

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades
Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

31.

Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares

2 0 0 8

Coordinador: Lorena López-Cerero

Autores: Jaime Etxebarria
Lorena López-Cerero
Josep Mensa



ISBN-978-84-613-1485-0

INDICE DEL DOCUMENTO CIENTÍFICO

1. Introducción

2. Consideraciones clínicas

- 2.1. Conjuntivitis
- 2.2. Queratitis
- 2.3. Endoftalmitis
- 2.4. Uveitis/coriorretinitis
- 2.5. Infecciones de anexos oculares
 - 2.5.1. Blefaritis
 - 2.5.2. Orzuelo
 - 2.5.3. Dacriocistitis y dacrioadenitis
 - 2.5.4. Canaliculitis

3. Recogida de la muestra

- 3.1. Exudado conjuntival
- 3.2. Raspado corneal
- 3.3. Biopsia corneal
- 3.4. Lente de contacto
- 3.5. Humor vítreo
- 3.6. Lente intraocular
- 3.7. Exudado palpebral
- 3.8. Muestras del aparato lagrimal
- 3.9. Sangre

4. Transporte y conservación de la muestra

- 4.1. Exudados
- 4.2. Raspado corneal
- 4.3. Humor vítreo
- 4.4. Muestras del aparato lagrimal
- 4.5. Biopsias y lentes

5. Manejo de la muestra en el laboratorio de microbiología

6. Procesamiento de la muestra

7. Selección de medios y condiciones de incubación. Cultivos

8. Criterios para la interpretación de resultados

9. Procedimientos adicionales a realizar en situaciones especiales

- 9.1. Cultivo de micobacterias
- 9.2. Serología

10. Información de resultados

11. Técnicas rápidas de diagnóstico

12. Procedimientos no aceptables

13. Bibliografía

INDICE DE LOS DOCUMENTOS TÉCNICOS

- 1. PNT-IO-01. Procedimiento de muestras oculares para diagnóstico de infección bacteriana o fúngica
- 2. PNT-IO-02. Procedimiento de muestras oculares para detección y cultivo de *Acanthamoeba* spp.

Procedimientos en Microbiología Clínica

Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades

Infecciosas y Microbiología Clínica

Editores: Emilia Cercenado y Rafael Cantón

31. DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO DE LAS INFECCIONES OCULARES. 2008

Coordinadora: Lorena López-Cerero

Autores: Jaime Etxebarria
Lorena López-Cerero
Josep Mensa

1. INTRODUCCIÓN

La infección ocular es una de las principales causas de ceguera en los países en vías de desarrollo esencialmente debido al tracoma. Asimismo, es una infección relevante en los países occidentales debido a la infección herpética y, más recientemente, al aumento de las intervenciones quirúrgicas y las complicaciones asociadas al uso de lentes de contacto. Para el manejo de estas infecciones es fundamental establecer el diagnóstico microbiológico puesto que las manifestaciones clínicas a menudo son inespecíficas. Por otro lado, el diagnóstico debe obtenerse lo más pronto posible porque los tejidos oculares son muy vulnerables a la respuesta inflamatoria y su lesión conduce a la pérdida irreversible de agudeza visual.

La toma de muestra para análisis microbiológico, antes de la instauración del tratamiento antibiótico, figura en todas las recomendaciones para el abordaje de este tipo de infecciones. No obstante, en la práctica clínica, la estrategia empleada con mayor frecuencia es el inicio de una pauta de tratamiento antibiótico empírico, por las siguientes razones: en primer lugar, la anatomía de las estructuras oculares no permite el fácil acceso a la toma de muestras, requiriéndose con frecuencia la punción ocular para obtener una biopsia o un aspirado. En segundo lugar, el cultivo de los exudados oculares tiene una sensibilidad baja o moderada, en torno al 60% en el mejor de los casos, a lo que hay que añadir la lentitud en conseguir los resultados. Varios estudios sugieren que rara vez (<10%) este resultado conduce a una modificación del tratamiento. En estos momentos, carecemos de estudios adecuados que comparen la terapia empírica frente al coste-beneficio de un tratamiento basado en datos microbiológicos.

El bajo rendimiento de las muestras clínicas se debe, en parte, al pequeño volumen de material que puede obtenerse. El espesor de la córnea en el adulto es de 1 mm en la región periférica y solamente 0,6 mm en la región central. En cuanto al vítreo y a la cámara anterior, suponen un volumen aproximado de 4-5 ml y 1,5-2 ml, respectivamente. Es necesario emplear métodos de transporte adecuados que eviten la dilución excesiva, deshidratación o pérdida de la muestra. Asimismo es importante que exista una buena comunicación entre el clínico y el laboratorio, ya que son los datos clínicos los que guiarán la elección de los medios de cultivo más apropiados y el reparto del escaso volumen de la muestra.

2. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

2.1. CONJUNTIVITIS

La infección de la conjuntiva es uno de los motivos más frecuentes de consulta. La etiología más común es la vírica, seguida por la bacteriana. En nuestro medio la etiología fúngica o parasitaria es excepcional. La conjuntivitis vírica, en la mayoría de los casos, tiene un curso autolimitado y la valoración de la presentación clínica y las características epidemiológicas en general hacen innecesario

realizar pruebas para establecer el diagnóstico etiológico salvo en caso de estudios epidemiológicos. Los virus más frecuentes son adenovirus, virus respiratorios y virus del grupo herpes.

Las bacterias son responsables del 50-75% de los episodios de conjuntivitis en los que se realiza una toma de muestra para cultivo. Las conjuntivitis bacterianas se clasifican, en función de su gravedad en agudas, hiperagudas, crónicas y las causadas por *Chlamydia*. La infección aguda es la más frecuente, con sintomatología de menos de 3-4 semanas de evolución, y están implicados en su etiología *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y en algunas ocasiones enterobacterias y otros bacilos gramnegativos. *Neisseria gonorrhoeae* es la causa más frecuente de la forma hiperaguda, aunque es una entidad rara hoy en día, afecta a neonatos (*oftalmia neonatorum*) y en los adultos como enfermedad de transmisión sexual (ETS). En las conjuntivitis crónicas se aíslan *S. aureus*, y *Moraxella lacunata*, aunque también se han observado bacilos gramnegativos y *Actinomyces* spp. Por último, la infección ocular por *Chlamydia* en nuestro medio se manifiesta en el adulto y en el neonato como una conjuntivitis de inclusión.

2.2. QUERATITIS

La queratitis es una infección del epitelio corneal y con cierta frecuencia, pero no siempre, de otras capas de la córnea. Hasta hace unos años, las queratitis de etiología bacteriana o fúngica eran raras y estaban asociadas a un trauma ocular o de la superficie corneal. Sin embargo, dos fenómenos nuevos han hecho variar la incidencia de esta infección: por un lado, el amplio uso de las lentes de contacto, y por otro, la cirugía corneal no invasiva fotorrefractiva, aunque esta última raramente se complica con infección.

La queratitis es 6 veces más frecuente en portadores de lentes de contacto, debido no sólo a las posibles escoriaciones y al uso inapropiado por parte del paciente, sino también a la hipercapnia e hipoxia corneal que causan las lentes. La composición de la lente también puede influir. Se ha observado que los trofozoitos de *Acanthamoeba* tienen mayor facilidad de adherirse a las lentes de primera generación de hidrogel de silicona que a las de segunda generación. Recientemente, el uso de un líquido de conservación de lentillas, con un alto contenido en polímeros, la contaminación de algunos lotes y probablemente el empleo inadecuado por parte de los usuarios ha facilitado la contaminación por hongos, y se ha asociado a una epidemia internacional de queratitis por *Fusarium* y otros hongos filamentosos.

La mayoría de las queratitis adquiridas en la comunidad se resuelven con tratamiento empírico sin necesidad de establecer el diagnóstico microbiológico. Las características clínicas de las úlceras permiten en un número elevado de casos (65%), predecir su etiología, sobre todo cuando

están producidas por *Pseudomonas aeruginosa* o por *Acanthamoeba*. En general, existe consenso en que se debe tomar una muestra para examen microbiológico cuando la úlcera es profunda, mayor de 1x1 mm en extensión, la lesión está adelgazando la córnea, la inflamación es significativa, el infiltrado se extiende a la profundidad del estroma, existe hipopión o necrosis, la úlcera es crónica, hay sospecha de queratitis fúngica, amebiana o micobacteriana o el tratamiento empírico fracasa.

La mayoría de las queratitis infecciosas están causadas por bacterias, predominando los cocos grampositivos (aproximadamente un 80% de los casos) y entre ellos los estafilococos coagulasa negativa, y en segundo lugar enterobacterias y *Pseudomonas* spp. (10-20%). La incidencia de queratitis por *Acanthamoeba* y por hongos es baja en nuestro medio (1-2%), así como las de etiología mixta (2,5%).

2. 3. ENDOFTALMITIS

La endoftalmitis es la inflamación de los fluidos y tejidos intraoculares. A pesar de un tratamiento adecuado, con frecuencia conduce a la pérdida total o parcial de la visión. Los microorganismos pueden alcanzar el globo ocular por dos vías: 1) por inoculación directa en una herida traumática o postquirúrgica o a través de una úlcera corneal o queratitis, o 2) por diseminación hematógena. Los microorganismos causales y la forma de presentación clínica difieren en función de la puerta de entrada.

La endoftalmitis postquirúrgica es la más frecuente, constituyendo hasta un 70% de todas las formas de endoftalmitis. Es más frecuente tras cirugía de catarata (0,05%) y tras intervención del glaucoma. Puede presentarse de forma aguda, dentro de las 6 primeras semanas tras la intervención, sobre todo entre el tercer y séptimo día postoperatorio, o de forma tardía, varios meses después de la cirugía. Los microorganismos más frecuentes en las formas agudas son los estafilococos coagulasa negativa (>60%), seguido de *S. aureus*, *S. pneumoniae*, estreptococos del grupo *viridans* y bacilos gramnegativos en un porcentaje pequeño de casos. En cambio, en las formas tardías se detectan microorganismos menos virulentos, como *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus coagulasa negativa* y con menos frecuencia *Corynebacterium* spp., y micobacterias atípicas como *Mycobacterium chelonae*. Los hongos pueden llegar a representar en algunas series entre el 8 y el 18% de los casos.

La endoftalmitis postraumática, secundaria a la penetración en el globo ocular de un cuerpo extraño, supone el 25% de las endoftalmitis (incluyendo el trauma rotura de la cápsula del cristalino). Las especies de *Bacillus*, especialmente *Bacillus cereus*, son los microorganismos más frecuentes, causando entre el 28 y el 46% de estas infecciones, seguido de estafilococos y de infecciones polimicrobianas.

La endoftalmitis endógena es poco frecuente, representando el 2-17% de todos los casos, y a

menudo se produce en pacientes inmunodeprimidos o adictos a drogas parenterales. A diferencia de las otras formas de endoftalmitis, está causada con mayor frecuencia por hongos que por bacterias. *Candida* spp. es el agente aislado en el 35% de todos los casos, y en segundo lugar *Aspergillus* spp., que produce el 24%. Dentro de las formas bacterianas, la incidencia de microorganismos grampositivos y gramnegativos es similar, destacando *S. aureus*, estreptococos, *Neisseria meningitidis*, enterobacterias y *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4. UVEITIS/CORIORRETINITIS

En el curso de un episodio de bacteriemia el microorganismo puede metastazarse en la coroides o la retina. *M. tuberculosis*, *Treponema pallidum* y *Borrelia burgdorferi* pueden causar coriorretinitis, tanto en el polo anterior como posterior. Los virus causales de coriorretinitis y uveitis son el virus del herpes simple (VHS) (necrosis retiniana), el virus varicela zoster (VVZ), el citomegalovirus (CMV), el virus de Epstein-Barr (EBV) y el virus de la rubéola. Varios parásitos pueden producir patología en la coroides, el más frecuente es *Toxoplasma gondii*, aunque también podemos encontrar en nuestro medio *Toxocara* spp. y larvas de *Taenia solium*.

2.5. INFECCIONES DE ANEXOS OCULARES

2.5.1. Blefaritis. Se trata de la infección del párpado que puede afectar al margen anterior o a las glándulas meibomianas. Estas infecciones suelen relacionarse con alteraciones de las secreciones lipídicas. Las bacterias aisladas de pacientes con blefaritis incluyen *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. acnes* y corinebacterias. También se han observado hongos como *Pityrosporum*, especialmente en el caso de blefaritis posterior o meibomianitis, y parásitos como *Demodex folliculorum*. Se recomienda un diagnóstico microbiológico en los casos recurrentes y que no responden al tratamiento.

2.5.2. Orzuelo. Se trata de un absceso de la glándula palpebral originado por microbiota cutánea, principalmente por *S. aureus*.

2.5.3 Dacriocistitis y dacrioadenitis. Es la infección del saco y de la glándula lagrimal respectivamente. La dacriocistitis suele deberse a la obstrucción del conducto lagrimal inferior. Puede presentarse de forma aguda o crónica, siendo ésta última la más frecuente. Los microorganismos relacionados frecuentemente con esta patología son cocos grampositivos como *S. aureus* y *S. pneumoniae*, en segundo lugar están los bacilos gramnegativos, predominantes en las formas crónicas, como *H. influenzae*, *Pseudomonas* spp., enterobacterias, y por último en raras ocasiones pueden estar implicadas micobacterias. La afectación de la glándula lagrimal con frecuencia es metastásica o secundaria a una infección diseminada, como mononucleosis infecciosa, tuberculosis o incluso brucelosis.

2.5.4. Canaliculitis. Es una infección poco frecuente y se suele presentar en personas de edad avanzada.

La etiología más frecuente son los actinomicetos, sobre todo *Actinomyces israelii*, aunque también se pueden aislar *Nocardia* spp. y *Mycobacterium* spp., así como bacterias anaerobias como *Fusobacterium* spp.

3. RECOGIDA DE LA MUESTRA

3.1. EXUDADO CONJUNTIVAL

El exudado conjuntival debe obtenerse antes de la instauración de tratamiento tópico con colirios. Se frota la conjuntiva tarsal con un hisopo de Dacron o alginato cálcico conservado en medio de transporte de Amies. Si la mucosa está seca, hay que empapar la torunda en caldo tripton-soja (TSB) en caldo infusión cerebro-corazón (BHI) antes de tomar la muestra. Además, debe obtenerse una segunda muestra sin medio de transporte para poder efectuar un examen microscópico. Si se sospecha infección por *Chlamydia* hay que tomar una torunda adicional y colocar la muestra en el medio de transporte específico que utilice el laboratorio. Del mismo modo en caso de infección vírica la muestra debe introducirse en medio de transporte adecuado para virus. Durante la toma de la muestra ha de evitarse el contacto con el borde del párpado para no arrastrar microbiota colonizante.

3.2. RASPADO CORNEAL

La muestra debe tomarse antes de instaurar el tratamiento antibiótico, sobre todo si es un colirio. Se calcula que el inóculo bacteriano en los raspados puede variar entre 100 a 300 UFC en total de la muestra en un volumen que oscila entre 1 y 3 μ L (Kaye, 2003). El inóculo es tan bajo que se afecta de forma significativa por la presencia de antibióticos tópicos, reduciendo la sensibilidad del cultivo en un 30-40%.

No existe consenso sobre el instrumento o el procedimiento a seguir para la toma de muestra. Se pueden utilizar tanto espátulas de Kimura, hoja Bard-Parker, hojas de bisturí por el extremo no cortante (número 15), agujas estériles o bien escobillones empapados en caldo tioglicolato o una combinación de ambos. La espátula o la hoja de bisturí permiten desbridar la capa superficial y acceder a los microorganismos que invaden las capas más profundas. Se debe raspar tanto el fondo de la úlcera como los bordes.

3.3. BIOPSIA CORNEAL

Está indicada la toma de una biopsia corneal si la infección no responde al tratamiento o si los cultivos de los raspados han sido negativos y continúa la sospecha clínica de queratitis infecciosa. También está indicada si la infección se localiza en las capas profundas del estroma inaccesibles al raspado. La biopsia puede realizarse con el microscopio quirúrgico con una hoja pequeña, utilizando trépanos de 2-3 mm de diámetro. Se lleva a cabo trepanación no penetrante y con ayuda de cuchillote o espátula se finaliza la queratectomía parcial. De forma

anecdótica, también se ha utilizado laser para realizar queratectomías superficiales.

3.4. LENTE DE CONTACTO

El cultivo de la lente de contacto tiene utilidad en los casos de sospecha de infección por *Acanthamoeba* spp.

3.5. HUMOR VÍTREO

Las muestras para el diagnóstico microbiológico deben tomarse antes de la instauración del tratamiento antibiótico, especialmente si éste se administra mediante inyección intravítrea. Puede obtenerse una muestra de humor vítreo, por aspiración con jeringa en el quirófano o preferentemente por vitrectomía y lavado para evitar tracciones vítreas. El análisis del humor acuoso tiene una escasa sensibilidad para determinar la etiología de una vitritis.

3.6. LENTE INTRAOCULAR

Puede cultivarse en los casos de endoftalmítis postquirúrgica tras implante. Una vez extraída, se introduce en 0,5 ml de solución salina estéril y se remite al laboratorio.

3.7. EXUDADO PALPEBRAL

Para obtener este exudado se debe frotar el borde del párpado o de la zona ulcerada con una torunda de algodón o alginato cálcico previamente humedecida en caldo TSB o BHI.

3.8. MUESTRAS DEL APARATO LAGRIMAL

Si hay exudado purulento procedente del canal o del saco lagrimal, hay que aspirarlo con jeringa. También se puede aspirar el material obtenido en el curso de una dacriocistotomía o canaliculotomía. Si se observan concreciones en el canal deben extraerse con una espátula o cureta y a continuación se extienden sobre un portaobjetos para su posterior tinción. Si se realiza la extirpación del saco o de la glándula lagrimal, se debe introducir en suero salino estéril para remitirlo al laboratorio.

3.9. SANGRE

En caso de endoftalmítis hematógena han de practicarse hemocultivos por punción venosa.

4. TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA

4.1. EXUDADOS

En general, para el transporte de las muestras se recomienda la utilización de medios de transporte, como el medio de Amies si se han utilizado torundas, y su conservación refrigerada (4-8°C) hasta el momento de su procesamiento en el laboratorio.

4.2. RASPADO CORNEAL

Tradicionalmente, el raspado de la úlcera se sembraba directamente en medios sólidos en la misma consulta del oftalmólogo, debido al volumen de muestra tan pequeño. Esta práctica presenta varios inconvenientes: 1) hay que mantener varios medios de cultivo en la consulta, 2) es difícil la

siembra en la superficie del agar utilizando la mayoría de las veces una hoja de bisturí, sobre todo para personal no experimentado en las técnicas microbiológicas, 3) el manejo de medios enriquecidos fuera del ambiente controlado del laboratorio favorece su contaminación, 4) es necesario raspar varias veces la úlcera y a veces no es posible debido a la delgadez de la córnea, y por último, 3) una vez realizada la siembra hay que enviar las placas con rapidez al laboratorio para su incubación en una atmósfera apropiada.

Se ha analizado la alternativa de utilizar medios de transporte en lugar de la inoculación directa, obteniéndose un rendimiento similar para la recuperación de bacterias y hongos, simulando intervalos de 3-4 horas e incluso 24 horas tras la toma de la muestra. Se puede utilizar como transporte un hisopo en medio Amies o caldo peptonado como el BHI. El medio líquido presenta la ventaja frente a la utilización de hisopos que permite una homogeneización una vez que llega al laboratorio, por lo que se puede realizar un único raspado. A partir del caldo, una vez homogeneizado, se pueden realizar las extensiones para el examen microscópico, el subcultivo en varios medios sólidos y, además, el mismo caldo sirve como medio de enriquecimiento.

4.3. HUMOR VÍTREO

Las muestras de aspirado vítreo o lavados tras vitrectomía deben remitirse de forma urgente al laboratorio. Una alternativa para el transporte y posterior cultivo del aspirado vítreo es la inoculación, directa tras la obtención, en viales de hemocultivo pediátricos, ya que se trata de muestras con un escaso volumen.

4.4. MUESTRAS DEL APARATO LAGRIMAL

Tanto los aspirados como las muestras resultantes de una extirpación quirúrgica deben remitirse en contenedores con atmósfera reducida para detección de microorganismos anaerobios.

4.5. BIOPSIAS Y LENTES

Deben remitirse al laboratorio de forma urgente en contenedor estéril con una pequeña cantidad de solución salina.

5. MANEJO DE LA MUESTRA EN EL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

El límite para aceptar muestras de exudados oculares o intraoculares debe ser un máximo de 24 horas. Las muestras deben estar correctamente identificadas, acompañadas del correspondiente volante de solicitud y en el contenedor adecuado. En caso contrario, deben ser rechazadas para su análisis, comunicando esta incidencia lo antes posible al remitente. Para más información sobre este aspecto consultar el PNT-RTP-01 del procedimiento de "Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio de Microbiología" (Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida,

transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología nº 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003).

6. PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA

Los exudados palpebrales y conjuntivales se inoculan directamente en medios sólidos, mientras que en las muestras corneales, vítreas o del aparato lagrimal debe emplearse además un caldo de enriquecimiento (TSB, BHI o tioglicolato). Los medios sólidos se inocularán realsiendo al menos en tres estrías para poder estimar la cantidad de crecimiento. Si se ha empleado un caldo como medio de transporte, este debe homogeneizarse en vortex antes de inocularlo en los medios sólidos. En el caso de la lente intraocular, debe agitarse vigorosamente en vortex en la solución salina de transporte durante al menos 10 minutos para permitir el desprendimiento de células. La lente de contacto se raspa con la hoja de un bisturí por la cara cóncava. El lavado de humor vítreo debe concentrarse mediante filtración con filtros estériles de polivinilo de 0,22 μ y cultivar el filtro o mediante centrifugación, lo que permite aumentar la sensibilidad hasta en un 30-40%.

El examen microscópico es fundamental en el caso de conjuntivitis hiperaguda, oftalmía neonatorum, queratitis y endoftalmitis, ya que la evolución de la infección puede ser muy rápida. La posibilidad de diferenciar células bacterianas o estructuras fúngicas puede orientar un tratamiento precoz. También es importante el resultado de la tinción de Gram en las muestras corneales, conjuntivales y palpebrales para evaluar la significación clínica de los aislados y descartar microbiota colonizante.

La tinción de Gram tiene una sensibilidad baja en los raspados corneales, aproximadamente un 30% en las úlceras tempranas o pequeñas (< 2 mm) y entre un 40-60% en las úlceras más avanzadas, aunque hay que tener en cuenta que en muchos casos los pacientes han recibido antibióticos previamente. La sensibilidad de la tinción de Gram en las muestras vítreas es también muy baja. Los hongos pueden detectarse en las muestras de raspado con varios métodos incluyendo la preparación en fresco con KOH, tinción con naranja de acridina, azul de lactofenol, Giemsa y calcofluor, con una sensibilidad que varía entre el 50-80%. En las infecciones del aparato lagrimal deben de realizarse adicionalmente extensiones para tinciones de ácido-alcohol resistencia (Ziehl Neelsen, Kinyoun, auramina-rodamina...)

Si existe sospecha clínica de queratitis por *Acanthamoeba* (infiltrado en anillo, portador de lente de contacto...) se debe realizar un examen en fresco del raspado o biopsia corneal o del raspado de la lente de contacto, aunque la sensibilidad es baja. En la preparación en fresco o con 10% de KOH, *Acanthamoeba* se reconoce por los quistes de doble pared característicos, una pared arrugada externa (ectoquiste) y una interna poligonal (endoquiste). Si

se deja transcurrir el tiempo de la preparación, la morfología del quiste puede desintegrarse. En caso de sospecha de infección por *Chlamydia*, dependiendo de las técnicas disponibles en el laboratorio, se pueden hacer extensiones para inmunofluorescencia directa, cultivo o detección mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos.

7. SELECCIÓN DE MEDIOS Y CONDICIONES DE INCUBACIÓN. CULTIVOS.

Los medios de cultivo sólidos deben incluir agar sangre de carnero 5% (o de caballo), agar chocolate, incubados ambos a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂, y agar MacConkey a 37°C. Si se trata de una conjuntivitis hiperaguda o es un recién nacido, se debe inocular también en medio selectivo para gonococo (agar Thayer Martin, Martin-Lewis o New York City) e incubar a 37°C en atmósfera con 10% de CO₂. En caso de sospecha de infección fúngica opcionalmente se puede añadir agar Saboureaud incubado a 25-30°C. En las muestras del aparato lagrimal hay que incluir medios para anaerobios (agar Schaendler, Brucella...) e incubación en condiciones de anaerobiosis.

Excepto en las muestras de exudado palpebral y conjuntival, el resto de las muestras oculares deben inocularse en caldo de enriquecimiento, incubado a 37°C y un mínimo de 5 días y si existe sospecha de hongos a 25°C durante un periodo entre 5 y 14 días. En los casos de canaliculitis y sospecha de actinomicosis hay que mantener la incubación dos semanas. Existen varios estudios que demuestran que la incorporación de un medio líquido, a los medios sólidos tradicionales, incrementa el rendimiento del cultivo bacteriano en un 20-30%. Los medios líquidos empleados varían entre los diferentes estudios. Se han utilizado caldos peptonados de fabricación casera, tioglicolato, BHI comercial y también medios comerciales de sistemas automáticos como el BACTEC Peds Plus, aunque no existen análisis comparativos entre los distintos medios de enriquecimiento.

Acanthamoeba spp. puede recuperarse fácilmente a partir de agar no nutriente (medio salino de Page) o que contenga bajas concentraciones de nutriente (0,05% de peptona, 0,05% de extracto de levadura, 0,1% de glucosa) en presencia de bacterias y a 30°C. En general, se deben usar cepas no mucosas de *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. o *Klebsiella* spp. debido a que la presencia de la cápsula mucosa impide la fagocitosis amebiana. La presencia de amebas puede detectarse examinando la superficie del agar con un microscopio convencional, invirtiendo la placa, y enfocando con el objetivo de 10X. Las amebas empiezan a cubrir la superficie del agar en uno o dos días, por lo que los cultivos deben examinarse cada día y se deben descartar como negativos a los 7 días.

8. CRITERIOS PARA LA INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

El examen microscópico de las muestras permite valorar la significación de los aislados, especialmente cuando se trata de microorganismos propios de la microbiota cutánea del párpado. Aunque no disponemos de estudios que hayan analizado de forma cuantitativa la correlación entre la tinción, el recuento bacteriano y el cuadro clínico, la visualización de bacterias en las tinciones indica un inóculo significativo. La presencia de leucocitos y bacterias intracelulares también son indicadores de infección por esos microorganismos. Se valora siempre la presencia de patógenos como *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *P. acnes*, *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., levaduras y hongos filamentosos. En muestras del aparato lagrimal se valorará la presencia de microbiota mixta anaerobia. En las muestras intraoculares y biopsias todos los aislados son significativos. La detección de *C. trachomatis* es siempre significativa.

Con frecuencia se aíslan bacterias procedentes del borde palpebral a partir de conjuntiva sana. En la mucosa sin infección se encuentran estafilococos coagulasa negativa y corinebacterias, pero también patógenos tradicionales como estafilococos, estreptococos, *Haemophilus* y *Moraxella*. En situaciones de no infección, la cantidad presente de estas bacterias en la conjuntiva es pequeña, generalmente produciendo menos de 10 colonias en la placa de cultivo, mientras que en los casos de conjuntivitis aguda se obtiene un crecimiento confluyente.

Para valorar los cultivos corneales se deben tener en cuenta las siguientes situaciones: en primer lugar que un resultado negativo no descarta el origen infeccioso de la úlcera, y en segundo lugar que la superficie de la córnea puede estar cubierta transitoriamente de microbiota vehiculizada por el flujo lagrimal. No es posible detectar el agente causal en aproximadamente el 35-60% de los pacientes con sospecha de queratitis infecciosa, posiblemente debido al insuficiente material que se puede obtener, el retraso en la toma de muestra o el uso previo de antibióticos. La sensibilidad del cultivo disminuye cuando se trata de infecciones fúngicas respecto a las bacterianas. En general, las úlceras corneales de mayor tamaño (>2 mm) proporcionan suficiente material para el análisis microbiológico, tanto la extensión para tinciones como para el cultivo. Para considerar como relevante un aislado, especialmente cuando se trata de estafilococos coagulasa negativa o estreptococos del grupo viridans, debe ser en cultivo puro y coincidir con los hallazgos del examen microscópico o detectarse en varios medios de cultivo o en varios raspados.

9. PROCEDIMIENTOS ADICIONALES A REALIZAR EN SITUACIONES ESPECIALES

9.1. CULTIVO DE MICOBACTERIAS

En lesiones oculares crónicas con reiterados cultivos negativos y sospecha de etiología infecciosa

se debe incluir el cultivo del material en medio para micobacterias (ver PNT-BK-03 y 04; Alcaide F (Coordinador), Alcaide F, Esteban J, González Martín J, Palacios JJ. Micobacterias, Procedimientos en Microbiología nº 9 a, 2ª edición. SEIMC. 2005.

Disponible en

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>) para el cultivo de micobacterias en medio sólido y líquido.

9.2. SEROLOGÍA

El diagnóstico de coroiditis y retinitis se basa habitualmente en la presencia de características clínicas en la coroides y la retina, la recuperación de microorganismos en sangre mediante hemocultivo o la demostración de títulos elevados o seroconversión a patógenos como VVZ, CMV, EBV, *T. pallidum*, *B. burdorferi*, *T. gondii* y *Toxocara* spp. También es posible realizar la biopsia retiniana con objeto de detectar virus de la familia de los herpesvirus en cuadros de necrosis retiniana.

10. INFORMACIÓN DE RESULTADOS

Una vez valorado un aislado como significativo, se debe llevar a cabo la identificación y estudio de sensibilidad en el caso de etiología bacteriana o fúngica. Es importante considerar que los niveles antibióticos que se alcanzan con la administración tópica o subtenal son superiores a los séricos, por lo que el valor de la CMI convencional tiene poco valor cuando se va a emplear ésta vía.

Debido a la importancia en las infecciones oculares de un adecuado tratamiento precoz, ante la detección de microorganismos intracelulares, levaduras, hifas o quistes amebianos mediante el examen microscópico debe emitirse un informe preliminar de forma urgente. En los cultivos en los que se aísla microbiota comensal del área palpebral se informará como "microbiota habitual saprofita" y si el cultivo es negativo como "no se aíslan microorganismos".

11. TÉCNICAS RÁPIDAS DE DIAGNÓSTICO

Métodos moleculares

Existen varios motivos que justifican el empleo de la PCR en las infecciones oculares fúngicas. En primer lugar, la sensibilidad del cultivo en los casos de endoftalmitis no es superior al 70% y en las queratitis no supera el 75-80% debido al escaso inóculo. En segundo lugar, el procedimiento de cultivo e identificación puede requerir más de una semana, lo que demora la instauración precoz de un tratamiento adecuado. Por último, es importante evitar la utilización innecesaria de antifúngicos de forma empírica dados los efectos tóxicos de muchos de ellos. Como contrapartida, la utilización de métodos moleculares no permite el estudio de sensibilidad ni la recuperación del aislado con fines epidemiológicos.

En estos momentos, la PCR para hongos ofrece como prestaciones una mayor sensibilidad que el cultivo, el diagnóstico de infección fúngica en el mismo día de la toma de muestra y, según el

procedimiento llevado a cabo, la identificación de especie en 24 horas. Actualmente no está disponible ninguna técnica comercial validada ni tampoco PCR en tiempo real, pero existe experiencia clínica de varios métodos caseros de PCR convencional en el diagnóstico de infección por *Scedosporium* spp., *Candida* spp. y *Aspergillus* spp. Estos métodos se basan en la amplificación de las regiones espaciadoras entre los genes ARNr fúngicos, la ITS1 e ITS2, utilizando cebadores que reconocen secuencias conservadas en todos los hongos al final de la subunidad 18S y al principio de la subunidad 28S. En un segundo paso, el análisis de la región ITS2/5,8S ARNr, bien mediante secuenciación o mediante polimorfismo de restricción, permite la identificación de especie gracias a su variabilidad.

La emergencia actual de queratitis por *Acanthamoeba* spp. y la gravedad de estas úlceras han motivado el diseño de métodos moleculares de diagnóstico. Las lesiones producidas por este parásito no siempre tienen una morfología típica en estadios precoces, pudiéndose confundir con queratitis víricas y retrasándose el tratamiento correspondiente. Actualmente no existe un método comercial validado, pero se han diseñado procedimientos de PCR en tiempo real con sondas TaqMan dirigidas a secuencias específicas de la fracción 18S del ARNr. Estas técnicas permiten detectar un bajo número de quistes y trofozoitos en lesiones de portadores de lentes de contacto.

12. PROCEDIMIENTOS NO ACEPTABLES

No deben admitirse muestras si han transcurrido más de 24 horas de la toma y sin medio de transporte. No deben procesarse especímenes para la investigación de anaerobios si ha transcurrido más de una hora desde la toma o si ésta no se ha conservado en el adecuado medio de transporte reducido. El cultivo de las lentes de contacto o del contenido de las cajas conservadoras de lentes no aporta nada el diagnóstico microbiológico de la queratitis bacteriana o fúngica. Los líquidos conservantes o la superficie de la lente de contacto pueden estar contaminados por microbiota mixta saprofita debido a las costumbres higiénicas del usuario y al contenido del líquido. En menos del 25% de los casos coincide el microorganismo aislado en la lente o en el líquido de lentillas con el aislado de la úlcera corneal.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. American Academy of Ophthalmology. Summary benchmarks for preferred practice pattern guidelines. November 2008. <http://one.aao.org>
2. Callegan MC, Engelbert M, Parke II DW, Jett B, Gilmore M. Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium-host interactions. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 111-124.
3. Chang Dc, Grant GB, O'Donnell K, et al. for the *Fusarium* keratitis Investigation Team. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with the use of a contact lens solution. JAMA 2006; 296: 953-963.

4. Dahlgren M, Lingappan A, Wilhelmus K. The clinical diagnosis of microbial keratitis. *Am J Ophthalmol* 2007; 143: 940-944.
5. Jackson WB. Blepharitis: current strategies for diagnosis and management. *Can J Ophthalmol* 2008; 43: 170-179.
6. Kaye SB, Rao PG, Smith G, Scott JA, Hoyles S, Morton CE, Willoughby C, Batterbury M, Harvey G. Simplifying collection of corneal specimens in cases of suspected bacterial keratitis. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 3192-3197.
7. Kratz A, Levy J, Belfair N, Weinstein O, Klemperer I, Lifshitz T. Broth culture yield vs traditional approach in the work-up of endophthalmitis. *Am J Ophthalmol*. 2006; 141: 1022-1026.
8. Keay L, Edwards K, Naduvilath T et al. Microbial keratitis: predisposing factors and morbidity. *Ophthalmology* 2006; 113: 109-116.
9. Klotz SA, Penn C, Negvesky G, Butrus SI. Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev* 2000; 13: 662-685.
10. Ferrer C, Colom F, Frasés S, Mulet E, Abad JL, Alió JL. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal RNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol*. 2001; 39: 2873-2879.
11. McLeod S, Kumar A, Cevallos V, Srinivasan M, Whitcher JP. Reliability of transport medium in the laboratory evaluation of corneal ulcers. *Am J Ophthalmol* 2005; 14: 1027-1031.
12. Mills DM, Bodman MG, Meyer DR, Morton AD 3rd; ASOPRS Dacryocystitis Study Group. The microbiologic spectrum of dacryocystitis: a national study of acute versus chronic infection. *Ophthalm Plast Reconstr Surg*. 2007; 23: 302-306.
13. Sharma S, Kunimoto DY, Gopinathan U, Athmanathan S, Garg P, Rao GN. Evaluation of corneal scraping smear examination methods in the diagnosis of bacterial and fungal keratitis. *Cornea* 2002; 21: 643-647.
14. Schuster FL. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15: 342-354.
15. Tarabishy AB, Hall GS, Procop GW, Jeng BH. Bacterial culture isolates from hospitalized pediatric patients with conjunctivitis. *Am J Ophthalmol* 2006; 142: 678-680.
16. Thompson PP, Kowalski RP, Shanks RM, Gordon YJ. Validation of real-time PCR for laboratory diagnosis of *Acanthamoeba* keratitis. *J Clin Microbiol*. 2008; 46: 3232-3236.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-IO-01
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS OCULARES PARA DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN
BACTERIANA O FÚNGICA

ELABORADO		REVISADO Y APROBADO Jefe de Servicio	
Nombre/Firma	Fecha	Nombre/Firma	Fecha

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		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 de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para diagnóstico de infección bacteriana o fúngica	PNT-IO-01	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir los métodos para el procesamiento de muestras oculares para el diagnóstico de infección bacteriana o fúngica de las estructuras del globo ocular, excluyendo las que afectan a la retina y coroides.

2. FUNDAMENTO

El diagnóstico de las infecciones oculares es generalmente clínico debido a varias razones: 1) con frecuencia se trata de afecciones autolimitadas, 2) la presentación clínica y los datos epidemiológicos habitualmente son característicos, 3) el diagnóstico microbiológico mediante examen microscópico directo y cultivo tiene una sensibilidad baja o moderada y, por último, 4) el resultado microbiológico puede tardar más de 48 horas. No obstante, se recomienda llevar a cabo un diagnóstico etiológico en las ocasiones que haya habido mala respuesta al tratamiento previo, si la lesión se cronifica o si la evolución es muy rápida y/o grave y cuando se sospechen microorganismos poco frecuentes.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. ed. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. 2007. American Society for Microbiology. Washington, DC.

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología n° 1 a, 2ª edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Se admiten las siguientes muestras según la localización de la infección:

1. Exudado conjuntival: se recoge con hisopo de Dacron o alginato cálcico exudado de la mucosa tarsal y se introduce en medio de transporte Amies. Si la conjuntiva está seca, empapar la torunda previamente en caldo BHI o TSB. Remitir una segunda torunda para realizar el examen microscópico.
2. Raspado corneal: anestesiando previamente la lesión, raspar con objeto punzante estéril (espátula de Kimura, hoja de bisturí n° 15 o aguja) los bordes de las úlceras e introducir el raspado en 0,5 cc de caldo de transporte (BHI, TSB o tioglicolato). También se puede recoger superficie corneal con torunda de alginato cálcico previamente humedecido con TSB y remitir en medio de transporte Amies.
3. Biopsia corneal: obtenida mediante queratectomía con microscopio quirúrgico. Remitir la biopsia en solución salina estéril o en caldo de transporte (BHI, TSB o tioglicolato)

4. Lente intraocular: tras la extracción se remite en solución salina estéril o en caldo de transporte (BHI, TSB o tioglicolato)
5. Humor vítreo: se puede obtener mediante aspiración con aguja estéril, biopsiando el material de una vitrectomía o tras lavado del vítreo. Remitir en contenedor estéril.
6. Exudado palpebral: se recoge con hisopo de Dacron o alginato cálcico exudado del borde palpebral, eliminando previamente con suero salino estéril el pus. La torunda se introduce en medio de transporte Amies.
7. Exudado canalicular o del saco lagrimal: si drena abundante material purulento, presionar el conducto o el saco y recoger el exudado con torunda de alginato cálcico o si es posible con jeringa. Remitir el escobillón con medio de transporte Amies, mientras que el contenido de la jeringa introducirlo en un vial adecuado para transporte de anaerobios. Si no drena tras presión, recoger el exudado mediante aspiración con jeringa y aguja. Remitir el exudado en medio de transporte para anaerobios.
8. Biopsia del aparato lagrimal: si se lleva a cabo exéresis del saco o de la glándula lagrimal, remitir la biopsia en suero salino estéril.

No se admite para cultivo bacteriano o fúngico las lentes de contacto, las soluciones oftálmicas o las torundas sin medio de transporte.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

Medios de cultivo:

- agar sangre
- agar chocolate
- agar MacConkey
- agar Saboureaud
- agar Thayer Martin, Martin-Lewis o New York City
- agar Brucella/ agar Schaenler
- caldo tioglicolato

6. APARATOS Y MATERIALES

- cabina de seguridad biológica
- asas de siembra estériles
- pipetas Pasteur estériles
- portaobjetos
- vortex
- estufa a 37°C en aerobiosis
- estufa a 37°C con 5% de CO₂ o jarras de incubación con sistemas generadores de esa atmósfera
- estufa a 37°C en anaerobiosis o jarras de incubación con sistemas generadores de atmósfera anaerobia
- estufa a 30°C en aerobiosis
- centrífuga
- filtros estériles de 0,22 μ

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN E INOCULACIÓN DE LAS MUESTRAS

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

a) Muestras en torunda: se inoculan directamente en los medios sólidos reaislando en tres estrías. Los medios sólidos empleados deben incluir agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey. En caso de conjuntivitis neonatal o hiperaguda añadir un medio selectivo para gonococo (agar Thayer Martin, Martin-Lewis o New York City). En caso de frotis corneales o exudados del aparato lagrimal, añadir agar Saboureaud. Por último, preparar una extensión sobre portaobjetos para tinción de Gram. Opcionalmente, si existe sospecha de infección fúngica o por actinomicetos, se pueden preparar extensiones para examen en fresco, tinción con calcofluor y/o tinción para ácido-alcohol resistencia.

b) Raspados y biopsias corneales: homogeneizar la muestra agitando 10 minutos en vortex e inocular con pipeta Pasteur los medios sólidos (agar sangre, agar chocolate y agar Saboureaud), reaislando con el asa en tres estrías, y el caldo de enriquecimiento (tioglicolato). Extender una gota sobre un portaobjetos para tinción de Gram y, si existe sospecha de queratitis fúngica, otra para examen en fresco o tinción para hongos (calcofluor).

c) Lente intraocular: proceder como en el raspado corneal.

d) Humor vítreo: si la muestra se ha obtenido mediante aspiración con jeringa o biopsia se inocula directamente en los medios. Si se trata de un lavado del vítreo hay que concentrarla mediante filtración, cultivando el filtro, o mediante centrifugación 15 minutos. Sembrar en agar sangre, agar chocolate, agar MacConkey, agar Saboureaud, reaislando con el asa en tres estrías, y en caldo tioglicolato. Extender una gota sobre un portaobjetos para tinción de Gram u otras si se considera oportuno.

e) Aspirados y biopsias lagrimales: homogeneizar con 0,1 ml de caldo tioglicolato en vortex durante 1-2 minutos y sembrar con pipeta Pasteur en agar sangre, agar chocolate, agar para anaerobios, reaislando con el asa en tres estrías, y el caldo de enriquecimiento (tioglicolato). Extender una gota sobre un portaobjetos para tinción de Gram.

7.2. INCUBACIÓN DE LOS MEDIOS

- agar sangre, agar chocolate y agar selectivo para gonococo: incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 horas
- agar MacConkey: incubar a 37°C en aerobiosis durante 48 horas
- agar Saboureaud: incubar a 30°C en aerobiosis durante 7 días
- agar Brucella o Shaendler: incubar a 37°C en anaerobiosis durante 5 días
- caldo tioglicolato: incubar a 37°C durante 5 días

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS

Se valorarán los aislados que crezcan en cultivo puro y que coincida con los hallazgos del examen microscópico en fresco o tras tinción. Se valora siempre la presencia de patógenos como

Staphylococcus aureus, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces* spp., *Nocardia* spp., levaduras y hongos filamentosos. En muestras del aparato lagrimal se valorará flora mixta anaerobia. En las muestras intraoculares y biopsias todos los aislados son significativos. Los cultivos en los que se aísla microbiota comensal del área palpebral o cutánea se informa como "microbiota habitual saprofita" y si el cultivo es negativo como "no se aíslan microorganismos".

9. RESPONSABILIDADES

La toma de muestra y su conservación hasta que se remite al laboratorio es responsabilidad del Servicio de Oftalmología o del médico de Atención primaria.

La información sobre las condiciones de toma, transporte y conservación de la muestra, así como de proporcionar el caldo adecuado para el transporte, es responsabilidad del Servicio de Microbiología.

La recepción, identificación, aceptación o rechazo y procesamiento de la muestra es responsabilidad del personal técnico del Servicio de Microbiología.

La valoración del examen microscópico directo, lectura del cultivo e informe de resultados es responsabilidad del facultativo del Servicio de Microbiología. Se incluye también entre sus responsabilidades la supervisión del trabajo del personal técnico, la adopción y seguimiento de medidas correctoras y las interconsultas con el Servicio de Oftalmología o médico responsable.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El examen microscópico de los exudados conjuntivales y raspados corneales tiene baja sensibilidad para las infecciones bacterianas (30-60%) y moderada para las fúngicas (50-80%). La sensibilidad del cultivo de muestras corneales e intraoculares depende del volumen de muestra y el uso de antimicrobianos previos por vía tópica o intravítrea.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Bourcier T, Thomas F, Borderie V, Chumeil C, Laroche L. Bacterial keratitis: predisposing factors, clinical and microbiological review of 300 cases. Br J Ophthalmol 2003; 87: 834-838.
2. Brook L, Frazler EH. Aerobic and anaerobic microbiology of dacryocystitis. Am J Ophthalmol 1998; 125: 552-554.
3. Tarabishy AB, Hall GS, Procop GW, Jeng BH. Bacterial culture isolates from hospitalized pediatric patients with conjunctivitis. Am J Ophthalmol 2006; 142: 678-680.
4. Thomas PA. Current perspectives of ophthalmic mycoses. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 730-797.

DOCUMENTO TÉCNICO

PNT-IO-02
PROCESAMIENTO DE MUESTRAS OCULARES PARA DETECCIÓN Y CULTIVO DE
***Acanthamoeba* spp.**

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

EDICIÓN	FECHA	ALCANCE DE LAS MODIFICACIONES
01		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 de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición N° 01	Página 2 de 3

1. PROPÓSITO Y ALCANCE

Definir los métodos para el procesamiento de muestras oculares para la detección por microscopía y mediante cultivo de *Acanthamoeba* spp.

2. FUNDAMENTO

Acanthamoeba spp. es un protozoo pequeño no flagelado de vida libre ampliamente diseminado en el ambiente, tanto en la tierra como en el agua. Este parásito presenta dos formas de vida: quiste y trofozoito. Respecto a la infección ocular, la forma infectante es el trofozoito, que tiene un diámetro de 15 a 45 μ , y está asociado al inadecuado mantenimiento de las soluciones oftálmicas de las lentes de contacto. Los trofozoitos revierten a la forma quística en condiciones adversas de pH, temperatura o alimentación.

Las lesiones corneales iniciales pueden confundirse con una infección herpética y si no se trata de forma precoz puede evolucionar a una ulceración, pérdida de agudeza visual, ceguera y enucleación.

3. DOCUMENTOS DE CONSULTA

- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. ed. Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. 2007. American Society for Microbiology. Washington, DC.

- Loza E (Coordinador). Alomar P, Bernal A, Harto A, Pérez JL, Picazo JJ, Sarazá LL. Seguridad en el laboratorio de microbiología clínica. Procedimientos en Microbiología n° 10, 1^a edición. SEIMC, 2000. Disponible en:

<http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

- Sánchez C (Coordinador), Guerrero C, Sánchez C. Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras. Procedimientos en Microbiología n° 1 a, 2^a edición. SEIMC. 2003. Disponible en <http://www.seimc.org/documentos/protocolos/microbiologia>

4. MUESTRAS

Las muestras se deben obtener lo antes posible en pacientes con queratitis y usuarios de lentes de contacto, así como en pacientes con úlceras de larga evolución que no curan con el tratamiento antibiótico o si existe antecedente de cirugía corneal.

Se debe obtener la muestra, anestesiando la zona previamente, mediante:

- Raspado corneal realizado con espátula de Kimura, bisturí quirúrgico o aguja e introducido en 0,5 ml de caldo BHI o tioglicolato.
- Lente de contacto remitida en suero salino estéril.
- Biopsia corneal remitida en suero salino estéril.

No es recomendable el análisis de las soluciones oftálmicas debido a que contienen sustancias inhibitoras y pueden estar contaminadas con bacterias saprófitas, pudiéndose interferir el crecimiento amebiano. No son aceptables para el examen microscópico ni para cultivo las muestras remitidas en escobillón.

5. MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

- Placa de agar no nutritivo de Page
- Solución salina de Page
- un aislado, crecido en medio sólido, de *E. coli* o *Enterobacter* spp. no mucoso.

6. APARATOS Y MATERIALES

- incubador a 30°C
- vortex
- pipeta pasteur estéril
- asa estéril de siembra
- portaobjetos y cubreobjetos
- microscopio óptico con objetivo 10X y 40X

7. PROCESAMIENTO

7.1. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- raspado: vortear durante 5 minutos la muestra de raspado corneal y retirar el bisturí o la espátula del caldo.
- biopsia: vortear durante 5 minutos con perlas de vidrio estériles en 0,5 ml de solución de Page.
- lente de contacto: con un bisturí estéril raspar la parte cóncava de la lente e inocular en 0,5 ml de solución de Page

7.2. EXAMEN MICROSCÓPICO

- Colocar una gota de la suspensión ya homogeneizada sobre un portaobjetos y cubrir con un cubre.
- Examinar al microscopio con el objetivo de 10X y de 40X con baja intensidad de luz.

7.3. CULTIVO

- Preparar un inóculo en solución de Page con una turbidez equivalente al 0,5 de McFarland del aislado bacteriano
- Sembrar la suspensión bacteriana con asa por toda la placa de Page previamente atemperada
- Con pipeta Pasteur inocular 2-3 gotas de la suspensión homogeneizada de la muestra sobre la superficie de la placa de Page y marcar en el reverso el punto de inoculación
- Incubar la placa, precintada para evitar su desecación, a 30°C en atmósfera aeróbica

7.4. CONTROL DEL CRECIMIENTO

- Examinar cada día invirtiendo la placa y enfocando al microscopio con el objetivo de 10X hasta un total de 7 días

8. OBTENCIÓN, INTERPRETACIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS RESULTADOS.

La identificación de *Acanthamoeba* se basa en las características morfológicas de la forma trófica y quística. El trofozoito es moderadamente grande, con un tamaño de 15 a 45 μ , sin flagelo y con proyecciones denominadas acanthopodia. El quiste tiene una doble pared: la externa arrugada o ectoquiste y la interna poligonal o endoquiste.

Servicio de Microbiología Hospital.....	Procesamiento de muestras oculares para detección y cultivo de <i>Acanthamoeba</i> spp.	PNT-IO-02	
		Edición Nº 01	Página 3 de 3

La detección de trofozoitos o quistes en el examen microscópico directo o del cultivo es siempre significativo y debe informarse lo antes posible.

9. RESPONSABILIDADES

La toma de la muestra y su conservación hasta que se remite al laboratorio es responsabilidad del Servicio de Oftalmología.

La información sobre las condiciones de la toma, transporte y conservación de la muestra, así como de proporcionar el caldo adecuado para el transporte, es responsabilidad del Servicio de Microbiología.

La recepción, identificación, aceptación o rechazo y procesamiento de la muestra es responsabilidad del personal técnico del Servicio de Microbiología.

La valoración del examen microscópico directo, lectura del cultivo e informe de resultados es responsabilidad del facultativo del Servicio de Microbiología. Se incluye también entre sus responsabilidades la supervisión del trabajo del personal técnico, la adopción y seguimiento de medidas correctoras y las interconsultas con el Servicio de Oftalmología.

10. ANOTACIONES AL PROCEDIMIENTO

Todo el personal del laboratorio de microbiología deberá conocer las normas generales de seguridad e higiene. Estas recomendaciones deberán estar

recogidas en un documento establecido por el laboratorio de Microbiología.

Es recomendable la inclusión de controles positivos que pueden proceder de cultivos de referencia o de muestras positivas anteriores. Se puede mantener un cultivo de *Acanthamoeba* cortando una pequeña fracción de agar de un cultivo positivo y colocándolo sobre una placa de Page previamente sembrada con bacterias. Otra posibilidad es cultivar *Acanthamoeba* en caldo peptonado como el TSB y realizar subcultivos semanales a medio fresco.

11. LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

El examen en fresco directo junto con el cultivo tiene una sensibilidad del 50-80% en función de la cantidad de material analizada, tanto en el caso del raspado como de la biopsia.

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Marciano-Cabral F, Cabral G. *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. Clin Microbiol Rev 2003;16: 273-307.
2. Schuster F. Cultivation of pathogenic and opportunistic free-living amebas. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 342-354.