

El laboratorio en la conjuntiva inflamada

Por el Dr. Federico Guillermo Nicola

Concepto de flora habitual

La conjuntiva no es un tejido estéril sino que, al igual que la piel, se encuentra colonizada por microorganismos. En estudios realizados en personas asintomáticas y sin condiciones especiales se han determinado cuáles son los microorganismos presentes en la conjuntiva y en qué porcentaje de la población pueden encontrarse (cuadro 1).

cuadro 1 Flora habitual de la conjuntiva en adultos asintomáticos	
Microorganismos	Porcentaje de la población
<i>Staphylococcus coagulasa</i> negativo	60-80
<i>Corynebacterium spp.</i>	10-35
<i>Propionibacterium acnes</i>	10-35
<i>Staphylococcus aureus</i>	8-30
<i>Streptococcus viridans</i>	2-8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2-5
<i>Moraxella spp.</i>	2-5
<i>Haemophilus influenzae</i>	1-4
Bacilos Gram-negativos	1-4

La mayoría de los microorganismos que conforman la flora habitual son gram-positivos, tanto aerobios como anaerobios, y un porcentaje menor se trata de gram-negativos. Diversos bacilos gram-negativos, principalmente *Pseudomonas spp.* y *Serratia spp.*, suelen colonizar las conjuntivas de usuarios de lentes de contacto. En niños puede haber una colonización mayor por *Haemophilus spp.* y *Streptococcus spp.* mientras que en ancianos aumenta el porcentaje de *Corynebacterium spp.* Este género también es muy frecuente en personas con penfigoide.

Puede asimismo apreciarse en la tabla que una porción importante de la población asintomática presenta en sus conjuntivas microorganismos considerados patógenos. Esta situación se denomina colonización y representa el equilibrio alcanzado entre estas conjuntivas y tales microorganismos. Las personas “colonizadas” por microorganismos potencialmente patógenos representan un reservorio natural de los mismos.

Cuando estos microorganismos se ponen en contacto con pacientes cuyas conjuntivas no logran equilibrarlos, se desencadena el denominado proceso infeccioso. Este involucra la presencia del microorganismo patógeno y sus mecanismos de agresión, en una conjuntiva que reacciona

con sus defensas para rechazarlos, generándose así la inflamación propia de la conjuntivitis.

Estos conceptos deben ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los resultados de los estudios microbiológicos.

Agentes causales

La mayoría de las conjuntivitis infecciosas son producidas por bacterias, salvo en situaciones epidémicas donde los virus tienen un rol preponderante. Extraordinariamente, ciertos hongos y parásitos pueden ocasionar cuadros muy particulares de conjuntivitis.

En el cuadro 2 se pueden apreciar los principales responsables de las conjuntivitis infecciosas y algunas de sus características más sobresalientes.

Estudios de laboratorio. Preparación previa

Se recomienda suspender toda medicación antimicrobiana desde 48 horas previas al estudio y no colocarse ningún tipo de colirio en las dos horas anteriores a la toma de muestra.

Además, puede sugerirse que el día del estudio el paciente no se lave los ojos ni utilice cosméticos.

Toma de muestra

Se debe contar con hisopos de dacrón o alginato (el algodón puede ser inhibitorio para ciertos microorganismos), portaobjetos y placas de agar sangre y agar chocolate (o un medio de transporte adecuado, como el medio Stuart).

Hay que pasar un hisopo (puede embeberse previamente en solución fisiológica estéril para que resulte más tolerable para el paciente) por la conjuntiva tarsal inferior y el fórnix, recogiendo las secreciones que pudieran allí observarse.

cuadro 2 Agente causal	Principales características
Bacterias	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Conjuntivitis agudas purulentas (principal responsable). Puede producir brotes epidémicos en poblaciones cerradas.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Conjuntivitis agudas y recidivantes. Más frecuentes en personas con bases alérgicas.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Frecuente en niños, donde puede llegar a ser el principal agente causal. Poco común en adultos.

cuadro 2 (cont.) Agente causal	Principales características
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Conjuntivitis hiperaguda en adultos y en recién nacidos. Puede perforar la córnea. Es de transmisión sexual.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Conjuntivitis agudas y crónicas en adultos. Conjuntivitis agudas en recién nacidos. Puede haber transmisión sexual.
<i>Moraxella spp.</i>	Poco frecuente.
<i>Moraxella lacunata</i> <i>Corynebacterium spp</i>	Causa conjuntivitis angular. Poco frecuente. Conjuntivitis membranosa.
<i>Streptococcus spp.</i>	Poco frecuente. Conjuntivitis pseudomembranosa.
Virus	Conjuntivitis agudas, serosas, seropurulentas o hemorrágicas. Involucrados en las grandes epidemias. Conjuntivitis crónicas.
Adenovirus	Existen más de 50 variedades. Los serotipos 3, 4 y 7 predominan en fiebre faringo conjuntival; 8, 11, 19 y 29, en queratoconjuntivitis epidémica (otros: 2, 3, 4, 7, 10, 14 y 16).
Enterovirus	Existen más de 80 variedades, siendo el serotipo 70 la causa de algunas epidemias de conjuntivitis hemorrágicas.
Herpesvirus	Herpes simplex, Epstein-Barr, Varicela- Zoster.
Otros	Ejemplo: <i>Molluscum contagiosum</i> , <i>Papillomavirus</i> , virus <i>Coxsackie</i> .

La “siembra” de este material debe verificarse en las placas de agar chocolate y agar sangre (o colocarlo en el medio de transporte si no se dispone de las mismas). Este procedimiento hay que hacerlo para cada ojo en forma independiente, siguiendo un esquema como se ejemplifica en la ilustración 1.

Con otros hisopos se deben tomar nuevas muestras y extenderlas fina y homogéneamente sobre un par de portaobjetos. Si el paciente tuviese muchas molestias puede colocarse previamente una gota de anestésico (no hacerlo antes de la toma para los cultivos dado que los anestésicos o sus conservantes pueden ser inhibitorios para las bacte-

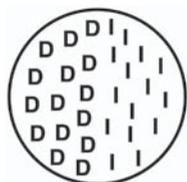


ilustración 1

rias a investigar).

Hay que rotular adecuadamente placas y portaobjetos con el nombre del paciente y el sitio al que corresponde cada muestra y remitir al laboratorio en el mismo día.

Exámenes directos. Coloración de Gram

Su principal utilidad es la de constatar la presencia de microorganismos en las secreciones conjuntivales. También permite definir su morfología y orientar rápidamente acerca de la posible bacteria involucrada (cuadro 3). Además, facilita una semicuantificación (escasa, regular o abundante cantidad) de las células y leucocitos presentes.

Cuadro 3. Exámenes directos.	
Morfología en la coloración de Gram	Compatible con
Diplococos Gram positivos (ilus. 2 y 3)	neumococos
Diplococos Gram negativos (ilus. 4)	gonococos
Cocobacilos Gram negativos (ilus. 5)	haemophilus
Cocos en racimos o tétradas (ilus. 6)	estafilococos
Cocos en cadenas	estreptococos

Coloración de Giemsa

Permite evaluar los diferentes tipos de células y leucocitos presentes (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos) y sus cantidades relativas, lo que puede ser de mucha ayuda en la evaluación de la etiología de las conjuntivitis.

Esta coloración permite además la visualización de los cuerpos de inclusión clamidiales (uno de sus estadios biológicos) siendo de gran valor diagnóstico en las conjuntivitis de neonatos, puesto que en la de los adultos muy raramente pueden apreciarse.

Cultivo

Se debe realizar una semi-cuantificación de los microorganismos presentes, identificando sólo hasta nivel de género a las bacterias saprófitas (no patógenas) y a nivel de especie a los posibles patógenos. En este último caso, hay que estudiar e informarse sobre la sensibilidad a varios antibióticos (antibiograma) teniendo en cuenta aquellos que se disponen en forma de colirios o ungüentos oftálmicos como ser: eritromicina, tobramicina, gentamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, ofloxacina, ácido fusídico, penicilina, polimixina, etc.

Cabe recordar que el sobreuso de antibióticos incrementa las tasas de resistencia a los mismos de los microorganismos. Además, el uso innecesario de colirios y ungüentos puede conducir a una conjuntivitis tóxico-me-

dicamentosa.

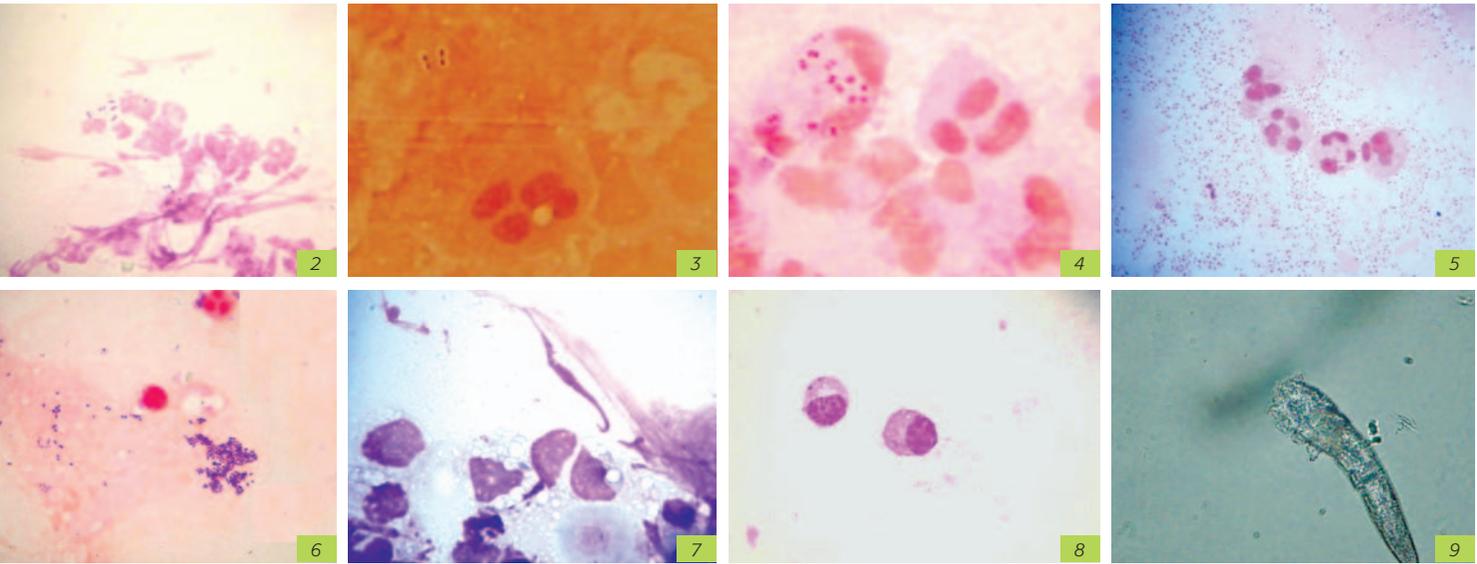
Estudios especiales para virus y clamidias

Las clamidias son bacterias muy pequeñas que, al igual que los virus, son patógenos intracelulares obligados, es decir que para su reproducción necesitan de células superiores vivas. Por este motivo, para el aislamiento se necesitan cultivos celulares, es decir cierto tipo de células eucariotas (por ejemplo: células Mac Coy para las clamidias) que se mantienen en el laboratorio mediante su propio cultivo en condiciones particulares. El mantenimiento de

muestras se toman por raspado conjuntival, descargando las secreciones sobre un portaobjetos que será remitido al laboratorio en las condiciones que éste especifique.

Como contrapartida, los enzimoimmunoensayos (por ejemplo: ELISA) suelen realizarse por lotes de muestras, por lo que el tiempo en que se obtienen de los resultados depende de la cantidad de muestras que procese el laboratorio, en general entre 1 y 3 semanas.

Suelen presentar una sensibilidad y especificidad algo



esta metodología es costoso y requiere tanto equipamiento como personal especializado en dichas técnicas, por lo que sólo se lo realiza en laboratorios de referencia o de muy alta complejidad.

Además es necesario destacar que las clamidias y ciertos virus pierden rápidamente su viabilidad y por ende las muestras para su cultivo (tomadas en medios de conservación especiales) deben ser remitidas y procesadas rápidamente. Los resultados pueden estar disponibles en 3 a 5 días.

Los métodos basados en inmunoensayos detectan antígenos virales o clamidiales presentes en las secreciones conjuntivales, permitiendo una cierta demora en el transporte y procesamiento de las muestras (no requieren la viabilidad de los microorganismos). Son los más difundidos entre los laboratorios clínicos, dado que presentan buena sensibilidad y especificidad a un costo aceptable.

La inmunofluorescencia directa requiere de microscopio de fluorescencia y de personal bien entrenado en esta técnica para disminuir los resultados falsos positivos y negativos.

Permite procesar las muestras en forma individual, acelerando la obtención del resultado (en el mismo día). Las

superiores a la inmunofluorescencia directa. Las muestras se toman por hisopado de las conjuntivas, colocando el hisopo dentro de un tubo de conservación específico para el método empleado.

En la última década se han desarrollado y difundido un gran número de metodologías basadas en la biología molecular, siendo la más difundida la P.C.R. (*polymerase chain reaction*) o reacción en cadena de la polimerasa. Estas técnicas detectan los ácidos nucleicos (AND o ARN) de los microorganismos deseados mediante un proceso de amplificación de enorme capacidad. Dadas tales características, su sensibilidad y especificidad son cercanas al 100%.

Detectan tanto partículas viables como muertas, por lo que las muestras (tomadas en medios de conservación especiales) no necesitan remitirse o procesarse en forma inmediata.

Para abaratar costos, el procesamiento en los laboratorios suele realizarse por lotes de muestras, induciendo una cierta demora adicional en la obtención de los resultados (una a dos semanas).

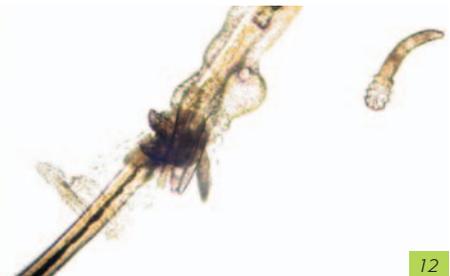
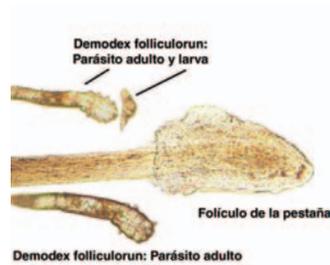
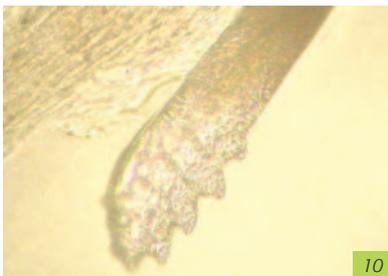
Tanto los virus como las clamidias en las conjuntivitis agudas se encuentran en gran número y pueden ser de-

tectados según lo mencionado en los párrafos precedentes. Sin embargo, pasadas dos semanas del inicio de los síntomas, las partículas infecciosas van disminuyendo y la sensibilidad de los métodos de detección cae sensiblemente.

En la fase crónica de estas infecciones existen muy pocos microorganismos y se encuentran en las capas más profundas del epitelio conjuntival, lo que determina un bajo rédito diagnóstico de todas las técnicas de laboratorio, aún las de biología molecular. Algunos autores proponen, para los casos que lo ameriten, la realización de biopsias conjuntivales y de técnicas de biología molecular *in situ*, para poder hacer diagnóstico de certeza en tales casos.

El examen citológico mediante coloración de Giemsa de las secreciones conjuntivales es un método sencillo y económico que puede resultar de gran ayuda para orientar el diagnóstico en las conjuntivitis virales.

En la fase aguda suele observarse un gran número de monocitos (a menudo con vacuolas citoplasmáticas) y algunos linfocitos (ilus. 7), mientras que estas células no



aparecen o sólo lo hacen muy ocasionalmente en las conjuntivitis bacterianas. La cantidad de leucocitos neutrófilos suele ser alta en esta etapa y a menudo es la célula predominante, pero, a diferencia de las conjuntivitis bacterianas, no se observan bacterias. Pueden verse hematías en gran número en las conjuntivitis hemorrágicas.

A medida que transcurren los días los linfocitos van reemplazando a los monocitos y en las conjuntivitis crónicas pueden representar el tipo celular predominante (ilus. 8). La cantidad de leucocitos neutrófilos dependerá del grado de inflamación que presenten las conjuntivas.

Además, la coloración de Giemsa permite reconocer leucocitos eosinófilos y basófilos, claramente asociados a procesos alérgicos, por lo que resulta de gran utilidad para orientar su diagnóstico en las conjuntivitis crónicas de esa etiología.

Estudios de laboratorio en blefaritis

La preparación previa del paciente es la indicada para el estudio de las conjuntivas. La toma de muestra se realiza hisopando los bordes parpebrales de ambos ojos e inoculando una placa de agar sangre y una de agar chocolate (o colocar los hisopos en un medio de transporte tipo Stuart), en un esquema similar al detallado previamente. Realizar también toma de muestras y extenderlas sobre portaobjetos para los exámenes directos.

En el examen directo con coloración de Gram se investiga la presencia y morfología de las bacterias que pudiesen estar presentes y se semi-cuantifican células y leucocitos. En los cultivos deberán investigarse posibles patógenos, siendo el más importante el *Staphylococcus aureus*.

En las blefaritis con componente seborreico hay que buscar mediante coloración de Giemsa o azul de metileno la presencia de formas compatibles con *Malassezia spp.* Este hongo lipofílico requiere para su cultivo la siembra en agar Sabouraud con el agregado de una gota de aceite de oliva estéril. Igualmente, la mitad de las veces en que se lo observa al microscopio no logra ser cultivado, lo que

obviamente resalta la importancia del examen directo.

También resulta de utilidad para el diagnóstico y seguimiento de este tipo de blefaritis la investigación de *Demodex folliculorum* en pestañas. Se deben extraer 2 a 4 pestañas y colocarlas sobre un portaobjetos con una gota de aceite de inmersión, observando en bajo y medio aumento (ilus. 9, 10, 11 y 12).

El rol patogénico de este parásito se encuentra muy discutido, pero su presencia ayuda a confirmar una base seborreica en el tipo de piel del paciente. Además, hay una relación entre la magnitud de grasitud que presenta la piel con el número de individuos de *Demodex folliculorum* que se encuentran, por lo tanto si se instaura un tratamiento exhaustivo de limpieza de la piel, éste se podría monitorear mediante el número de parásitos, el que debería ir disminuyendo.



Bibliografía

Barkana, Y. [et al.]. Reduction of conjunctival bacterial flora by povidone iodine, ofloxacin and chlorhexidine in an out-patient setting. *Acta Ophthalmol. Scand.* 83 (2005): 360-3.

Fernández Rubio, E.; Cuesta Rodríguez T. Portadores crónicos de bacterias conjuntivales patógenas: posible riesgo en la cirugía de cataratas. *Arch. Soc. Esp. Ophthalmol.* 79 (2004):485-91. Disponible en línea en: <http://www.oftalmo.com/seo/2004/10oct04/04.htm> [consulta: 2 diciembre 2005].

Friedlaender, M. H. Conjunctival provocation testing: overview of recent clinical trials in ocular allergy. *Int. Ophthalmol. Clin.* 43 (2003): 95-104. Liotet, S.; Morin, Y. Guía práctica de los exámenes de laboratorio en oftalmología. Barcelona: Masson, 1990. Mino de Kaspar, H. [et al.] Antibiotic susceptibility of preoperative normal conjunctival bacteria. *Am. J. Ophthalmol.* 139 (2005): 730-3. Rapoza, P. A. [et al.]. A systematic approach to the diagnosis and treatment of chronic conjunctivitis. *Am. J. Ophthalmol.* 109 (1990): 138-142.

Sanchez-Tocino, H. [et al.]. Utilidad de la biopsia conjuntival como técnica diagnóstica. *Arch. Soc. Esp. Ophthalmol.* 76 (2001): 31-36 [disponible en línea en: <http://www.oftalmo.com/seo/2001/01ene01/08.htm>].

Stenson, S.; Fedukowicz, H.; Newman, R. Laboratory studies in chronic conjunctivitis. *Ann. Ophthalmol.* 15 (1983):1160-1164.

Stenson, S.; Newman, R.; Fedukowicz H. Laboratory studies in acute conjunctivitis. *Arch. Ophthalmol.* 100 (1982): 1275-1277.

Uchio, E. [et al.]. Rapid diagnosis of adenoviral conjunctivitis on conjunctival swabs by 10-minute immunochromatography. *Ophthalmology* 104 (1997): 1294-1299.



Dr. Jorge A. Lynch, director de la Maestría

La Maestría a Distancia es un curso académico no presencial que tiene como objetivo ampliar los conocimientos y oportunidades de aquellos profesionales médicos que empíricamente practican la oftalmología. Organizada por el Consejo Argentino de Oftalmología y la Universidad Católica de Salta, funciona desde 1993 y su experiencia no sólo se proyecta a la Argentina. Desde su cuarta edición se expandió a Latinoamérica, incorporando alumnos de nueve países de ese continente. Sus módulos son la base teórica en los que participan los más destacados profesionales del país y del mundo. Cada texto aborda un tema específico y así se convierte no sólo en una herramienta de estudio, sino también en un material de consulta permanente y fundamental.

Autorrefractor
Keratómetro
REKTO-ORK II



Pantalla de
Optotipos
OP-5100



Lámpara de
Hendidura
SL-500



Columna de
Refracción
TREND



Pantalla de Optotipos
REICHERT Clear-Chart



Ingrese a nuestro sitio web, REGÍSTRESE, y comience a gozar de los beneficios de ser un Cliente PREFER. Ofertas, promociones, y mucho más...

www.3boptic.com

Línea Gratuita 0810 - 444 - 67842



Rosario (Casa Central) · Ocampo 370 (S200EXH)
Tel.: (0341) 482-0414 · Fax: (0341) 481-8334
E-Mail: ventas@3boptic.com

Capital Federal · Av Entre Ríos 1243 2º Piso "B"
Tel.: (011) 4304-6475 · E-Mail: ventas_bsas@3boptic.com