenidas con torunda se deben enviar en medio Amies. Las jeringas utilizadas para la toma de los aspirados pueden utilizarse como medio de transporte eliminando el aire en una gasa impregnada con alcohol pero siempre sin aguja y con un capuchón estéril. Para el transporte de estas jeringas deben utilizarse contenedores a prueba de fugas. En el caso de sospecha de anaerobios se debe inocular parte de la muestra en un vial de transporte de anaerobios. Esto es aplicable especialmente a las muestras de celulitis preseptal y orbital, dacriocistitis, canaliculitis y líquidos intraoculares. Para el transporte se deberán utilizar tubos o viales con atmósfera anaerobia, base de agar e indicador de la presencia de oxígeno como Port-A-Cul® o Portagerm®. Las placas, tubos y extensiones con las muestras ya inoculadas se mantienen a temperatura ambiente y se transportan inmediatamente al laboratorio. Las muestras conjuntivales para el cultivo de bacterias y/u hongos deben enviarse en medio de transporte (medio gel de Stuart o Amies o medio líquido de Amies) y para estudio de virus en medio de transporte adecuado para ello. En caso de no poder procesarse las muestras inmediatamente, pueden conservarse durante un máximo de 24 horas a temperatura ambiente en caso de muestras para cultivo bacteriano/fúngico o en nevera (2-8°C) para estudio de virus.

Los raspados corneales preferiblemente se inocularán en los medios de cultivo en el lugar de su recogida. Si no fuera posible sembrar la muestra en la consulta de oftalmología, se puede introducir la cuchilla o

espátula en un tubo con 1 mL de caldo BHI para ser procesada en el laboratorio. Los oftalmólogos de los ambulatorios que no tienen acceso a sembrar directamente los medios de cultivo enviarán la muestra recogida con torunda flocada y medio de transporte líquido. También se puede emplear el medio de transporte Amies sin carbón, para bacterias y hongos.

Las biopsias corneales se remitirán al laboratorio de forma urgente en contenedor estéril con una pequeña cantidad de solución salina. Si ha de retrasarse la siembra, las muestras se refrigerarán, excepto en el caso de cultivo de amebas, que si no pueden procesarse en ocho horas es preferible mantenerlas a temperatura ambiente.

Las biopsias, tejidos y lentes de contacto se enviarán en un contenedor estéril con solución salina. Las lentes intraoculares, cuerpos extraños, prótesis, implantes y otros biomateriales se enviarán en envases estériles adecuados al tamaño con suero salino, caldo tioglicolato o caldo TSB. Los estuches y soluciones de mantenimiento de las lentes de contacto del paciente se envían al laboratorio sin ninguna manipulación. Del medio de conservación de tejidos corneales se envía una alícuota de 2 mL en tubo estéril. Las suturas se enviarán con medio Amies en envase estéril.

Al igual que las muestras corneales es recomendable que los líquidos intraoculares sean inoculados por el oftalmólogo en los medios de cultivo. En el caso de que no se disponga de medios de cultivo para su inoculación, las muestras de líquidos intraoculares se pueden enviar en un tubo estéril con tapón de rosca de tamaño adecuado al volumen de la muestra. Las jeringas utilizadas para la toma de los aspirados de la cámara anterior y humor vítreo pueden utilizarse como medio de transporte, pero siempre sin aguja y con un capuchón estéril. Las muestras de vítreo diluido se pueden enviar en el cassette de vitrectomía o en un envase estéril.

8.3 RECEPCIÓN DE LA MUESTRA

A su llegada al laboratorio hay que verificar que la muestra cumple requisitos de calidad para ser procesada como se indica en el Procedimiento en Microbiología Clínica SEIMC 1b: "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología".

La muestra debe llegar al laboratorio correctamente identificada con los datos del paciente y el tipo de muestra, acompañada de un volante de petición o un número de petición electrónica en donde se especificarán las pruebas solicitadas. Las muestras deben estar etiquetadas con el origen anatómico e indicar claramente a qué ojo pertenecen. Se debe comprobar siempre que el contenedor de la muestra es apropiado y con el medio de transporte adecuado.

8.3.1 Criterios de rechazo

En el caso de que la muestra incumpla los requisitos de calidad establecidos podrá ser rechazada. Cada laboratorio debe elaborar y distribuir los criterios de rechazo que deberán estar reflejados en el manual de calidad del laboratorio. Las muestras intraoculares y corneales son de difícil obtención por los riesgos que conlleva su extracción para el paciente, y en muchas ocasiones son insustituibles, por lo que los criterios de rechazo, deben reducirse al máximo. En general, no deben aceptarse las muestras sin identificar o en las que los datos no coincidan con los del volante de petición. Tampoco se aceptarán las muestras derramadas, las recogidas en recipientes no estériles ni las conservadas en formol u otros aditivos. No obstante, antes de rechazar la muestra se debe consultar con el clínico responsable de la solicitud. Si la muestra es insuficiente para todas las determinaciones solicitadas, también se contactará con el clínico responsable de la petición para decidir cuáles son las determinaciones más adecuadas según la sospecha clínica, y para las restantes, se indicará en el informe "muestra insuficiente". En caso de rechazo de la muestra se debe informar por escrito al clínico solicitante el motivo del mismo.

8.4 PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

8.4.1 Comunicación entre el laboratorio de Microbiología y el oftalmólogo

El procesamiento de las muestras oculares se realiza según los protocolos establecidos en el laboratorio y de la información que aporta el servicio solicitante sobre la muestra, el paciente y la sospecha clínica. Dada la dificultad de obtener muestras del ojo y el escaso volumen que se suele recoger, es clave una comunicación directa y frecuente entre el laboratorio y el oftalmólogo. Para procesar estas muestras el laboratorio de Microbiología necesita saber al menos tres cosas sobre la muestra y el paciente. El origen anatómico de la muestra, por ejemplo, conjuntiva, córnea, cavidad vítrea, etc... El tipo de muestra, por ejemplo, raspado corneal, biopsia, humor acuoso, exudado conjuntival, etc... La sospecha de infección, por ejemplo, conjuntivitis, queratitis o endoftalmitis. A partir de aquí cualquier información sobre el paciente y la muestra que contribuya a aumentar el rendimiento de las pruebas diagnósticas microbiológicas debe ser notificada al laboratorio. En las infecciones oculares tanto la epidemiología como la presentación clínica se utilizan para delimitar los microorganismos implicados y las pruebas diagnósticas que se deben realizar. Por ejemplo, en el caso de las muestras intraoculares es esencial conocer el tipo de sospecha de endoftalmitis, ya que esto influye de forma determinante en el procesamiento y la interpretación de los resultados microbiológicos. Del mismo modo es imprescindible indicar si una muestra corneal es de un paciente con lente contacto, con cuerpo extraño o asociada a cirugía LASIK, ya que esto implica que la infección puede ser debida a microorganismos poco frecuentes como *Acanthamoeba* spp., micobacterias, etc., y permite al microbiólogo realizar los procedimientos específicos para su aislamiento y detección.

En relación con el paciente, el oftalmólogo debe informar los antecedentes relevantes, factores de riesgo o presentaciones clínicas atípicas. Por ejemplo, notificar que la muestra procede de un paciente que ha sufrido un traumatismo ocular o una infección tras cirugía de cataratas, aporta al microbiólogo una información esencial para valorar microorganismos ambientales o de la microbiota comensal que en este contexto pueden ser clínicamente significativos. También es necesario indicar si ha habido, tratamiento antimicrobiano previo, ya que dificulta el diagnóstico de las infecciones oculares, en especial de la queratitis y la conjuntivitis bacteriana. El oftalmólogo debe advertir del modo de envío de muestras de difícil obtención o las que son extremadamente pequeñas (por ejemplo, los raspados corneales o biopsias de tejidos) para que no pasen desapercibidas y sean correctamente procesadas.

El laboratorio de Microbiología por su parte puede contactar con el oftalmólogo para solicitar información adicional sobre la muestra recibida y el paciente para una correcta interpretación de los resultados. En el caso de que la cantidad de muestra sea insuficiente para realizar todas las pruebas solicitadas debe valorar de acuerdo con el oftalmólogo los estudios y las determinaciones más adecuadas según la sospecha clínica. También debe asegurar el suministro de medios de cultivo y otros materiales para el cultivo y envío de las muestras, adiestrar en la técnica correcta para la inoculación de los medios, asesorar sobre la sensibilidad y la especificidad de las pruebas de rutina disponibles y recomendar pruebas especiales o adicionales cuando sea preciso.

8.4.2 Procesamiento de las muestras oculares.

Las muestras oculares que se reciban ya inoculadas en los medios de cultivo se incubarán directamente. Las muestras que no hayan sido inoculadas deberán ser procesadas con la mayor brevedad posible en una cabina de bioseguridad siguiendo las recomendaciones recogidas en el Procedimiento en Microbiología 10a de la SEIMC "Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica". Para la manipulación de las muestras con sospecha de *Acanthamoeba* spp. se recomienda usar guantes durante el procesamiento y lavado de manos al finalizar.

a) **Exudado palpebral y muestras del aparato lacrimal.** Las biopsias de la glándula lacrimal y otros tejidos se homogeneizan asépticamente en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina, se inoculan con pipeta Pasteur estéril en los medios de cultivo, y se realizan las extensiones para tinción de Gram, calcoflúor y micobacterias (auramina). En el caso de la tinción de Gram de las concreciones obtenidas por raspado en las muestras de canaliculitis, que pueden contener "gránulos de azufre", se deben aplastar en un portaobjetos para obtener una extensión fina que facilite su observación microscópica.

b) **Raspados corneales.** Los medios de cultivo sembrados en la consulta se incuban en las estufas correspondientes en cuanto se reciben en el laboratorio. Si las muestras no han sido inoculadas en el lugar de recogida se valorará inicialmente al recibirse la muestra en el laboratorio si hay una cantidad de muestra suficiente para las tinciones y cultivo. En caso de no sea así, se priorizará este último. Las muestras recibidas en caldo, se homogeneizan 10 minutos en vortex y se inoculan con pipeta Pasteur estéril en los medios sólidos y el caldo de enriquecimiento. Se extiende una gota para Gram en portaobjetos y otra para tinción con calcoflúor en caso de sospecha de hongos o amebas. Si se recibe una torunda con medio de transporte, se sembrarán los medios de cultivo comenzando por los menos selectivos y posteriormente los medios líquidos.

c) **Biopsia corneal.** La biopsia corneal se coloca en una placa Petri estéril vacía dentro de la cabina de seguridad biológica, se trocea con una cuchilla estéril y los fragmentos se emplean para realizar las extensiones en portaobjetos y para inocular los medios de cultivo.

d) **Lentes de contacto, estuches y soluciones de mantenimiento.** La lente de contacto se toma con unas pinzas estériles y se arrastra por los medios de cultivo para su siembra y al final se introduce en un caldo tioglicolato. Para cultivo de *Acanthamoeba* spp. se raspará la lente de contacto con la hoja de un bisturí por la cara cóncava y se inoculará en 0,5 mL de solución Page.

Cuando se recibe un estuche, la solución del estuche de la lente se transfiere a un contenedor estéril y se frota el interior del estuche con una torunda humedecida con agua destilada estéril. Se exprime el líquido de la torunda en la solución recogida anteriormente. Se centrifuga a 800 g durante 5 minutos. Se deshecha el sobrenadante dejando unos 0,5 mL y se resuspende el depósito centrifugado para inocular los medios de cultivo y preparar las extensiones para tinciones.

e) **Tejidos de donante de córnea, medio de conservación y suturas.** El tejido corneal de donante de córnea se debe cortar con bisturí en una placa de Petri estéril y los fragmentos se homogenizan en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina o caldo tioglicolato (aproximadamente 1 mL) antes de su siembra en los medios de cultivo. El medio de conservación se inocula directamente en un caldo tioglicolato. Las suturas infectadas se siembran arrastrando la sutura con pinzas estériles por los distintos medios de cultivo e inoculándolas al final en un caldo tioglicolato.

f) **Líquidos intraoculares.** Humor vítreo y humor acuso. Las muestras de humor vítreo (0,5-2 mL) y de humor acuso (0,1-0,2 mL) no diluidas son de volumen limitado por lo que puede que no haya suficiente cantidad para inocular todos los medios. En este caso se puede añadir TSB al líquido disponible hasta alcanzar un mínimo de 0,5 mL para poder realizar el cultivo y las extensiones para las tinciones. Como alternativa al cultivo en medio sólido se pueden inocular las muestras en viales de hemocultivos pediátricos que son más adecuados para pequeños volúmenes de muestra. Para las tinciones es suficiente inocular una gota del líquido en uno o varios portaobjetos.

Las muestras vítreas diluidas se deben concentrar antes del cultivo por centrifugación o por filtración.

- **Método de centrifugación.** Se debe centrifugar una alícuota de 5 mL de humor vítreo diluido a 3.000 rpm durante 5 minutos. Una vez centrifugado se transfiere todo el sobrenadante excepto los últimos 0,5 mL con una pipeta estéril a otro envase por si fuera necesario para realizar pruebas adicionales (por ejemplo, estudios moleculares o virología). El sedimento se resuspende con el líquido restante. La siembra se realizará con un asa o pipeta estéril, transfiriendo el sedimento a los medios de cultivo.

Las extensiones para la tinción de Gram, calcoflúor y micobacterias se realizan tomando con una pipeta directamente una gota del sedimento que se deposita en el portaobjetos.

- **Método de filtración.** El resto del lavado (50 a 100 mL) se puede concentrar por filtrado al vacío a través de un filtro estéril de 0,45 µm. Una vez filtrado el humor vítreo diluido, el papel de filtro se corta asépticamente en tantas partes como medios se quiera inocular. Con unas pinzas estériles se arrastran ambas superficies del trozo de papel por la superficie de cada medio de cultivo permitiendo la inoculación de los microorganismos presentes en el papel. Por último, se coloca el trozo de papel de filtro boca arriba en el centro de la placa sobre la superficie de cada medio. En las muestras de papel de filtro las extensiones para Gram, calcoflúor y micobacterias se preparan raspando ambas superficies del filtro original (sin cortar) con un bisturí estéril, fijando el material raspado en uno o varios portaobjetos por secado al aire o con metanol al 95% o 100% de 5 a 10 minutos.

Los viales de hemocultivo son una alternativa que complementa el cultivo de las muestras vítreas diluidas. Tanto las bacterias como los hongos se pueden recuperar con una sensibilidad similar a los métodos de concentración. Se pueden inocular dos viales de hemocultivos, uno aerobio y otro anaerobio, con hasta 10 mL de muestra vítrea diluida en cada uno. La inoculación puede realizarse tras la vitrectomía o a su llegada al laboratorio.

El fluido filtrado restante puede usarse para cultivos virales o congelarse y guardarse para estudios moleculares si fuera necesario.

g) Biopsias de tejidos intraoculares. Los tejidos y biopsias se deben homogenizar en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina antes de su siembra en los medios de cultivo. Si se sospecha infección por hongos filamentosos no se deben triturar las muestras, sino cortar, si es posible, pequeños fragmentos que se colocarán directamente en los medios de cultivo para hongos.

h) Lentes intraoculares, cuerpo extraño, prótesis, implantes y otros biomateriales. Las lentes intraoculares, cuerpo extraño, prótesis, implantes y otros biomateriales se colocan en una placa Petri estéril vacía y se trocean con una cuchilla estéril. Los fragmentos se emplean para realizar las extensiones en portaobjetos y para inocular los medios de cultivo. Si no se pueden fragmentar, se siembran arrastrándolos con unas pinzas estériles por los distintos medios de cultivo e inoculándolas al final en caldo tioglicolato. En estas muestras, excepto en el cuerpo extraño, existe riesgo de colonización bacteriana con formación de biopelículas, por lo que parece recomendable una sonicación previa al cultivo. Sin embargo, no hay estudios publicados con el uso de esta técnica para el diagnóstico microbiológico en estas muestras.

8.4.3 Examen microscópico de las muestras oculares

a) Tinción de Gram. El valor de la tinción de Gram en las muestras oculares varía con el tipo de muestra y la situación clínica del paciente. En general, en los pacientes que han recibido tratamiento antimicrobiano antes de la toma de la muestra el valor de la tinción de Gram es bastante limitado.

La tinción de Gram de los exudados conjuntivales está indicada en los casos conjuntivitis hiperaguda y de oftalmía neonatorum ya que la evolución de la infección puede ser muy rápida. Además, es de ayuda a la hora de interpretar los aislamientos microbiológicos, ya que la visualización de bacterias en las tinciones generalmente indica un inóculo significativo. La presencia de leucocitos y bacterias intracelulares también son indicativos de infección por esos microorganismos. Para su realización, además de recogerse la muestra para cultivo bacteriano, deberá remitirse una segunda torunda sin medio de transporte para realizar el frotis (rotando la torunda por el portaobjetos) y la tinción.

En los raspados corneales, la tinción de Gram tiene una sensibilidad baja en las úlceras tempranas, pero aumenta ligeramente (del 30% al 40%) en las más avanzadas y puede ser de utilidad para orientar el diagnóstico, especialmente en la infección bacteriana, ya que la especificidad suele ser superior al 80%.

En líquidos intraoculares el valor de la tinción de Gram varía según el contexto clínico. En los pacientes que han recibido tratamiento antimicrobiano antes de la toma de la muestra, la posibilidad de observar algún microorganismo es escasa por lo que en este caso solo se realizará cuando haya muestra suficiente. Las correlaciones informadas de la tinción de Gram con el cultivo en la endoftalmitis oscilan del 16% al 88%.

b) Calcoflúor. Esta tinción tiene mayor rentabilidad que la tinción de Gram porque los antifúngicos tópicos no se usan habitualmente en el tratamiento empírico. En muestras corneales en caso de infección fúngica la tinción de calcoflúor y la de hidróxido potásico tienen una alta sensibilidad, incluso superior al 90%. Ambas también presentan una elevada sensibilidad para la detección de *Acanthamoeba* spp. Al microscopio los quistes de acantameba miden de 12 a 25 μm y son poligonales o en forma de estrella con doble pared conectada en varios puntos.

c) Tinciones para micobacterias. Las tinciones de ácido-alcohol resistencia no se deben realizar de forma rutinaria salvo petición expresa en las muestras corneales procedentes de pacientes sometidos a cirugía post-LASIK y en líquidos intraoculares de endoftalmitis asociada con queratitis, donde la frecuencia de micobacterias no tuberculosas y *Nocardia* spp. es relevante.

8.4.4 Medios de cultivo

La inoculación de las muestras oculares se realizará en medios convencionales para bacterias aerobias y anaerobias facultativas (agar sangre, agar chocolate). En estos medios se pueden recuperar la mayoría de bacterias que causan infecciones oculares y hongos. Para el cultivo de las bacterias anaerobias se debe utilizar un medio no selectivo como el agar Brucella o agar Schaedler o un medio líquido como el caldo tioglicolato, que además puede hacer de medio de enriquecimiento. Para el aislamiento de hongos se debe añadir al menos una placa de un medio específico para hongos como como agar Sabouraud con antibióticos (cloranfenicol, gentamicina) o agar BHI. No se deben usar medios con cicloheximida porque inhibe los principales hongos saprófitos que causan las infecciones oculares. Para *Acanthamoeba* spp. se emplea agar no nutritivo, que una vez inoculado y antes de su incubación, se cubre con unas gotas de una suspensión de *E. coli*. En el caso de sospecha clínica de infección por micobacterias se puede usar un medio como Lowenstein-Jensen y un medio líquido para micobacterias.

Los medios se elegirán según el tipo de muestra, la etiología más probable y la sospecha diagnóstica. En los líquidos intraoculares el tipo y cantidad de medios de cultivo que se pueden inocular está limitado por el volumen de la muestra. En caso de que la muestra sea insuficiente para inocular todos los medios deseados se deben priorizar los medios generales como el agar chocolate y caldo tioglicolato ya que en estos dos medios se pueden recuperar cerca del 95% de los patógenos bacterianos y fúngicos.

En las muestras conjuntivales y exudados palpebrales es suficiente sembrar en agar sangre y agar chocolate. En el caso de sospecha de oftalmia *neonatorum* se añadirán un medio selectivo como el agar Thayer-Martin, agar Martin Lewis o agar New York City y en pacientes hospitalizados una placa de agar MacConkey.

Las muestras de celulitis preseptal se pueden sembrar en agar sangre, agar chocolate y añadir agar MacConkey y un medio no selectivo para anaerobios como el agar Brucella o agar Schaedler si es secundaria a un traumatismo.

Las muestras del aparato lacrimal, celulitis orbital, corneales, líquidos intraoculares, biopsias, lentes intraoculares, prótesis, implantes y otros biomateriales se inocularán en los medios convencionales ya mencionados para bacterias aerobias, facultativas y anaerobias, un medio específico para hongos como agar Sabouraud y en un medio líquido de enriquecimiento como el caldo tioglicolato. En muestras corneales para el aislamiento de *Acanthamoeba* spp. se empleará agar no nutritivo. Además, si hay sospecha de micobacterias se añadirá un medio como Lowenstein-Jensen y un medio líquido para micobacterias.

8.4.5 Inoculación y condiciones de incubación

Inoculación

a) Muestras conjuntivales, palpebrales y del aparato lacrimal. Tradicionalmente los oftalmólogos han inoculado las muestras conjuntivales y de los párpados en una sola placa describiendo distintos patrones para indicar el origen de la muestra. Las torundas conjuntivales se inoculaban en rayas horizontales y verticales, en una mitad de la placa, según se tratara del ojo derecho o izquierdo respectivamente. Y las muestras del borde palpebral del ojo derecho e izquierdo con letras “R” y “L” respectivamente en la otra mitad de la placa. No obstante, es más sencillo para evitar errores de interpretación, realizar el cultivo en placas separadas, identificando cada una con el tipo de muestra y ojo al que pertenece. Esto facilita la siembra de la muestra con una torunda o espátula y asegura que pequeñas cantidades de muestra sean correctamente inoculadas. La inoculación se realiza frotando directamente la torunda o espátula en un tercio de la placa y reaislando al menos con tres estrías. Si la muestra es un aspirado se inoculan unas gotas y se reaisla del mismo modo.

b) Raspados corneales. Es recomendable que la inoculación de los medios de cultivo la realice el oftalmólogo en el momento que recoge la muestra siguiendo las pautas y el protocolo consensuado con el laboratorio de Microbiología. La inoculación en los medios de cultivo se hará extendiendo ligeramente el material con la cuchilla o espátula, y empleando ambos lados, en dos o tres lugares de la placa. Se realiza mediante siembra separada en forma de letra “C” y sin penetrar el agar. Cada fila de letras “C” representa un raspado corneal de una úlcera. De esta manera se produce un efecto de dilución o reducción del número de bacterias u hongos que crecen en la placa de izquierda a derecha. En cada sucesiva inoculación se avanza de las capas más superficiales a las más profundas de la córnea. En general, cuanto mayor sea el número de estrías “C” con crecimiento mayor significado clínico tendrán esos aislados. Además, este método de inoculación permite distinguir un crecimiento verdadero, si el crecimiento se produce sobre la estría “C”, de una contaminación, si el crecimiento se produce fuera. Cualquier crecimiento fuera de la estría “C” no se debe valorar.

Si se siembra agar no nutritivo, se realizan uno o dos trazos en el centro, intentando no modificar la superficie del agar. Los tubos con agar inclinado se inoculan mediante líneas de abajo arriba y los medios líquidos se siembran al final, agitando la cuchilla o espátula directamente en el caldo. En el caso de caldo para anaerobios (tioglicolato) se introducirán las raspaduras hasta el fondo del tubo. Si se sospecha de infección por virus, se recogerá una muestra separada recogida en un medio de transporte apropiado. En todos los casos y para evitar contaminaciones, hay que intentar minimizar la exposición de los medios al aire.

c) Muestras intraoculares. Las muestras de humor vítreo y de humor acuso no diluidas deben inocularse directamente en los medios de cultivo. Dado que el volumen de muestras es limitado debe distribuirse de forma equivalente en los distintos medios (de dos a cuatro gotas en cada medio sólido) y sembrar en estría para aislamiento de colonias aisladas. En los vítreos concentrados por centrifugación se inoculan los medios de cultivo a partir del sedimento. Para las extensiones se debe colocar una gota del líquido en uno o varios portaobjetos y dejar secar al aire. Para una mejor visualización de la morfología celular se recomienda fijar la muestra con metanol al 95% o 100% de 5 a 10 minutos.

Condiciones de incubación

Las placas de agar sangre y agar MacConkey se incubarán a 35-37°C en aire o atmósfera con 5% de CO². Las placas de agar chocolate también a 35-37°C siempre con atmósfera de 5% de CO². Las placas para el cultivo de anaerobios a 35-37°C en atmósfera de anaerobiosis. Los caldos se incubarán a 35-37°C. Los medios para hongos y amebas en aire y a 30°C.

El tiempo de incubación dependerá del tipo de muestra y de la sospecha clínica. En general los medios convencionales para bacterias aerobias y facultativas se incubarán de 3 a 7 días. Los caldos de enriqueci-

miento de las muestras invasivas se deben incubar hasta 10 días para facilitar el aislamiento de *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes* o *Actinomyces* spp. El tiempo de incubación será de 7 a 10 días para el cultivo de amebas y hasta tres semanas los medios para hongos.

8.5 INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Tinciones

a) **Tinción de Gram de exudados oculares.** La tinción de Gram de los exudados conjuntivales, palpebrales y del aparato lacrimal puede ser útil para interpretar los aislados microbiológicos, ya que la visualización de bacterias en las tinciones generalmente indica un inóculo significativo. En la tinción de Gram de las concreciones obtenidas por raspado en las muestras de canaliculitis la observación de los "gránulos de azufre" indica la presencia de *Actinomyces* spp.

b) **Tinciones en muestras corneales e intraoculares.** Se evaluará la presencia o ausencia de bacterias, de levaduras o de hifas, células somáticas, la presencia de fibrina o material de lente fragmentada y las células inflamatorias. Se valorará la presencia o ausencia de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) con el objetivo de inmersión y se registrará su presencia con un esquema no cuantitativo: no se observan PMNs, aislados (≤ 1 PMN/campo), escasos (1-4 PMNs/campo), moderados (5-10 PMNs/campo) y abundantes (>10 PMNs/campo). La presencia de PMNs sugiere una infección bacteriana. Los gránulos de pigmento que se asemejan a los cocos grampositivos pueden estar presentes en las tinciones de las muestras intraoculares. Se pueden diferenciar de los cocos porque son más grandes, ovalados y marrones. En la tinción con calcoflúor y KOH se evaluará la presencia de levaduras, hifas y quistes de acantameba. En las tinciones de ácido-alcohol resistencia (Ziehl-Neelsen, auramina-rodamina y Kinyoun) se evaluará la presencia o ausencia de bacterias ácido-alcohol resistentes. Los resultados de la observación microscópica de las extensiones se informarán lo antes posible al clínico peticionario y quedarán registrados en la hoja de trabajo correspondiente a la muestra. Esto permitirá correlacionar los morfotipos visualizados con los aislados.

c) **Cultivos.** Las placas y los medios líquidos se examinarán diariamente para detectar la presencia de crecimiento. La primera lectura de los medios incubados en aerobiosis y atmósfera de CO_2 se realizará a las 24 horas de incubación y los medios incubados en anaerobiosis a las 48 h. Se efectuará un recuento del número de microorganismos indicando el número de colonias que crece en cada medio de cultivo. La presencia de un número moderado de colonias o de muchas colonias en una o más placas de cultivo puede indicar que el resultado es clínicamente significativo aunque el microorganismo forme parte de la microbiota comensal. Si se obtienen cultivos mixtos se realizarán los subcultivos necesarios para obtener los microorganismos en cultivo puro. Una vez obtenido el cultivo puro, se hará una identificación presuntiva mediante pruebas rápidas como tinción de Gram, catalasa, oxidasa, coagulasa en porta, etc., o definitiva si se dispone de MALDI-TOF. Si se considera relevante el hallazgo se avisará al clínico responsable del paciente. Se identificarán todos los aislados clínicamente significativos con los sistemas disponibles en cada laboratorio y se realizarán las pruebas de sensibilidad frente a los antimicrobianos según las normas de cada laboratorio. Si no hay crecimiento se reincubarán todas las placas. Si se observa turbidez indicativa de crecimiento en el caldo de enriquecimiento se realizará tinción de Gram y según los microorganismos que se observen, los subcultivos en los medios generales y selectivos adecuados para su aislamiento

8.6 CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

a) **Blefaritis, dacrioadenitis, dacriocistitis y canaliculitis.** La interpretación de los resultados microbiológicos de blefaritis, dacrioadenitis, dacriocistitis y canaliculitis, se debe ajustar a la probable etiología de estas infecciones. Sin embargo, en los estudios para determinar los agentes causales de estos cuadros clínicos se suelen aislar microorganismos de baja virulencia, de la microbiota comensal de la piel y de la conjuntiva, como los estafilococos coagulasa negativa, *Corynebacterium* spp., estreptococos del grupo *viridans* y *Cutibacterium* spp., a los que es difícil asignar un papel patógeno, ya que generalmente los datos de estos

trabajos se recogen sin una población de control. No obstante, a alguno de estos microorganismos si se le ha podido asignar un papel patógeno. Así, por ejemplo, se cree que los estafilococos coagulasa negativa desempeñan un papel en el desarrollo de la blefaritis estafilocócica por *S. aureus* aunque se desconocen los mecanismos fisiopatológicos subyacentes. De manera similar, se ha demostrado que *Propionibacterium propionicum* es clínicamente significativo en las canaliculitis. En los casos en los que no se ha podido demostrar el papel patógeno de estos microorganismos, para la interpretación de los resultados puede ser útil la comparación con los cultivos de la conjuntiva contralateral, las características del crecimiento en los medios de cultivo y la visualización microscópica por tinción de Gram de los microorganismos.

En las blefaritis se deben identificar, valorar e informar *S. aureus* y *S. epidermidis*. Otros microorganismos como *Streptococcus* spp., *Moraxella* spp., *Corynebacterium* spp., y *C. acnes* también pueden ser significativos aunque estos microorganismos se pueden aislar en los párpados de individuos sanos, por lo que su relevancia clínica se determinará según su crecimiento en los cultivos y del contexto clínico.

En la dacriocistitis se debe identificar y valorar el crecimiento de *S. aureus* y *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, los bacilos gramnegativos como enterobacterias y *Pseudomonas* spp. y los microorganismos anaerobios. En las infecciones crónicas se debe considerar significativo el aislamiento de micobacterias y levaduras. En las dacrioadenitis se valora siempre como significativa la presencia de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *Pseudomonas* spp. En las formas crónicas se debe considerar significativo el aislamiento de *M. tuberculosis*.

En las canaliculitis se debe identificar y valorar la presencia de *P. propionicum* y de actinomicetos anaeróbicos como *Actinomyces israelii*. También, se identificarán e informarán otros microorganismos que suelen aislarse menos frecuentemente como *Mycobacterium chelonae*, *Nocardia* spp. y anaerobios como *Fusobacterium* spp.

b) Celulitis preseptal y orbitarias. En las celulitis preseptales y orbitarias para valorar los resultados es útil conocer el origen del foco, la edad y los factores de riesgo del paciente ya que orienta sobre el significado clínico de los microorganismos aislados. En estas infecciones se debe identificar, valorar e informar *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* y anaerobios como *Bacteroides* spp. y *Peptostreptococcus* spp. En las celulitis orbitarias de pacientes inmunodeprimidos se valorarán los hongos filamentosos como *Aspergillus* spp. y *Mucor* spp.

c) Muestras conjuntivales. Para la interpretación de los cultivos de exudados conjuntivales hay que tener en cuenta la frecuente colonización de la conjuntiva con microbiota saprofita (estafilococos coagulasa negativa, *Corynebacterium* spp. y *C. acnes* principalmente). Se valora siempre como significativa la presencia de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa*, y enterobacterias. El aislamiento de otros microorganismos típicamente colonizadores puede interpretarse como significativo si tiene un crecimiento confluyente en placa, el cultivo en paralelo con el ojo sano muestra diferencias significativas y/o en el análisis microscópico por tinción de Gram se encontraron morfotipos bacterianos concordantes con el cultivo.

d) Muestras corneales. En la interpretación microbiológica de las muestras corneales se debe valorar el potencial patógeno e invasivo de los microorganismos aislados, la cantidad de estrías en "C" en las que crece el microorganismo, el número de colonias y los medios de cultivo en los que crece. Además, en la interpretación de los cultivos corneales es esencial conocer los factores de riesgo del paciente ya que delimita y orienta el significado clínico de los microorganismos aislados. Los criterios más ampliamente aceptados para considerar un aislado corneal significativo, desde el punto de vista del laboratorio, incluyen que el paciente presente signos clínicos de queratitis más uno de los siguientes criterios: el crecimiento en dos o más medios del mismo microorganismo en el sitio de inoculación, el crecimiento en al menos un medio sólido con el mismo microorganismo visualizado en la tinción, crecimiento confluyente (considerado como más de 10 UFC) en el sitio de inoculación en al menos un medio sólido, o que el aislamiento se repita en varias muestras. Estos criterios son para bacterias y hongos y no para *Acanthamoeba* spp. que siempre

se debe considerar significativo. Algunos autores consideran que en el caso de los hongos se debe considerar significativo cualquier crecimiento detectable en dos medios sólidos, o en al menos un medio, si además ha sido observado microscópicamente. Por ello, se deben identificar, valorar y realizar pruebas de sensibilidad frente a antimicrobianos a todos los microorganismos aislados si tienen un crecimiento significativo. Un crecimiento en menor cantidad no excluye su importancia clínica, pero ésta deberá ser valorada en el contexto clínico. Estos criterios también son aplicables a microorganismos de la microbiota comensal como estafilococos coagulasa negativa, *Corynebacterium* spp. estreptococos del grupo *viridans* y *Propionibacterium* spp. En estos microorganismos de baja virulencia un crecimiento en escasa cantidad (menos de 10 UFC) en un medio sólido o solo en medio líquido se considera una contaminación. Sin embargo, estos microorganismos, aun con este escaso crecimiento, también pueden ser significativos en determinadas situaciones clínicas como por ejemplo en pacientes inmunodeprimidos con queratitis y en la infección postoperatoria tras cirugía LASIK.

e) Líquidos intraoculares. Los criterios de interpretación de los cultivos microbiológicos procedentes de líquidos intraoculares se basan en los aplicados en el estudio *Endophthalmitis Vitrectomy Study* (EVS). En este trabajo para la interpretación de los resultados microbiológicos (cultivos y tinción de Gram) de la endoftalmitis tras cirugía de cataratas era importante distinguir los contaminantes de los microorganismos que realmente producían infección. Por ello los criterios de un cultivo positivo confirmado se hicieron muy estrictos para minimizar la probabilidad de que los contaminantes fueran incluidos en esta categoría. Sin embargo, en la endoftalmitis postcataratas no siempre es posible una clara distinción, porque los microorganismos que frecuentemente causan endoftalmitis pertenecen también a la microbiota normal de la piel y, por lo tanto, son contaminantes potenciales. También se consideró en el estudio EVS que los microorganismos contaminantes suelen estar presentes en recuentos más bajos que los verdaderos patógenos. Según esto se definió la categoría de cultivo positivo confirmado como aquellos cultivos de humor acuoso o vítreo no diluido con crecimiento semiconfluyente (considerado como más de 10 UFC) en un medio sólido, o con crecimiento en al menos 2 medios, o con crecimiento del mismo microorganismo en al menos un medio de otro origen como podría ser uno de los cultivados a partir del cassette de vitrectomía o en otro medio utilizado por el laboratorio que estuviera fuera del protocolo del EVS. Por lo tanto, en este estudio la muestra del cassette de vitrectomía se utilizó solo como evidencia de apoyo, pero no se le permitió, por sí misma, definir un cultivo positivo confirmado. No obstante, es evidente que los cultivos positivos obtenidos del cassette de vitrectomía son microorganismos que están causando infección. En este estudio un crecimiento menor o el crecimiento solo en medios no incluidos en el protocolo EVS se consideró en otra categoría denominada “cultivo equívoco”, que indica que no hay evidencia suficiente para considerar que se trata de una verdadera infección. Además, para integrar los resultados del cultivo con los resultados de la tinción de Gram, en el estudio EVS se creó la categoría de “infección confirmada por el laboratorio” en aquellos casos en que en la tinción de Gram se observaba el mismo microorganismo que crecía en un cultivo considerado equívoco, y la categoría de “infección de laboratorio equívoca” cuando en la tinción de Gram se observaba un microorganismo que no crecía en cultivo. Estos criterios son aplicables a la endoftalmitis tras cirugía de cataratas y por extensión se pueden aplicar en otros tipos de endoftalmitis especialmente a las asociadas a procedimientos quirúrgicos. También es esencial para una correcta interpretación conocer los factores de riesgo y el tipo de endoftalmitis ya que esto determina que microorganismos pueden o no tener significado clínico.

8.7 DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD FRENTE A LOS ANTIMICROBIANOS

El tratamiento de las infecciones oculares se puede realizar por diferentes vías según la localización anatómica de la infección y su gravedad. Las más utilizadas son: la vía tópica, la inyección periocular (subconjuntival o retrobulbar), la vía sistémica (oral, intravenosa o intramuscular) y la vía intraocular.

Los puntos de corte establecidos por el CLSI o el EUCAST están desarrollados según estudios clínicos que correlacionan la CMI del antimicrobiano, las concentraciones plasmáticas del fármaco y los resultados clínicos tras la administración por vía sistémica. Sería deseable disponer de puntos de corte específicos

para cada una de las vías de administración que se utilizan para el tratamiento de las infecciones oculares, y especialmente para las vías tópica e intraocular, que son las más utilizadas en oftalmología. Sin embargo, establecer puntos de corte para cada una de estas vías de administración es complicado ya que se dispone de pocos datos farmacocinéticos y clínicos para respaldar esos puntos de corte.

El EUCAST ha propuesto dos alternativas de puntos de corte para la administración de los antimicrobianos por vía tópica para el tratamiento de infecciones oculares externas. La primera es usar los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) para todos los antimicrobianos cuando se usen de forma tópica, y la segunda, utilizar puntos de corte clínicos cuando estén disponibles, y los ECOFF, cuando no haya puntos de corte clínicos para esos antimicrobianos.

La primera alternativa tiene la ventaja de que permite categorizar los aislados como de tipo salvaje o no salvaje, y demostrar la presencia de mecanismos de resistencia fenotípicamente detectables, que son los que podrían tener mayor probabilidad de fracaso clínico. Este planteamiento presenta algunos problemas. No se dispone de distribuciones de CMI para todos los agentes tópicos para establecer el ECOFF, por ejemplo, para neomicina y bacitracina. Asimismo, se puede subestimar la actividad de algunos de estos antimicrobianos en formulaciones tópicas ya que la concentración que se puede alcanzar en tejidos superficiales, con esta vía de administración, puede ser muy elevada. Puede causar confusión informar un punto de corte para uso tópico basado en ECOFF para los antimicrobianos que también tienen puntos de corte clínicos y que se pueden usar de forma sistémica.

La segunda alternativa consiste en utilizar los puntos de corte sistémicos cuando estén disponibles, y los puntos de corte epidemiológicos (ECOFF) cuando no se disponga de puntos de corte sistémicos. Este planteamiento plantea algunos problemas. En primer lugar, los puntos de corte clínicos a menudo son diferentes de los ECOFF, incluso puede haber diferencias de varias diluciones. Tampoco hay puntos de corte sistémicos para algunas combinaciones microorganismo-antimicrobiano que se pueden usar tanto de forma tópica como sistémica, y aunque son antimicrobianos en los que no se recomienda su uso sistémico, si que se podrían usar de forma tópica frente a determinados microorganismos. Además, la aplicación de los puntos de corte definidos para la administración sistémica puede subestimar la sensibilidad de los microorganismos aislados en muestras oculares, ya que se supone que la concentración de antimicrobiano en el tratamiento por vía tópica en tejidos superficiales es muy superior a la alcanzable por vía sistémica. Sin embargo, no siempre es así, ya que la concentración de un antimicrobiano no equivale necesariamente a la actividad y biodisponibilidad del fármaco. Además, la actividad biológica de un antimicrobiano en la córnea suele ser mucho más baja que la concentración, pudiendo ser inferior al 10% de la cantidad instilada. Por otra parte, en el caso del uso de antimicrobianos tópicos para el tratamiento o profilaxis de infecciones en la cámara anterior se desconoce la farmacocinética tópica y la concentración que alcanzan en los tejidos intraoculares. La eficacia del tratamiento dependerá de la sensibilidad del microorganismo, de la penetración del antimicrobiano y del mantenimiento de la concentración adecuada en el lugar de la infección, por lo que es difícil determinar el valor y el impacto clínico de la aplicación de los puntos de corte establecidos para uso sistémico. En los aislados con alto nivel resistencia, la probabilidad de lograr un tratamiento eficaz puede ser menor. Incluso en los aislados que sean sensibles, o con bajo nivel de resistencia, es difícil predecir la eficacia terapéutica en la cámara anterior utilizando un régimen tópico mediante el uso de los puntos de corte sistémicos.

Así pues, los resultados de las pruebas de sensibilidad en los aislados oculares deben interpretarse con precaución, teniendo en cuenta la diferente farmacocinética de los agentes antimicrobianos sobre las diferentes estructuras y compartimentos oculares según las distintas vías de administración.

El microbiólogo debe informar al oftalmólogo si los resultados de las pruebas de sensibilidad en los aislados oculares se realizan aplicando puntos de corte sistémicos o puntos de corte epidemiológicos (ECOFF).

8.8 INFORMACIÓN DE LOS RESULTADOS

Para que la información microbiológica tenga utilidad en el manejo del paciente, cualquier información sobre las tinciones, los cultivos o las pruebas moleculares, que pueda tener significado clínico e influencia en el tratamiento debe ser notificada lo antes posible al clínico responsable, mediante informes provisionales escritos o telefónicos. Algunos resultados microbiológicos de las muestras oculares pueden reconducir la actitud terapéutica e influir en el pronóstico visual y se deben considerar como una urgencia médica. Estos resultados se notificarán inmediatamente al médico responsable del paciente. Algunos ejemplos de resultados críticos son: el crecimiento en un cultivo conjuntival de *N. gonorrhoeae* o *C. trachomatis*, en muestras corneales el crecimiento de *P. aeruginosa* o la visualización o detección de *Acanthamoeba* spp. y en muestras intraoculares el crecimiento de *Bacillus* spp.

a) Tinción de Gram. Se debe comunicar el resultado de la tinción de Gram el mismo día en que se recibe la muestra. Se informará el número relativo y la morfología de todos los microorganismos visualizados, la presencia de células somáticas en especial de leucocitos polimorfonucleares, que se pueden informar como aislados, escasos, moderados o abundantes. También se informará la presencia de levaduras o hifas, fibrina o material de lente fragmentada y si las bacterias se observan intra o extracelularmente. En la tinción con calcoflúor y KOH se informará de la presencia o ausencia de cualquier elemento fúngico en especial de levaduras o hifas y la presencia de quistes de *Acanthamoeba* spp.. En las tinciones de ácido-alcohol resistencia: Ziehl-Neelsen, auramina-rodamina y Kinyoun se informará de la presencia o ausencia *Nocardia* spp. y de bacterias ácido-alcohol resistentes.

b) Cultivos. En muestras conjuntivales, palpebrales y del aparato lacrimal se informarán los aislamientos que se consideren clínicamente significativos con el nombre de la especie y su perfil de sensibilidad. En el caso de crecimiento de microorganismos de la microbiota comensal que no se consideren significativos, se informará el resultado con un comentario de "Microbiota saprofita habitual" o "Presencia de microbiota conjuntival normal". En el caso de no crecimiento en los medios de cultivo se informará como "No se aíslan microorganismos".

En las muestras corneales e intraoculares si el resultado del cultivo es positivo, el informe de resultados incluirá todos los microorganismos aislados y su sensibilidad a los diferentes antimicrobianos según las normas de cada laboratorio. Si hay microorganismos de la microbiota comensal en los que no es posible determinar su relevancia clínica se puede incluir un comentario como "La importancia clínica de estos microorganismos que forman parte de la microbiota comensal y saprofita se debe determinar en el contexto clínico". Si el resultado del cultivo es negativo, al finalizar el periodo de incubación de los medios de cultivo, se emitirá un informe en el que conste "No se aíslan microorganismos".

Es conveniente añadir un comentario en el informe de resultados de sensibilidad informando de los puntos de corte utilizados para la interpretación de los antibiogramas, CLSI o EUCAST, y en este último caso, si se basan en puntos de corte sistémicos o en puntos de corte epidemiológicos (ECOFF).

9. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

Tal como se indicó en el apartado 4.2. de este procedimiento (ver este apartado), el test inmunocromatográfico AdenoPlus™ -RPS ADP se puede utilizar para la detección de antígeno de Adenovirus en lágrimas del paciente con un tiempo de realización de 10 minutos, lo que resulta muy útil en las consultas de oftalmología o de atención primaria.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Alsuwaidi AR, Wiebe D, Burdz T, Ng B, Reimer A, Singh C, et al. *Corynebacterium macginleyi* conjunctivitis in Canada. *J Clin Microbiol*. 2010; 48:3788–90.
2. Amescua G, Akped EF, Farid M, et al. On behalf of American Academy of Ophthalmology Preferred Practice Pattern Cornea/External Disease Committee. Blepharitis preferred practice pattern. *Ophthalmology*. 2019; 126:56-93
3. Azari AA, Barney NP. Conjunctivitis: a systematic review of diagnosis and treatment. *JAMA*. 2013; 310:1721–9.
4. Barry P, et al. ESCRS guidelines for prevention and treatment of endophthalmitis following cataract surgery: data, dilemmas and conclusion. 2013. Disponible en: https://education.es CRS.org/wp-content/uploads/2018/08/ENGLISH_2018_updated.pdf
5. Barnes SD, Hallak J, Pavan-Langston D, Azar DT. Chapter 115. Microbial keratitis pp.1402-14. En: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. (eds). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015.
6. Barnes SD, Kumar NM, Pavan-Langston D, Azar DT. Chapter 114. Microbial conjunctivitis pp. 1392–401. En: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. (eds). *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2015.
7. Black CM. Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections. *Clin Microbiol Rev*. 1997; 10:160–84.
8. Chiquet C, Cornut PL, Benito Y, Thuret G, Maurin M, Lafontaine PO, et al. French Institutional Endophthalmitis Study Group. Eubacterial PCR for bacterial detection and identification in 100 acute postcataract surgery endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008; 49:1971-8.
9. Church DL. 3.10 Ocular Cultures. En: Leber AL. (ed). *Clinical microbiology procedures handbook*. 4th ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2016.
10. Cordero-Coma M, Salazar R, Costales F. Tuberculous uveitis: an update. *Expert Rev Ophthalmol* 2014; 9:125-137.
11. Dize L, West SK, Mkocho H, Quinn TC, Gaydos CA. Evaluation of pooled ocular and vaginal swabs by the Cepheid GeneXpert CT/NG assay for the detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* compared to the GenProbe Aptima Combo 2 Assay. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015; 81:102–4.
12. Doan T, Pinsky BA. Current and future molecular diagnostics for ocular infectious diseases. *Curr Opin Ophthalmol*. 2016; 27:561–7.
13. Durand ML. Bacterial and fungal endophthalmitis. *Clin Microbiol Rev*. 2017; 30:597–613.
14. El-Sayed Zaki M, Abd-El Fatah GA. Rapid Detection of oculopathogenic adenovirus in conjunctivitis. *Curr Microbiol*. 2008; 56:105–9.
15. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study: a randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. *Arch Ophthalmol*. 1995; 113:1479-96.
16. Endophthalmitis Vitrectomy Study Group. Microbiologic factors and visual outcome in the Endophthalmitis Vitrectomy Study. *Am J Ophthalmol*. 1996; 122:830-46.
17. EUCAST Guidance Document. Breakpoints for topical agents. March 2014. Disponible en: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/Topicals_guidance_note_140329.pdf
18. Gray LD, Gilligan PH, Fowler WC. Cumitech 13B. Laboratory diagnosis of ocular infections. Coordinating ed, Snyder WJ. ASM Press, Washington, DC. 2011
19. Goldschmidt P, Rostane H, Saint-Jean C, Batellier L, Alouch C, Zito E, et al. Effects of topical anaesthetics and fluorescein on the real-time PCR used for the diagnosis of Herpesviruses and *Acanthamoeba keratitis*. *Br J Ophthalmol*. 2006; 90:1354–6.

20. Guías de Práctica Clínica de la SERV. “Endoftalmitis infecciosa”. Sociedad Española de Retina y Vítreo. 2011. Disponible en: https://serv.es/wp-content/descargasWP/documentacionMedica/Guia_SERV_07_primeraRevision.pdf
21. Harper TW, Miller D, Schiffman JC, Davis JL. Polymerase chain reaction analysis of aqueous and vitreous specimens in the diagnosis of posterior segment infectious uveitis. *Am J Ophthalmol*. 2009; 1:140–147.
22. Kam KYR, Ong HS, Bunce C, Ogunbowale L, Verma S. Sensitivity and specificity of the Adeno-Plus point-of-care system in detecting adenovirus in conjunctivitis patients at an ophthalmic emergency department: a diagnostic accuracy study. *Br J Ophthalmol*. 2015; 99:1186–9.
23. Kowalski RP, Karenchak LM, Raju LV, Ismail N. The verification of nucleic acid amplification testing (Gen-Probe Aptima Assay) for *Chlamydia trachomatis* from ocular samples. *Ophthalmology*. 2015; 122:244–7.
24. Kugadas A, Gadjeva M. Impact of microbiome on ocular health. *Ocul Surf*. 2016; 14:342-349.
25. Lee AY, Akileswaran L, Tibbetts MD, Garg SJ, Van Gelder RN. Identification of Torque Teno virus in culture-negative endophthalmitis by representational deep DNA sequencing. *Ophthalmology*. 2015; 122: 524–530.
26. Leber, AL. *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 4th ed. ASM Press, Washington, DC. 2016.
27. McAnena L, Knowles SJ, Curry A, Cassidy L. Prevalence of gonococcal conjunctivitis in adults and neonates. *Eye Lond Engl*. 2015; 29:875–80.
28. Mediero S, Boto de los Bueis A, Spiess K, Díaz-Almirón M, del Hierro Zarzuelo A, Villalaín Rodes I, et al. A. Clinical and microbiological profile of infectious keratitis in an area of Madrid, Spain. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018; 36:409-416.
29. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A guide to utilization of the Microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. 2018; 67:813–6.
30. Ortiz de la Tabla V, Martín C, Martínez C. Conjunctivitis caused by *Corynebacterium macginleyi*. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2000; 18:481–2.
31. Ozkan J, Nielsen S, Diez-Vives C, Coroneo M, Thomas T, Willcox M. Temporal stability and composition of the ocular surface microbiome. *Sci Rep*. 2017; 7:9880.
32. Public Health England. UK standards for microbiology investigations: investigation of bacterial eye infections. *Bacteriology*. B 2 Issue no: 6.1. 2017. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-2-investigation-of-eye-swabs-and-canalicular-pus>
33. Rachitskaya AV, Flynn HW Jr, Wong J, Kuriyan AE, Miller D. A 10-year study of membrane filter system versus blood culture bottles in culturing vitrectomy cassette vitreous in infectious endophthalmitis. *Am J Ophthalmol*. 2013; 156:349-354.
34. Sambursky R, Trattler W, Tauber S, Starr C, Friedberg M, Boland T, et al. Sensitivity and specificity of the AdenoPlus test for diagnosing adenoviral conjunctivitis. *JAMA Ophthalmol*. 2013; 131:17–22.
35. Sève P, Cacoub P, Bodaghi B, et al. Uveitis: diagnostic work-up. A literature review and recommendations from an expert committee. *Autoimmunity Reviews* 2017; 16:1252-64.
36. Sharma K, Gupta V, Bansal R, Sharma A, Sharma M, Gupta A. Novel multi-targeted polymerase chain reaction for diagnosis of presumed tubercular uveitis. *J Ophthalmic Inflamm Infect* 2013; 3:25.
37. Taravati P, Lam D, Van Gelder RN. Role of molecular diagnostics in ocular microbiology. *Curr Ophthalmol Rep*. 2013; 1:1-12.
38. Taylor HR, Burton MJ, Haddad D, West S, Wright H. Trachoma. *Lancet Lond Engl*. 2014; 384:2142–52.
39. Varu DM, Rhee MK, Akpek EK, Amescua G, Farid M, Garcia-Ferrer FJ, et al. Conjunctivitis Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology*. 2019; 126:P94-P169.
40. Wilhelmus KR, Liesegang TJ, Osato MS, et al. *Laboratory diagnosis of ocular infections*. Cumi-tech 13A. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1994.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 1 de 14

PNT-IO-01

Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2008	Edición inicial
02	2019	Segunda edición

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 2 de 14

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El objetivo del presente documento es describir el procesamiento de las muestras oculares para el diagnóstico microbiológico de las infecciones bacterianas o fúngicas, excluyendo las que afectan a la retina y coroides, así como los criterios de interpretación de los cultivos.

2. FUNDAMENTO

Las infecciones oculares pueden afectar a las estructuras superficiales que rodean el ojo (conjuntivitis, blefaritis, canaliculitis, dacriocistitis, celulitis orbitaria y periorbitaria), a la superficie ocular (queratitis) o a los líquidos y tejidos intraoculares (endofthalmitis y uveítis).

El diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares es complejo por varias razones. El ojo no constituye una estructura de fácil acceso para obtener muestras por su peculiar anatomía y fisiología. La recogida de las muestras oculares sin contaminación por la microbiota comensal es difícil. El volumen de muestra obtenido es normalmente muy pequeño por lo que es recomendable que sea el médico que realiza la toma quien la inocule en los medios de cultivo.

Las muestras intraoculares se obtienen mediante procedimientos invasivos que conllevan riesgos para el paciente, y por tanto, se les debe dar la máxima prioridad en su procesamiento. Los resultados del análisis microbiológico de estas muestras pueden ser esenciales para establecer intervenciones específicas en el manejo clínico del paciente.

El diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares se basa en el examen microscópico y el aislamiento de los microorganismos responsables a partir del cultivo de las muestras oculares. En el presente documento se describen los métodos a seguir en el procesamiento de estas muestras.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017.
2. Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014.

4. MUESTRAS

4.1. VOLANTE DE PETICIÓN

El volante de petición o la petición electrónica que acompaña a cada muestra debe ser correctamente cumplimentado y en él deberán constar claramente:

- Datos demográficos del paciente (filiación, edad, número de historia), servicio de procedencia y datos del clínico que realiza la petición.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 3 de 14

- Datos de la muestra (tipo, localización anatómica, modo, fecha y hora de obtención). Se debe especificar claramente a que ojo pertenece la muestra recogida.
 - Determinaciones microbiológicas solicitadas.
 - Datos clínicos (diagnóstico o sospecha de infección del paciente, enfermedad de base, tratamiento anti-biótico previo). En las muestras intraoculares es necesario que se informe el tipo de endoftalmitis. En las muestras corneales es imprescindible indicar si la muestra procede de un paciente con lente contacto, con cuerpo extraño o asociada a cirugía LASIK.
- Además, cualquier información sobre el paciente y la muestra que contribuya a facilitar el diagnóstico microbiológico debe ser notificada.

4.1. MUESTRAS

- Las muestras se recogerán antes de iniciar el tratamiento antimicrobiano y de la instilación de anestésicos tópicos y colorantes vitales. Si ya se han utilizado, se deben eliminar por lavado con agua o solución salina estéril no bacteriostática, antes de efectuar la toma de la muestra.
- Se recomienda que la recogida de las muestras oculares, excepto los exudados conjuntivales, la realice un oftalmólogo con las máximas condiciones de asepsia y evitando la contaminación con la microbiota comensal y ambiental. Además, siempre que sea posible, se recomienda la inoculación inmediata de estas muestras en los medios de cultivo en el momento de su recogida.

- Exudado palpebral

Frotar con una torunda de dacrón o de alginato cálcico, previamente humedecida con caldo triptona-soja (TSB) o solución salina estéril, a lo largo del margen superior e inferior del párpado con el ojo cerrado. Introducir la torunda en medio Amies.

Recoger muestras conjuntivales del ojo no afectado.

- Dacriocistitis

Recoger muestras conjuntivales.

Presionar el saco y el conducto lacrimal para drenar la secreción purulenta que se recoge con aguja y jeringa o con un hisopo de dacrón o de alginato cálcico. Si se realiza dacriocistorrinostomía se aspira el absceso con aguja y jeringa.

Inocular la muestra en un envase de transporte, la torunda en medio Amies y una parte en un vial de transporte de anaerobios.

- Dacrioadenitis

Recoger muestras conjuntivales.

Recoger el exudado de la glándula lacrimal frotando una torunda por la conjuntiva tarsal inferior y el fórnix con una torunda de dacron o de alginato cálcico e introducir en medio Amies. Si se forma un absceso en la glándula lagrimal se puede obtener la muestra quirúrgicamente por aspiración con aguja y jeringa.

- Canaliculitis

Presionar el párpado y el canaliculo para drenar el material purulento que se recoge con aguja y jeringa o con un hisopo de dacrón o de alginato de calcio. También se puede aspirar el material obtenido durante una canaliculotomía.

Transportar inmediatamente al laboratorio, y si no fuera posible, inocular directamente a los medios de cultivo y realizar las extensiones para las tinciones.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 4 de 14

Inocular la muestra en un envase de transporte, la torunda en medio Amies y una parte en un vial de transporte de anaerobios.

- Celulitis preseptal

Desinfectar la piel con alcohol y povidona iodada.

Si hay herida abierta se puede recoger el exudado de la misma aspirando con aguja y jeringa.

Si es un absceso palpebral realizar una punción con aguja y jeringa.

Transportar inmediatamente al laboratorio, y si no fuera posible, inocular directamente los medios de cultivo y realizar las extensiones para las tinciones.

Inocular la muestra en un envase de transporte, la torunda en medio Amies y una parte en un vial de transporte de anaerobios.

- Celulitis septal

Obtener un aspirado o biopsia y proceder como en el punto anterior de la celulitis preseptal.

Si la celulitis es secundaria a infección sinusal puede obtenerse muestra de los senos paranasales por punción y aspiración durante la cirugía o por endoscopia.

Recoger hemocultivos.

- Exudado conjuntival

Obtener la muestra frotando una torunda de dacrón o de alginato cálcico por la conjuntiva tarsal inferior y el fórnix, recogiendo las secreciones que pudieran estar presentes e introducir en medio Amies. Si la mucosa está seca puede embeberse previamente el hisopo en solución fisiológica estéril, o en caldo triptona-soja (TSB).

Tomar una muestra para cada ojo en caso de afectación bilateral. Se recomienda la toma de muestras conjuntivales de ambos ojos incluso en el caso de conjuntivitis unilateral.

Remitir una torunda sin medio de transporte si se solicita examen microscópico.

- Raspado corneal

Instilar un anestésico tópico y realizar raspados, tanto en el centro del área inflamada de la úlcera como en los bordes, mediante golpes cortos y moderadamente firmes con la parte no cortante de una hoja de bisturí N° 15, una espátula de platino flexible de Kimura esterilizada o con una aguja estéril. Mantener los párpados separados durante la recogida.

Obtener de tres a cinco raspados por cornea.

Los oftalmólogos deben conocer la técnica de inoculación de los medios de cultivo en forma de letra "C" y la forma de realizar las extensiones en los portaobjetos para las tinciones.

Si no hay posibilidad de inocular las muestras en los medios de cultivo, realizar una sola toma con torunda flocada y medio de transporte líquido.

- Biopsia corneal

Se obtiene mediante queratectomía con microscopio quirúrgico. Enviar la biopsia de forma urgente en contenedor estéril con una pequeña cantidad de solución salina. Si ha de retrasarse la siembra, las muestras se refrigerarán, excepto en el caso de cultivo de amebas, que si no pueden procesarse en ocho horas es preferible mantenerlas a temperatura ambiente.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 5 de 14

- Tejidos de donante de córnea, medio de conservación y suturas

Obtener las muestras del anillo corneal con un bisturí estéril e introducir en contenedor con caldo TSB o similar.

Recoger una alícuota de 2 mL del medio de conservación en un envase estéril.

Retirar las suturas con pinzas estériles o cortar primero con una aguja estéril de 25 G. Se recomienda tomar un cultivo de la conjuntiva palpebral inferior y bulbar con un hisopo en medio Amies.

- Humor acuoso

Se obtiene por paracentesis de la cámara anterior con una aguja de pequeño calibre (de 25 a 30 G).

Se recomienda que el humor acuoso sea inoculado por el oftalmólogo en los medios de cultivo en el momento de su extracción. En el caso de que no sea posible, las jeringas utilizadas para la toma se pueden utilizar como medio de transporte pero siempre sin aguja y con un capuchón estéril. También se puede enviar en un tubo estéril con tapón de rosca.

- Humor vítreo

Se puede obtener vítreo por punción-aspiración con aguja y jeringa y por vitrectomía vía *pars plana* (VPP). Con este último procedimiento se obtienen dos tipos de muestras vítreas. Al inicio de la vitrectomía se recoge una muestra vítrea no diluida en una jeringa y tras la infusión de la solución salina balanceada se obtiene una muestra vítrea diluida.

Las muestras vítreas tomadas por aspiración pueden enviarse en jeringa pero siempre sin aguja y con un capuchón estéril. Las muestras vítreas diluidas se pueden enviar en el *cassette* de vitrectomía, en un envase estéril o inoculadas en viales de hemocultivos.

- Lentes intraoculares, cuerpo extraño, prótesis, implantes y otros biomateriales

Estas muestras se recogen mediante procedimientos quirúrgicos y se introducen en contenedores estériles con suero salino o TSB. Si el cuerpo extraño ha penetrado en la cavidad ocular se deben tomar muestras durante la cirugía de la herida, del líquido intraocular y de los tejidos necróticos de la lesión.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

El transporte de las muestras y de los medios de cultivo ya inoculados se realizará de forma inmediata en contenedores de transporte adecuado y a temperatura ambiente.

En general las muestras conjuntivales y de los anexos oculares se deben recibir en el laboratorio dentro de las 2 horas siguientes tras su recogida.

Las muestras corneales, del aparato lacrimal, lentes de contacto e intraoculares, cuerpo extraño, prótesis, implantes y muestras intraoculares se deben recibir en el laboratorio dentro de los 30 minutos siguientes tras su extracción.

Si no se pueden lograr estos tiempos para el transporte las muestras pueden mantenerse a temperatura ambiente no más de 24 horas.

En el caso de sospecha de anaerobios se puede inocular parte de la muestra en un vial de transporte anaeróbico. Esto es aplicable a las muestras de celulitis preseptal y orbital, dacriocistitis, canaliculitis y líquidos intraoculares. Para el transporte se deberán utilizar tubos o viales con atmósfera anaerobia, base de agar e indicador de la presencia de oxígeno como Port-A-Cul® o Portagerm®.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 6 de 14

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Las muestras corneales e intraoculares se obtienen por procedimientos quirúrgicos e invasivos por lo que se intentará no rechazarlas, pero se indicará en el informe de resultados cualquier incidencia relacionada con su identificación, transporte o conservación.

Se considerarán incidencias relacionadas con la recepción de la muestra: el retraso en el transporte, la conservación defectuosa (temperatura inadecuada o medio de transporte inadecuado) y que la muestra sea insuficiente para las determinaciones solicitadas. En este último caso se consultará al clínico responsable de la petición el orden de prioridad de las peticiones.

Se considerarán motivos de rechazo los siguientes:

- Muestras sin identificar y que no haya sido posible resolver la incidencia.
- Muestras derramadas.
- Muestras recogidas en contenedor no estéril, en formol o con otros aditivos.

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1 MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar sangre
- Agar chocolate
- Agar MacConkey
- Agar Thayer Martin, agar Martin Lewis o agar New York City
- Agar Brucella anaerobios/agar Schaedler o similar
- Agar Sabouraud con antibióticos (cloranfenicol gentamicina)
- Caldo de enriquecimiento: tioglicolato/BHI o similar

5.2 REACTIVOS Y PRODUCTOS:

- Colorantes para tinción de Gram y calcoflúor

6. APARATOS Y MATERIALES

- Cabina de seguridad biológica tipo II
- Pinzas estériles
- Tijeras y/o bisturíes estériles
- Pipetas Pasteur estériles
- Jeringas y agujas
- Asas de siembra estériles
- Portaobjetos
- Vórtex
- Estufa de aerobiosis a 35°-37°C
- Estufa con 5% de CO₂ a 35°-37°C
- Estufa de aerobiosis a 30°C
- Jarras de incubación o cámara de anaerobiosis

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 7 de 14

- Centrífuga
- Filtros esteriles de 0,45 micras y sistema de vacío
- Microscopio
- Sistema automatizado de identificación y sensibilidad
- MALDI-TOF (deseable)

7. PROCESAMIENTO

7.1 PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras se procesarán tan pronto como se reciban en el laboratorio en una cabina de bioseguridad tipo II.

Las placas que se reciban ya inoculadas se incubarán directamente.

- Exudado palpebral y muestras del aparato lacrimal:

Homogeneizar las biopsias y otros tejidos asépticamente en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina e inocular con pipeta Pasteur estéril en los medios de cultivo.

Extender una gota en uno o varios portaobjetos para realizar las extensiones necesarias para las tinciones (Gram, calcoflúor y tinción de ácido alcohol-resistencia).

Inocular las muestras recibidas en torunda en un tercio de la placa y reaislar con al menos tres estrías.

- Exudados conjuntivales:

Inocular los medios de cultivo frotando la torunda en un tercio de la placa y reaislar con al menos tres estrías.

Realizar una extensión sobre un portaobjetos con la torunda sin medio de transporte para tinción de Gram.

- Raspado corneal:

Homogeneizar las muestras recibidas en caldo 10 minutos en vortex e inocular con pipeta Pasteur estéril en los medios sólidos y en caldo de enriquecimiento tioglicolato o similar).

Extender una gota en uno o varios portaobjetos para realizar las extensiones necesarias para las tinciones (Gram, calcoflúor y tinción de ácido alcohol-resistencia).

- Biopsia corneal:

Colocar la biopsia corneal en una placa Petri estéril vacía y trocear con un bisturí. Utilizar los fragmentos para inocular los medios de cultivo y para realizar las extensiones en portaobjetos.

- Lentes de contacto, estuches y soluciones de mantenimiento:

Tomar la lente de contacto con unas pinzas estériles y arrastrarla por los medios de cultivo. Al final introducirla en caldo tioglicolato.

Transferir la solución del estuche a un contenedor estéril y frotar el interior del estuche con una torunda humedecida con agua destilada estéril. Exprimir el líquido de la torunda en la solución recogida anteriormente.

Centrifugar a 800 g durante 5 minutos. Desechar el sobrenadante dejando unos 0,5 mL para resuspender el depósito centrifugado para inocular los medios de cultivo y para realizar las extensiones en portaobjetos.

- Tejidos de donante de córnea, medio de conservación y suturas:

Colocar el tejido corneal en una placa Petri estéril vacía y trocear con un bisturí estéril.

Homogeneizar los fragmentos en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina o caldo tioglicolato (aproximadamente 1 mL).

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 8 de 14

Inocular con una pipeta Pasteur estéril en los medios de cultivo.

Extender una gota en uno o varios portaobjetos para realizar las extensiones necesarias para las tinciones (Gram, calcoflúor y tinción de ácido alcohol-resistencia).

Inocular el medio de conservación en un caldo tioglicolato.

Tomar la sutura con unas pinzas estériles, arrastrarla por los medios de cultivo y al final, introducirla en caldo tioglicolato.

- Líquidos intraoculares:

Inocular las muestras de humor vítreo y de humor acuso no diluidas directamente en los medios de cultivo distribuyendo de forma equivalente en los distintos medios (de dos a cuatro gotas en cada medio).

Depositar una gota del líquido en uno o varios portaobjetos para realizar las extensiones para las tinciones (tinción de Gram, calcoflúor y tinción de ácido alcohol-resistencia).

Las muestras vítreas diluidas se deben concentrar antes del cultivo por centrifugación o por filtración.

a) Método de centrifugación:

Centrifugar una alícuota de 5 mL de vítreo diluido a 3.000 rpm durante 5 minutos.

Transferir con una pipeta estéril todo el sobrenadante a otro envase excepto los últimos 0,5 mL Resuspender el sedimento con este volumen.

Inocular el sedimento en los medios de cultivo con un asa de siembra o pipeta estéril.

Realizar las extensiones para tinción de Gram, calcoflúor y micobacterias depositando una gota del sedimento en los portaobjetos.

b) Método de filtración:

Concentrar el lavado vítreo por filtrado al vacío a través de un filtro estéril de 0,45 micras.

Cortar asépticamente el papel de filtro en tantas partes como medios se quiera utilizar.

Arrastrar con pinzas estériles ambas superficies del papel por la superficie de cada medio de cultivo.

Colocar el trozo de filtro de papel boca arriba en el centro de la placa sobre la superficie de cada medio de cultivo.

Realizar las extensiones para tinción de Gram, calcoflúor y micobacterias raspando ambas superficies del filtro original (sin cortar) con un bisturí estéril, fijando el material raspado retirado en los portaobjetos.

Inocular dos viales de hemocultivos, uno aerobio y otro anaerobio, con hasta 10 mL de muestra vítreo diluida en cada uno.

El fluido filtrado restante puede usarse para cultivos virales o congelarse y guardarse para estudios moleculares si fuera necesario.

- Biopsias y tejidos intraoculares:

Homogenizar las biopsias y tejidos en un mortero estéril con una pequeña cantidad de solución salina. Si se sospecha infección por hongos filamentosos no se deben triturar las muestras sino cortar en pequeños fragmentos.

Inocular en los medios de cultivo con pipeta Pasteur.

Realizar las extensiones para tinción de Gram, calcoflúor y micobacterias depositando con una pipeta Pasteur una gota en los portaobjetos.

- Lentes intraoculares, cuerpo extraño, prótesis, implantes y otros biomateriales:

Colocar en una placa Petri estéril vacía la muestra que se quiera procesar: lentes intraoculares, prótesis, implantes y cualquier otro biomaterial.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 9 de 14

Trocear con un bisturí estéril y utilizar los fragmentos para inocular los medios de cultivo y para realizar las extensiones en portaobjetos. Si la muestra no se puede fragmentar, se toma con unas pinzas estériles y se arrastra por los medios de cultivo y al final se inoculara en un caldo tioglicolato.

El cuerpo extraño, si es posible, se divide en fragmentos y estos se siembran en los diferentes medios. Si el objeto es único, y no se puede fragmentar, entonces se transfiere a un envase adecuado al tamaño con caldo tioglicolato.

7.2 MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN

Las muestras conjuntivales se inocularán en agar sangre y agar chocolate. En caso de sospecha de *oftalmia neonatorum* se añadirá un medio selectivo como agar Thayer-Martin, agar Martin Lewis o agar New York City, y en pacientes hospitalizados una placa de agar MacConkey. Las muestras de celulitis preseptal se sembrarán en agar sangre, agar chocolate y se añadirá agar MacConkey y un medio no selectivo para anaerobios como el agar Brucella o agar Schaedler si es secundaria a un traumatismo.

Las muestras del aparato lacrimal, celulitis orbital, corneales, líquidos intraoculares, biopsias, lentes intraoculares, prótesis, implantes y otros biomateriales se inocularán en medios convencionales para bacterias aerobias y facultativas, como agar sangre y agar chocolate, anaerobias como agar Brucella o agar Schaedler, al menos un medio específico para hongos como agar Sabouraud con antibióticos (cloranfenicol, gentamicina) o agar Brain Heart Infusion (BHI) y en un medio líquido como el caldo tioglicolato. Además, si hay sospecha de micobacterias se añadirá Lowenstein-Jensen y un medio líquido para micobacterias.

CONDICIONES DE INCUBACIÓN

- Agar sangre, agar chocolate, agar Thayer Martin, agar Martin Lewis o agar New York City (35°-37°C, 5-7% CO₂): 3-5 días.
- Agar Brucella anaerobios/agar Schaedler o similar (35°-37°C, anaerobiosis): 10 días.
- Agar Sabouraud cloranfenicol, agar Brain Heart Infusion (30°C, aerobiosis): hasta 21 días.
- Agar MacConkey (35-37°C, aerobiosis): 48 horas.
- Caldo Tioglicolato (35-37°C, aerobiosis): 10 días.

7.3 LECTURA DE CULTIVOS E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

7.3.1 Tinción de Gram

Evaluar la presencia o ausencia de bacterias, elementos fúngicos, fibrina o material de lente fragmentada y células inflamatorias.

Se valorará la presencia o ausencia de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) con objetivo de inmersión y se registrará con un esquema no cuantitativo: no se observan PMNs, aislados (≤ 1 PMN/campo), escasos (1-4 PMNs/campo), moderados (5-10 PMNs/campo) y abundantes (>10 PMNs/campo). La presencia de PMNs sugiere una infección bacteriana.

En la tinción con calcoflúor y KOH Se evaluará la presencia de levaduras, hifas y quistes de *Acanthamoeba* spp.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 10 de 14

En las tinciones de ácido-alcohol resistencia: Ziehl-Neelsen, auramina-rodamina y Kinyoun se evaluará la presencia o ausencia de bacterias ácido-alcohol resistentes.

Informar los resultados lo antes posible al clínico peticionario y registrarlos en la hoja de trabajo correspondiente a la muestra. Esto permitirá correlacionar los morfotipos visualizados con los aislados.

7.3.2 Cultivos en medios sólidos

Examinar las placas y los medios líquidos diariamente para detectar la presencia de crecimiento. La primera lectura de los medios incubados en aerobiosis y atmósfera de CO₂ se hará a las 24 horas de incubación y los medios incubados en anaerobiosis a las 48 h. Se realizará un recuento del número de morfotipos indicando el número de colonias que crece en cada medio de cultivo.

Correlacionar los aislados con los morfotipos observados en la tinción de Gram. Si se obtienen cultivos mixtos realizar subcultivos. Una vez obtenido el cultivo puro realizar una identificación presuntiva mediante pruebas rápidas como tinción de Gram, catalasa, oxidasa, coagulasa en porta, etc. o definitiva mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). Si se considera relevante el hallazgo se avisará al clínico responsable del paciente.

Identificar los microorganismos aislados en los distintos medios de cultivo y realizar las pruebas de sensibilidad frente a los antimicrobianos según normas estandarizadas (CLSI, EUCAST).

Si no hay crecimiento reincubar todas las placas y reexaminar diariamente hasta el final del periodo de incubación.

7.3.3 Cultivos en medios líquidos

Si hay turbidez realizar tinción de Gram y sembrar los medios generales y selectivos adecuados según los microorganismos observados.

Si no hay crecimiento visible, reincubar hasta el final del periodo de incubación.

8. INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos para cada muestra se introducirán en el programa informático y serán validados por el facultativo responsable.

8.1 TINCIÓN DE GRAM

Se indicará la presencia o ausencia de bacterias, levaduras, hifas, células somáticas especialmente de leucocitos polimorfonucleares, que se pueden informar como aislados, escasos, moderados o abundantes.

8.2 CULTIVOS

La valoración de los cultivos se debe realizar según el contexto clínico del paciente, el origen de la muestra, el potencial patógeno e invasivo de los microorganismos aislados, la cantidad en la que crece el microorganismo, el número de colonias y los medios de cultivo en los que crece.

- En los exudados palpebrales se deben identificar, valorar e informar *S. aureus* y *S. epidermidis*. Otros

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 11 de 14

microorganismos como *Streptococcus* spp., *Moraxella* spp., *Corynebacterium* spp., y *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes* también pueden ser significativos. Su relevancia clínica dependerá de su crecimiento en los cultivos y del contexto clínico.

- En las muestras de dacriocistitis se debe identificar y valorar el crecimiento de *S. aureus* y *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, los bacilos gramnegativos como enterobacterias y *Pseudomonas* spp. y los microorganismos anaerobios. En las infecciones crónicas se debe considerar significativo el aislamiento de micobacterias y levaduras.
- En las muestras de dacrioadenitis se valora siempre como significativa la presencia de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *S. pyogenes* y *Pseudomonas* spp. En las formas crónicas se debe considerar significativo el aislamiento de *M. tuberculosis*.
- En las muestras de canaliculitis se debe identificar y valorar la presencia de *Propionibacterium propionicum* y de actinomicetos anaeróbicos como *Actinomyces israelii*. También se identificarán e informarán otros microorganismos menos frecuentes como *Mycobacterium chelonae*, *Nocardia* spp. y anaerobios como *Fusobacterium* spp.
- En las muestras de celulitis preseptal y orbitaria se debe identificar, valorar e informar *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* y anaerobios como *Bacteroides* spp. y *Peptostreptococcus* spp. En las celulitis orbitarias de pacientes inmunodeprimidos se valorarán los hongos filamentosos como *Aspergillus* spp. y *Mucor* spp.
- En las muestras conjuntivales, se valorarán, identificarán e informarán los microorganismos patógenos e invasivos como: *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *Moraxella* spp., *P. aeruginosa*, y enterobacteriales.

El aislamiento de otros microorganismos típicamente colonizadores puede interpretarse como significativo si tienen un crecimiento confluyente en placa, el cultivo en paralelo con el ojo sano muestra diferencias significativas y/o en el análisis microscópico por tinción de Gram se visualizan morfotipos bacterianos concordantes con el cultivo.

- En las muestras corneales se deben identificar, valorar e informar todos los microorganismos aislados si tienen un crecimiento significativo. Un crecimiento menor no excluye su importancia pero esta deberá ser valorada en el contexto clínico del paciente.

Los criterios para considerar un aislado corneal significativo incluyen, que el paciente presente signos clínicos de queratitis, más uno de los siguientes:

- el crecimiento en dos o más medios del mismo microorganismo en el sitio de inoculación.
- el crecimiento en al menos un medio sólido con el mismo microorganismo visualizado en la tinción.
- el crecimiento en el sitio de inoculación de más de 10 UFC en al menos un medio sólido.
- el aislamiento se repita en varias muestras.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición Nº 02	Página 12 de 14

En el caso de los hongos puede ser significativo cualquier crecimiento detectable en dos medios sólidos, o en al menos un medio, si además ha sido observado microscópicamente.

Estos criterios también son aplicables a microorganismos de la microbiota comensal como estafilococos coagulasa negativa, *Corynebacterium* spp. estreptococos del grupo *viridans* y *Propionibacterium* spp. En estos microorganismos de baja virulencia un crecimiento en escasa cantidad (menos de 10 UFC) en un medio sólido o solo en medio líquido se considera una contaminación. Sin embargo, aun con este escaso crecimiento estos microorganismos también pueden ser significativos en determinadas situaciones clínicas como por ejemplo en pacientes inmunodeprimidos con queratitis y en la infección postoperatoria tras cirugía LASIK.

- En las muestras intraoculares se deben identificar, valorar e informar todos los microorganismos que crezcan en cualquier cantidad. No obstante, es necesario establecer el significado de los microorganismos aislados en el cultivo. Los criterios para considerar un aislado significativo en los líquidos intraoculares incluyen:

- el crecimiento del mismo microorganismo en más de un medio sólido.
- el crecimiento de más de 10 UFC en el sitio de inoculación en un medio sólido.
- el crecimiento en al menos un medio sólido con demostración microscópica del microorganismo en la muestra clínica.
- el crecimiento de un microorganismo anaeróbico en un medio específico para anaerobios.

- No obstante, los microorganismos con crecimiento en solo un medio o en caldo también pueden ser clínicamente significativos. En este caso la interpretación dependerá del contexto clínico del paciente y de otras pruebas analíticas ya que se considera que el cultivo por sí mismo no proporciona suficiente evidencia para considerar el aislado significativo.

- En las muestras conjuntivales, palpebrales, del aparato lacrimal y otros anexos oculares si el cultivo es positivo, el informe de resultados incluirá todos los microorganismos significativos y su sensibilidad frente a los antimicrobianos. Si se aíslan microorganismos de la microbiota comensal y se ha determinado que pueden ser contaminantes, se puede incluir un comentario como "Posible contaminación" y/o "Presencia de microbiota conjuntival normal". Si el resultado del cultivo es negativo, se emitirá un informe en el que conste "No se aíslan microorganismos" o "Cultivo negativo".

- En las muestras corneales e intraoculares si el cultivo es positivo el informe de resultados incluirá todos los microorganismos y su sensibilidad frente a los antimicrobianos. En los aislados en los que no hay suficiente evidencia para considerar los microorganismos como clínicamente significativos puede añadirse al informe un comentario indicando que la importancia clínica de esos microorganismos se debe determinar en el contexto clínico del paciente.

- En el informe de resultados de sensibilidad puede añadirse un comentario indicando que la interpretación de los antibiogramas se ha realizado usando puntos de corte de CLSI o EUCAST, y en este último caso, si se basan en puntos de corte sistémicos o puntos de corte epidemiológicos (ECOFF).

- Cualquier información sobre cultivos y tinciones que pueda tener significado clínico y pueda reconducir la actitud terapéutica, se debe informar con la mayor rapidez posible al clínico responsable del paciente mediante informes provisionales escritos o telefónicos.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 13 de 14

9. RESPONSABILIDADES

- Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo.
- El personal técnico es responsable de la realización de los procedimientos microbiológicos de identificación y determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos, así como del registro de resultados.
- El personal facultativo es responsable de la supervisión de la técnica, valoración de la tinción de Gram, lectura de los cultivos y determinación de los microorganismos a valorar, así como de la supervisión del trabajo del personal técnico, comunicación telefónica de los resultados preliminares, validación de los resultados preliminares y definitivos y firma de los informes.
- El proceso de recogida de la muestra es responsabilidad del servicio solicitante pero es responsabilidad del laboratorio de Microbiología instruir a los oftalmólogos en la recogida, la inoculación de los medios de cultivo y de los portaobjetos para las tinciones, la conservación de las muestras y los medios inoculados y su transporte lo antes posible al laboratorio.
- Es responsabilidad del laboratorio de Microbiología poner a disposición de las áreas clínicas, donde habitualmente se recogen las muestras oculares, los medios de cultivo y otros materiales para su inoculación y transporte, así como informar del modo de conservación de los medios de cultivo y verificar de forma regular que no han caducado, y en su caso reponerlos.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Al ser muestras de difícil obtención, con riesgos para el paciente y en muchas ocasiones insustituibles, los criterios de rechazo deben reducirse al máximo.
- Si se sospecha infección por *N. gonorrhoeae*, debe tenerse en cuenta que es un microorganismo muy lábil a las condiciones ambientales por lo que las placas de cultivo deben estar atemperadas antes de la inoculación de la muestra.
- En la tinción de Gram de las muestras intraoculares, los gránulos de pigmento que se asemejan a los cocos grampositivos. Se pueden diferenciar porque los gránulos son más grandes, ovalados y marrones.
- En la tinción de Gram de las muestras oculares para una mejor visualización de la morfología celular se prefiere fijar la muestra con metanol al 95% o 100% de 5 a 10 minutos.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- El tratamiento antimicrobiano previo a la obtención de la muestra puede dar lugar a resultados falsos negativos.
- La recogida de la muestra sin las medidas de asepsia adecuadas puede dar resultados falsos positivos por contaminaciones con microbiota de la piel.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 02	Página 14 de 14

- Por el contrario, puede dar lugar a resultados falsos negativos considerar algunas corinebacterias como microbiota contaminante cuando pueden ser patógenas. Por ejemplo, *Corynebacterium macginleyi* que se ha asociado a conjuntivitis y úlceras corneales.

- Incluso en las mejores condiciones, el cultivo con frecuencia es negativo. El uso de técnicas de amplificación de ácidos nucleicos es una alternativa que complementa los resultados del cultivo.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Gray LD, Gilligan PH, Fowler WC. Laboratory Diagnosis of Ocular Infections. Cumitech 13B. Coordinating editor, Snyder WJ. ASM Press, Washington, DC. 2011.
2. Leber, AL. Clinical Microbiology Procedures Handbook, 4th ed. ASM Press, Washington, DC. 2016.
3. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, et al. A guide to utilization of the Microbiology laboratory for diagnosis of infectious diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of America and the American Society for Microbiology. Clin Infect Dis. 2018; 67:813–6.
4. Public Health England. UK Standards for microbiology investigations: investigation of bacterial eye infections. Bacteriology. B 2 Issue no: 6.1. 2017. Disponible en: <https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-2-investigation-of-eye-swabs-and-canalicular-pus>.
5. Wilhelmus KR, Liesegang TJ, Osato MS, et al. Laboratory diagnosis of ocular infections, Cumitech 13A. Washington, D.C. American Society for Microbiology, 1994.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición N° 02	Página 1 de 8

PNT-IO-02

Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de *Acanthamoeba* spp

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2008	Edición inicial
02	2019	Segunda edición

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición N° 02	Página 2 de 8

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Este procedimiento describe el procesamiento de muestras oculares para la detección mediante microscopía y cultivo de *Acanthamoeba* spp.

2. FUNDAMENTO

La queratitis por *Acanthamoeba* spp. es una infección corneal grave, estrechamente relacionada con las lentes de contacto. El factor predisponente son los pequeños traumatismos o ulceraciones en el epitelio corneal que provocan estas lentes, así como la utilización de soluciones contaminadas. La queratitis amebiana produce dolor intenso, fotofobia, lacrimo y visión borrosa. Las amebas se adhieren primeramente al epitelio de la córnea y pueden posteriormente invadir el estroma con un infiltrado en forma de anillo y producir incluso pérdida de visión y enucleación. Suele ser recurrente y debe diferenciarse de la queratitis producida por el virus del herpes simple. Hay que tener en cuenta que la presencia de úlceras corneales que no responden al tratamiento y la presencia de infiltrados en anillo, son signos clínicos que alertan de la posibilidad de una infección por amebas aunque el paciente no use lentes de contacto.

El género *Acanthamoeba* incluye amebas (protozoos) de vida libre ubicuas en la naturaleza, y que se encuentran en el agua, la tierra y el polvo del aire. Se han descrito al menos 24 especies y de ellas ocho se han relacionado con queratitis amebiana: *A. castellani*, *A. polyphaga*, *A. rhyodes*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. lugdunensis*, *A. quina* y *A. griffini*. *Acanthamoeba* spp. tiene dos formas de vida: la infectante (trofozoito) y la latente (quiste). El trofozoito es pleomórfico, tiene un tamaño de 15 a 45 µm, suele ser uninucleado con nucléolo central, numerosas vacuolas digestivas, una vacuola contráctil muy activa y unas proyecciones espinosas superficiales llamadas acantopodios, que son las responsables de los movimientos ameboides.

El trofozoito puede enquistarse tras un periodo de crecimiento intensivo o cuando las condiciones ambientales no le son favorables. El quiste resultante tiene un tamaño entre 10 y 25 µm, según la especie. También según la especie, los quistes pueden tener una forma redondeada o poligonal, estando rodeados de una doble pared, la externa (ectoquiste) claramente arrugada y la pared interna (endoquiste) en forma poligonal, estrellada o incluso redonda. Los quistes son resistentes a presiones ambientales físicas y químicas, incluida la desecación y mantiene sus propiedades patógenas durante años. El diagnóstico en el laboratorio de Microbiología se basa en la visualización microscópica en fresco de trofozoitos y/o quistes, de la fluorescencia de los quistes al teñirlos con blanco de calcoflúor que aprovecha la presencia de celulosa en el endoquiste y del cultivo de las amebas en un agar no nutritivo en presencia de bacterias que le sirven de alimento.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2017. Disponible en: <https://www.seimc.org/documentos-cientificos/procedimientos-microbiologia>
2. Alados Arboledas JC, Gómez García de la Pedrosa E, Leiva León J, Pérez Sáenz JL, Rojo Molinero E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. 10a. Pérez Sáenz JL (coordinador). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2014. Disponible en: <https://www.seimc.org/documentos-cientificos/procedimientos-microbiologia>

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición N° 02	Página 3 de 8

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Han de recogerse lo antes posible y preferiblemente antes de iniciar el tratamiento. Las muestras obtenidas por torunda no son útiles para el diagnóstico de queratitis amebiana.

a) Raspado corneal

La toma debe hacerla un oftalmólogo, tras la instilación de un anestésico tópico y dejándolo actuar un intervalo de tiempo. Se puede realizar empleando la parte no cortante de una hoja de bisturí N° 15 con mango Bard-Parker, con espátula de platino flexible de Kimura esterilizada o con una aguja estéril. Se debe raspar tanto el centro del área inflamada de la úlcera como los bordes, realizando golpes cortos y moderadamente firmes en una dirección. A continuación se introduce la hoja de bisturí, la espátula de Kimura o la aguja, en un tubo con 0,5 mL de caldo BHI para ser procesada en el laboratorio.

b) Biopsia corneal

Está indicada si la infección no responde al tratamiento, no se han obtenido resultados del raspado y continúa la sospecha de queratitis infecciosa o si la infección se localiza en las capas profundas del estroma. Se obtiene mediante queratectomía con microscopio quirúrgico.

Las biopsias se remitirán al laboratorio de forma urgente en un contenedor estéril con una pequeña cantidad de solución salina.

c) Lentes de contacto, estuches y soluciones de mantenimiento

En el caso de las infecciones corneales, el estudio de lentes de contacto, su estuche o soluciones, pueden aportar información importante. Esto es de especial utilidad en el caso de las infecciones por amebas, ya que un resultado negativo puede ayudar a descartar dicha infección.

Si las lentes están situadas en el ojo, se recogerán aseptícamente con guantes estériles. Se introducirán en un frasco estéril con una pequeña cantidad de suero fisiológico estéril. Los estuches y soluciones de limpieza se envían como tal.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Todas las muestras se remitirán de forma urgente al laboratorio a temperatura ambiente y se mantendrán así hasta su procesamiento. En ningún caso deben congelarse.

Las muestras se procesarán, si es posible, a su llegada al laboratorio. Si hubiera que retrasar la siembra, no se recomienda su refrigeración, es preferible mantenerlas a temperatura ambiente.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Al ser muestras de muy difícil obtención sólo se rechazarán cuando estén mal identificadas y haya sido imposible resolver la incidencia.

Cuando se registren otros tipos de incidencias como una temperatura inadecuada, muestras obtenidas con torunda, muestras en medio no apropiado, se procesarán, pero se hará constar la incidencia producida en el informe de resultados: "Interpretar los resultados con precaución: muestra recibida en condiciones defectuosas" y especificando cuál ha sido el problema.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición N° 02	Página 4 de 8

5. MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS Y PRODUCTOS

5.1. MICROSCOPIA

Solución comercial con blanco de calcoflúor con azul de Evans.

5.2. CULTIVO

- Solución salina de Page (10X)

NaCl	60 mg
MgSO₄·7H₂O	2 mg
CaCl₂·2H₂O	2 mg
Na₂HPO₄	71 mg
KH₂PO₄	68 mg
Agua destilada	500 ml

Se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Se almacena refrigerada en frasco de vidrio hasta 6 meses.

- Placa de agar no nutritivo de Page

Solución salina de Page (10X)	100 ml
Agar de Difco	15 g
Agua destilada	900 ml

Se disuelve el agar completamente mediante calor suave y agitación en la solución salina de Page y el agua destilada.

Se vierten 20 mL en tubos con tapón de rosca de tamaño 20 por 150 mm.

Se esterilizan en autoclave a 121°C durante 15 minutos y se dejan enfriar. Se almacenan bien cerrados en frigorífico con fecha de caducidad de 12 meses.

Antes de su uso se funden los tubos en agua hirviendo y cuando estén a unos 60°C se vierten asépticamente en placas Petri de plástico estériles. Estas placas pueden mantenerse durante 3 meses a 4°C, siempre que estén protegidas de la desecación.

- Se requiere un cultivo crecido en medio sólido durante 18-24 horas de *E. coli* o *Enterobacter* spp. no mucoso.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica clase II
- Microscopio binocular con objetivos 10x y 40x, o microscopio binocular invertido con objetivos 4x, 10x y 40x. Éste último es el más conveniente. En ambos es preferible que dispongan de contraste de fases.
- Micrómetro de ocular.
- Microscopio de fluorescencia con filtro de excitación de 300 a 440 nm.
- Estufa de 35°-37°C.
- Estufa de 30°C.
- Centrífuga de sobremesa, preferiblemente refrigerada.
- Placa calefactora con agitador magnético y barra agitadora.
- Agitador tipo vórtex.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición N° 02	Página 5 de 8

- Balanza de precisión.
- Guantes.
- Bisturí estéril.
- Portaobjetos.
- Cubreobjetos.
- Asa bacteriológica.
- Pipetas Pasteur estériles.
- Tubos con tapón de rosca (20 por 150 mm).
- Matraz aforado (1,000 mL).
- Placas Petri de 100 mm por 15 mm.
- Parafilm ® o equivalente.

7. PROCEDIMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Las muestras han de manipularse llevando siempre guantes y trabajando en cabina de seguridad biológica.

a) Raspado corneal

La muestra recibida en caldo se homogeneiza 10 minutos en vortex y se retira la hoja de bisturí, la espátula o la aguja. El caldo se empleará para la microscopía y cultivo.

b) Biopsia corneal

Se coloca en una placa Petri estéril vacía dentro de la cabina de seguridad biológica. Se trocea con una cuchilla estéril en una pequeña cantidad de solución salina de Page (unos 0,5 mL) se introduce en un tubo estéril y se homogeneiza 5 minutos en vortex. La suspensión con los fragmentos se emplea para realizar las extensiones en portaobjetos y para inocular el medio de cultivo.

c) Lentes de contacto, estuches y soluciones de mantenimiento

La lente de contacto se raspa con la hoja de un bisturí por la cara cóncava sobre una pequeña cantidad de solución salina de Page.

Cuando se recibe un estuche, la solución que contiene se transfiere a un contenedor estéril y se frota el interior del estuche con una torunda humedecida con agua destilada estéril. Se exprime el líquido de la torunda en la solución recogida anteriormente. Se centrifuga a 800 x g durante 10 minutos. Se deshecha el sobrenadante dejando unos 0,5 mL y se resuspende el depósito centrifugado.

En el caso de las soluciones, los pequeños volúmenes (0,5-1 mL) se pueden inocular directamente en el medio de cultivo. Los volúmenes más grandes se centrifugan a 800 x g durante 10 minutos, sembrando luego el sedimento.

7.2. PROCESAMIENTO Y LECTURA

Si al llegar al laboratorio hay una cantidad insuficiente de muestra para tinciones y cultivo, se priorizará este último.

Las muestras se procesan realizando las manipulaciones en la cabina de seguridad biológica.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición N° 02	Página 6 de 8

7.2.1 Microscopía

Se pueden realizar observación en fresco y/o tras tinción con calcoflúor

Microscopía en fresco: empleando una pipeta Pasteur estéril, se coloca una gota de la suspensión homogeneizada en el centro de un portaobjetos, se coloca el cubreobjetos y se observa en el microscopio con los objetivos 10x y 40x, con baja intensidad de luz.

En fresco el trofozoíto es pleomórfico, con un tamaño entre 15 y 45 μm , siendo el tamaño medio de 30 μm , uninucleado, con un gran nucléolo central, una vacuola contráctil muy activa y sus característicos seudópodos (acantopodios) con movimientos ameboides. El quiste tiene un tamaño entre 10 y 25 μm y puede tener forma redondeada o poligonal y rodeado de una doble pared, la externa arrugada y la interna de forma poligonal, estrellada o redonda.

Microscopía con tinción de calcofluor: con una varilla o pipeta Pasteur estéril, se extiende una gota uniformemente por el centro del portaobjetos. Se deja secar al aire. Se fija con metanol absoluto durante 2 a 3 minutos. Se seca al aire. Se añaden varias gotas de blanco de calcofluor-azul de Evans y se deja reposar durante 5 minutos. Se gira el portaobjetos para retirar el exceso de líquido de tinción. Se añade un cubreobjetos y se examina inmediatamente al microscopio de fluorescencia.

Los quistes de *Acanthamoeba* spp. muestran fluorescencia y se ven de un color verde claro y con una pared externa arrugada. Otras células, como las de los hongos, también pueden producir fluorescencia. Los trofozoítos no emiten fluorescencia.

7.2.2 Cultivo

Se retiran las placas de agar no nutritivo del frigorífico y se introducen en la estufa de 35°-37°C durante 30 minutos.

Se añade con una pipeta Pasteur 0,5 mL de solución de Page a un cultivo de 18-24 horas en tubo inclinado de *E. coli* o *Enterobacter* spp. no mucosos. Se raspa con suavidad la superficie inclinada sin romper el agar. Con la pipeta Pasteur se suspende la bacteria mediante pipeteo suave. Con la misma pipeta se añaden 2 o 3 gotas de la suspensión en el centro del agar que habíamos precalentado. Con una torunda estéril se extienden las bacterias de forma uniforme en la superficie del agar.

Las muestras clínicas líquidas homogeneizadas se inoculan con 2-3 gotas de pipeta Pasteur en el centro de la placa del agar no nutritivo cubierto con las bacterias y se deja absorber. Las muestras sólidas se colocan directamente en el centro de la placa. Las placas se sellan con Parafilm o similar y se incuban con la tapa hacia arriba en la estufa de 30°C (a 37°C algunas cepas crecen poco) en el interior de una bolsa sellada o una caja húmeda.

A las 24 horas se examinan invirtiendo las placas y observándolas al microscopio a través del agar con objetivo de bajo aumento (10x). Si fueran negativas se siguen observando diariamente hasta los 10 días. Para facilitar la visualización, es preferible el empleo de un microscopio invertido con contraste de fases. No es necesario abrir la placa.

Los trofozoítos se pueden ver en los finos caminos que abren en la capa bacteriana.

Vistas al microscopio, las amebas se asemejan a pequeñas manchas y cuando se observan cuidadosamente puede distinguirse su movimiento.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición N° 02	Página 7 de 8

En los casos de infección grave, las amebas se pueden ver a las 24-48 horas. Los quistes suelen formarse en una semana.

Si se ven amebas, se marca la zona con un rotulador fino. Dentro de una cabina de seguridad biológica, se retira con cuidado el sellado de Parafilm y de la misma manera se corta con un bisturí estéril la zona marcada del agar. La pieza obtenida se coloca boca-abajo en la superficie de una nueva placa de agar no nutritivo con una capa de bacterias. Se sella e incuba como anteriormente. Este cultivo adicional permite poder realizar pruebas adicionales si fueran necesarias.

7.3 CONTROL DE CALIDAD

Los reactivos y medios han de revisarse cada vez que se emplean o periódicamente. Han de tener una fecha anterior a la de caducidad y libres de signos visibles de precipitación o contaminación.

Se recomiendan cultivos de control con fines comparativos, aunque hay prevenir la contaminación cruzada con los cultivos de los pacientes.

Como cepa de control se puede emplear una *Acanthamoeba* spp. no patógena, la ATCC 30010 (*Acanthamoeba castellanii*). Ha de mantenerse a temperatura ambiente y subcultivarse mensualmente.

Para las tinciones, se prepara un portaobjetos de una cepa de la ameba de control en paralelo con los del paciente.

Los cultivos control se siembran en medios recientes y se cultivan en paralelo con los del paciente. El resultado es aceptable si el crecimiento se produce en los primeros siete días.

El microscopio debe calibrarse al menos cada 12 meses.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

La identificación de *Acanthamoeba* spp. se basa en las características morfológicas microscópicas descritas en el apartado 7.2.1. y en las características de crecimiento del apartado 7.2.2.

Las muestras se informarán como presencia o ausencia de *Acanthamoeba* spp., según proceda, especificándose si se observan trofozoítos, quistes o ambos.

Los resultados positivos se introducirán en el sistema informático, se validarán por el facultativo especialista y dada su gravedad, se informarán también telefónicamente.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con una formación específica. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

La toma de muestra, su transporte y conservación, por parte de los servicios implicados, debe estar asesorada por los responsables del laboratorio de Microbiología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Pueden obtenerse resultados falsamente negativos cuando la toma de muestra, su transporte o su conservación no ha sido la adecuada.

Deben extremarse las precauciones para evitar contaminaciones cruzadas o del exterior, ya que *Acanthamoeba* spp. son ubicuas.

Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para la detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición N° 02	Página 8 de 8

Todas las manipulaciones deben realizarse con guantes y en cabina de seguridad biológica.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

Antes de realizar este procedimiento, el laboratorio debe comprobar con cepas control que los resultados que obtiene son adecuados.

El resultado obtenido depende en gran medida de la toma y calidad de la muestra remitida

Un cultivo positivo del estuche de las lentes o de la solución de limpieza no confirma el diagnóstico, pero sugiere infección por *Acanthamoeba* spp.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia LS. Diagnostic medical parasitology. 6th ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2016.
2. Leber AL. Clinical microbiology procedures handbook. 4th ed. American Society for Microbiology. Washington DC. 2016.
3. Lorenzo-Morales J, Martin-Navarro CM, Lopez-Arencibia A, Arnalich-Montiel F, Pinero JE, Valladares B. Acanthamoeba keratitis: an emerging disease gathering importance worldwide?. Trends in Parasitology 2013; 29:181-187.
4. Marciano-Cabral F, Cabral G. Acanthamoeba spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003; 16:273–307.
5. Public Health England. UK Standards for microbiology investigations: investigation of bacterial eye infections. Bacteriology. B 2 Issue no: 6.1. 2017. Accesible en: <https://www.gov.uk/government/publications/smi-b-2-investigation-of-eye-swabs-and-canalicular-pus>

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico molecular de infecciones oculares por <i>Chlamydia trachomatis</i> , virus herpes, virus varicela-zoster, adenovirus, <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-03	
		Edición N° 01	Página 1 de 7

PNT-IO-03

Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico molecular de infecciones oculares por *Chlamydia trachomatis*, virus herpes, virus varicela-zoster, adenovirus, *Acanthamoeba* spp.

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO	
Nombre / Firma	Fecha	Nombre / Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01	2019	Edición inicial

COPIA REGISTRADA N°.....ASIGNADA A.....

Este documento es propiedad del Servicio de Microbiología del Hospital/Centro.....
La información en él contenida no podrá reproducirse total ni parcialmente sin autorización escrita del Responsable de su elaboración. Las copias no registradas no se mantienen actualizadas a sus destinatarios.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico molecular de infecciones oculares por <i>Chlamydia trachomatis</i> , virus herpes, virus varicela-zoster, adenovirus, <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-03	
		Edición N° 01	Página 2 de 7

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

El propósito de este procedimiento es describir la metodología a seguir para la detección molecular de microorganismos implicados en infecciones oculares como *Chlamydia trachomatis*, virus herpes simple, virus varicela-zoster, adenovirus y *Acanthamoeba* spp. en muestras biológicas de raspado conjuntival, raspado corneal, humor acuoso y/o humor vítreo.

Este procedimiento es aplicable a todos los laboratorios de Microbiología Clínica que posean los medios necesarios para llevar a cabo estudios de microbiología molecular.

2. FUNDAMENTO

Numerosos estudios avalan el uso de técnicas moleculares para la detección de virus, *Chlamydia trachomatis* y *Acanthamoeba* spp. en infecciones oculares debido a la ventaja que aportan en cuanto a sensibilidad y rapidez en el diagnóstico frente a las técnicas tradicionales. Debido a la delicada anatomía del ojo, las muestras oculares son difíciles de obtener (requiriendo en ocasiones procedimientos invasivos) y de escaso volumen. Por ello, la correcta manipulación y procesamiento de las mismas, aplicando técnicas que aporten la mayor sensibilidad son cruciales para obtener un diagnóstico adecuado.

Los adenovirus humanos son virus de ADN bicatenarios sin envuelta, con una nucleocápside de simetría icosaédrica. Se clasifican en 7 especies: A, B, C, D, E, F y G. Hasta la fecha se han descrito al menos 56 serotipos diferentes. Causan una amplia gama de cuadros clínicos, entre los que se encuentran las infecciones oculares en forma de fiebre faringo-conjuntival o de queratoconjuntivitis epidémica, siendo los adenovirus los agentes etiológicos más frecuentes en las conjuntivitis infecciosas. Los virus Herpes simplex tipo 1 (VHS-1), Herpes simplex tipo 2 (VHS-2) y el virus Varicela-Zoster (VVZ) son miembros de la familia *Herpesviridae*, virus envueltos con ADN lineal de cadena doble, los cuales causan latencia en las neuronas ganglionares y pueden reactivarse a lo largo de la vida del paciente. Entre los cuadros clínicos que provocan están la conjuntivitis, incluyendo casos de *oftalmia neonatorum*, queratitis, uveítis y retinitis. *Chlamydia trachomatis* es una bacteria intracelular obligada cuyos diferentes biovaries pueden producir cuadros de tracomia (A-C), conjuntivitis de inclusión en el adulto y conjuntivitis neonatal (D-K). *Acanthamoeba* spp. es un protozoo pequeño no flagelado de vida libre ampliamente diseminado en el ambiente. Es un agente causal de queratitis, asociada fundamentalmente al uso de lentes de contacto. Aunque su incidencia es baja, el cuadro clínico que produce es bastante agresivo, pudiendo llegar a producir perforación corneal, pérdida de agudeza visual e incluso ceguera.

Existen distintos *kits* comerciales con marcado CE-IVD para la detección de Adenovirus, VHS-1, VHS-2, VVZ y *C. trachomatis*, la mayoría basados en técnicas de PCR a tiempo real con tecnología Taqman, y otros basados en PCR y detección por sondas de captura en *arrays*. Algunos de ellos están validados específicamente para muestras oculares mientras que otros están concebidos para su uso con otros tipos de muestras (sangre, muestras genitales...). Si se emplea un kit no validado para muestras oculares, debe llevarse a cabo la validación por parte del usuario de la técnica en el tipo de muestra que se vaya a emplear previo a su realización. En el caso de *Acanthamoeba* spp. no se dispone actualmente de métodos comerciales para su detección molecular, aunque sí están descritos en la literatura procedimientos de PCR a tiempo final o a tiempo real dirigidos a amplificar secuencias específicas del gen 18S ADNr, que permiten detectar bajo número de quistes y trofozoítos en muestras biológicas.

En el caso de Adenovirus, VHS-1, VHS-2, VVZ y *C. trachomatis*, en este procedimiento se propone llevar a cabo la detección molecular con alguno de los *kits* de PCR presentes en el mercado, mientras que en caso de *Acanthamoeba* spp. se proponen los reactivos y condiciones necesarios para llevar a cabo la amplifica-

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico molecular de infecciones oculares por <i>Chlamydia trachomatis</i> , virus herpes, virus varicela-zoster, adenovirus, <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-03	
		Edición Nº 01	Página 3 de 7

ción de material genético por PCR convencional y detección de amplicones por electroforesis en gel de agarosa. Cada laboratorio deberá poner a punto la técnica y verificar su funcionamiento antes de su realización e inclusión para el diagnóstico microbiológico.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

1. García-Lechuz Moya JM, González López JJ, Orta Mira N, Sánchez Romero MI. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el Laboratorio de Microbiología. 2017. 1b. Sánchez Romero MI (coordinadora). Procedimientos en Microbiología Clínica. Cercenado Mansilla E, Cantón Moreno R (editores). SEIMC 2017. Disponible en <http://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientos-microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
2. Pérez Saénz JL (Coordinador). Alados JC, Gómez E, Leiva J, Pérez-Sáenz JL, Rojo E. Seguridad en el laboratorio de Microbiología Clínica. Procedimientos en Microbiología Clínica 10a. SEIMC 2014. Disponible en: <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>
3. Manual de instrucciones del *kit* de extracción empleado.
4. Manual de instrucciones del *kit* de PCR comercial que se emplee en cada caso.

4. MUESTRAS

4.1. OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Las muestras de raspado conjuntival o corneal se recogerán con un hisopo de dacrón y se introducirán en un medio líquido de transporte adecuado para las técnicas moleculares (por ejemplo, medio líquido de Amies o medio para virus). También se aceptan torundas secas si están correctamente transportadas. En caso de extraerse la muestra con espátula de Kimura, ésta se introducirá en un vial con 1-2 mL de solución salina o agua estéril. Las muestras de humor acuoso o vítreo las recogerá el oftalmólogo por punción-aspiración con jeringa.

4.2. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN

Las muestras de raspado conjuntival o corneal se remitirán al laboratorio de Microbiología en el menor tiempo posible desde su toma. En caso de no poder procesarse inmediatamente se conservarán durante a 4°C durante 24 horas, o a -70°C si es por periodos más prolongados.

Las muestras de humor acuoso o humor vítreo se remitirán en mano al laboratorio de Microbiología en el dispositivo original empleado por el oftalmólogo para su extracción (jeringa), con la finalidad de evitar pérdidas de volumen de las muestras en su trasvase.

4.3. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN Y RECHAZO

Se rechazarán las muestras mal identificadas y aquellas de exudado conjuntival cuyo medio de transporte no sea el adecuado. Las muestras extraídas por procedimientos invasivos, por ser especialmente difíciles de obtener, no se rechazarán salvo que la muestra esté mal identificada y haya sido imposible resolver la incidencia. Cuando se registren otros tipos de incidencias como una conservación inadecuada (temperatura inapropiada, muestras en medio no apropiado), se procesarán para amplificación molecular, pero se hará constar la incidencia producida en el informe de resultados: "Interpretar los resultados con precaución: muestra recibida en condiciones defectuosas", especificando cuál ha sido el problema.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico molecular de infecciones oculares por <i>Chlamydia trachomatis</i> , virus herpes, virus varicela-zoster, adenovirus, <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-03	
		Edición N° 01	Página 4 de 7

5. REACTIVOS Y PRODUCTOS

- Sistema de extracción de ácidos nucleicos (automático o manual).
- Reactivos, controles y demás productos suministrados por el fabricante de la técnica en caso de emplearse un *kit* comercial.
- Reactivos para la amplificación de *Acanthamoeba* spp. (PCR a tiempo final): Taq polimerasa, MgCl₂, dNTPs, *primers*, H₂O libre de nucleasas.

Primers	Secuencia (5'-3')	Región amplificada	Tamaño del amplicón (pb)
JDP1 JDP2	GGCCCAGATCGTTTACCGTGAA TCTCACAAGCTGCTAGGGAGTCA	18S ARNr	423-551*

* El tamaño del amplicón varía en función de la especie amplificada.

- Reactivos para la detección de amplicones de *Acanthamoeba* spp.: agarosa, tampón TBE 1X, agente intercalante para el gel de agarosa, buffer de carga, marcador de peso molecular de 100 pb o similar, agua destilada.

6. APARATOS Y MATERIAL

- Cabina de seguridad biológica.
- Agitador orbital tipo vórtex.
- Sistema de extracción automático en caso necesario.
- Espectrofotómetro Nanodrop.
- Termociclador. Deberán utilizarse los equipos adecuados para cada técnica siguiendo las indicaciones del fabricante.
- Pipetas calibradas de volumen variable.
- Puntas para pipetas con filtro de diferentes calibres.
- Tubos de plástico de fondo cónico tipo Eppendorf de 1,5 mL.
- Tubos para la reacción de PCR.
- Gradillas.
- Balanza.
- Matraces y probetas para preparar la suspensión de agarosa.
- Fuente de electroforesis, bandejas y cubetas.
- Horno microondas.
- Sistema de visualización de geles con transiluminador UV.
- Contenedores de residuos.
- Termobloque.
- Microcentrífuga.
- Guantes de acetonitrilo o similares.

7. PROCEDIMIENTO

-7.1 MANIPULACIÓN DE LA MUESTRA

- El procesamiento de las muestras se realizará en campana de bioseguridad.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico molecular de infecciones oculares por <i>Chlamydia trachomatis</i> , virus herpes, virus varicela-zoster, adenovirus, <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-03	
		Edición N° 01	Página 5 de 7

- Las muestras tomadas en torunda se homogeneizarán utilizando un vortex en 1-2 mL de medio de transporte.
- La extracción de ácidos nucleicos se realizará a partir de alícuotas de 200-500 µL del medio de transporte, según se detalle en el procedimiento habitual de trabajo del laboratorio correspondiente.
- Líquidos biológicos como humor acuoso o humor vítreo se extraerán directamente. Si su volumen fuese insuficiente puede diluirse en solución salina estéril, teniendo en cuenta que esto puede influir en la sensibilidad de la técnica.

7.2 DETECCIÓN DE ADENOVIRUS, VHS-1, VHS-2, VVZ Y *C. trachomatis*.

Al existir distintos métodos comerciales para la detección de estos microorganismos con marcado CE, es aconsejable seguir el protocolo y recomendaciones que proporcionan los fabricantes. En los casos en que sea necesario un proceso de extracción de ácidos nucleicos previo, se deben emplear los métodos que los fabricantes recomiendan, ya que han sido validados para el uso con dichos protocolos. Los resultados se interpretarán según las especificaciones de la casa comercial correspondiente.

7.3 DETECCIÓN DE *Acanthamoeba* spp.

7.3.1. Extracción del material genético

- Puede emplearse un sistema manual de extracción de ADN (QIAmp DNA Minikit de Quiagen® o similar) o automático con proteinasa K, como el Maxwell® 16 tissue DNA purification Kit (Promega).
- Cuantificación del ADN extraído con espectrofotómetro Nanodrop.
- El material genético una vez extraído se debe procesar. En caso de que no pueda procesarse de inmediato, se puede conservar a -20°C.

7.3.2 Reacción de amplificación

- La reacción se hace en un volumen final de 30 µL, con 1,25 U Taq DNA polimerasa, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de dNTPs, 0,2 µM de cada primer, y 30 ng de ADN extraído de la muestra.
- El protocolo de amplificación es de 7 minutos a 95°C, seguido de 45 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de anillamiento a 60°C y 1 minuto de elongación a 72°C, seguido de 10 minutos de elongación final a 72°C. Posterior refrigeración a 4°C.
- En cada ensayo se introducirán además del ADN de las muestras, un control negativo (agua bidestilada estéril y libre de nucleasas) y un control positivo.

7.3.4. Detección de los productos de amplificación

- Preparar un gel de agarosa al 2 % en TBE 1X y agente intercalante e introducirlo en una cubeta de electroforesis con TBE 1X.
- Homogeneizar en tubos limpios 2 µL de buffer de carga y 8 µL de cada producto de PCR.
- Cargar los 10 µL anteriores en el gel, incluyendo el marcador de 100 pb en una de las calles.
- Correr el gel a 100 v hasta que el frente alcance el borde del mismo.
- Visualizar el gel con transiluminador UV.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico molecular de infecciones oculares por <i>Chlamydia trachomatis</i> , virus herpes, virus varicela-zoster, adenovirus, <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-01	
		Edición N° 01	Página 6 de 7

7.3.5. Lectura e interpretación de resultados

En la calle del gel correspondiente al control negativo no deberá aparecer ninguna banda, y si apareciese indicaría contaminación de la PCR y el ensayo no se consideraría válido. El control positivo debe presentar

una banda de amplificación del tamaño esperado ya que de lo contrario indicaría algún tipo de error en el ensayo y debería repetirse. Si las dos condiciones anteriores se cumplen, las muestras se consideran positivas cuando en su calle aparece una banda correspondiente al amplicón del tamaño adecuado o negativas si no aparece la banda.

8. OBTENCIÓN Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos para cada muestra se introducirán en el programa informático y serán validados por el facultativo responsable.

9. RESPONSABILIDADES

Deben estar descritas en el manual general de organización del laboratorio de Microbiología y en las fichas de descripción de los puestos de trabajo. El procedimiento deberá llevarse a cabo por personal técnico cualificado con un entrenamiento específico. La supervisión de la técnica y de los resultados emitidos deberá realizarla el facultativo especialista responsable del laboratorio de Microbiología que los emite.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

- Todo el personal del laboratorio deberá conocer y seguir las normas generales de bioseguridad e higiene, así como las normas de trabajo en laboratorios de Microbiología Clínica y de Biología Molecular. Todas las manipulaciones deben realizarse con guantes.
- Es importante considerar que para la obtención de resultados correctos en un laboratorio de diagnóstico molecular en el que se realizan técnicas de PCR, se debe seguir un flujo de trabajo unidireccional, que inicia en el área de preparación de reactivos, continúa en el de extracción o preparación de las muestras y finaliza en el de amplificación y detección. Cada una de estas áreas debe tener material propio no intercambiable.
- El manejo del material que esté en contacto con agentes intercalantes, deben usarse siempre guantes y extremarse las precauciones de seguridad, ya que son reactivos tóxicos.
- La visualización de geles con transiluminador UV, debe realizarse con caretas protectoras o en sistema cerrado de visualización de geles.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Los resultados obtenidos dependen en gran medida de la calidad de la muestra remitida, de los procesos de transporte y conservación, así como de la correcta extracción del material genético.
- El uso de sustancias tóxicas previo a la toma de muestras conjuntivales o corneales como ciertos anestésicos o tinciones con fluoresceína pueden tener efectos inhibidores de la PCR a tiempo real.

Servicio / Unidad de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico molecular de infecciones oculares por <i>Chlamydia trachomatis</i> , virus herpes, virus varicela-zoster, adenovirus, <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-01	
		Edición N° 01	Página 7 de 7

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Arnalich-Montiel F, Lumbreras-Fernández B, Martín-Navarro CM, Valladares B, Lopez-Velez R, Morcillo-Laiz R, et al. Influence of *Acanthamoeba* genotype on clinical course and outcomes for patients with *Acanthamoeba* keratitis in Spain. *J Clin Microbiol.* 2014; 52:1213–6.
2. Doan T, Pinsky BA. Current and future molecular diagnostics for ocular infectious diseases. *Curr Opin Ophthalmol.* 2016; 27:561–7.
3. Goldschmidt P, Rostane H, Saint-Jean C, Batellier L, Alouch C, Zito E, et al. Effects of topical anaesthetics and fluorescein on the real-time PCR used for the diagnosis of Herpesviruses and *Acanthamoeba* keratitis. *Br J Ophthalmol.* 2006; 90:1354–6.
4. Maycock NJR, Jayaswal R. Update on *Acanthamoeba* keratitis: diagnosis, treatment, and outcomes. *Cornea.* 2016; 35:713–20.
5. Schroeder JM, Booton GC, Hay J, Niszl IA, Seal DV, Markus MB, et al. Use of subgenomic 18S ribosomal DNA PCR and sequencing for genus and genotype identification of *Acanthamoebae* from humans with keratitis and from sewage sludge. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:1903–11.
6. Taravati P, Lam D, Van Gelder RN. Role of molecular diagnostics in ocular microbiology. *Curr Ophthalmol Rep.* 2013; 1(4).