

CONJUNTIVA

3

Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo¹, Pedro Fernández Pérez¹,
Eva Fernández Gutiérrez¹, Elena Ruiz Bravo-Burguillos²,
Manuela de Pablos Gómez³, Paola Vázquez Coloma¹,
Ana Martín Ucero¹, Ana Boto de los Bueis¹

¹ Servicio de Oftalmología. Departamento de Córnea. Hospital Universitario La Paz.

² Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario La Paz.

³ Servicio de Microbiología y Parasitología. Hospital Universitario La Paz.



3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucerro, Ana Boto de los Bueis

Dada la accesibilidad de la conjuntiva a la exploración, la mayoría de los diagnósticos son clínicos y no requieren pruebas más específicas. A pesar de ello, en determinadas patologías de la conjuntiva los estudios de laboratorio son esenciales para confirmar un diagnóstico e implantar un tratamiento específico.

Los procedimientos de laboratorio que se utilizan en el estudio de la patología conjuntival y a los que nos referiremos en este capítulo incluyen el estudio anatomopatológico y el microbiológico. Aunque en experimentación cada vez se recurre más al laboratorio para el aislamiento de moléculas inflamatorias que expliquen la fisiopatogenia de una enfermedad, dado el carácter eminentemente práctico de este libro, no se comentarán en este capítulo.

ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO

La conjuntiva está formada por un epitelio estratificado no queratinizado. Las células caliciformes o de goblet asientan en la capa basal y suponen un 10% de toda la celularidad. Bajo el epitelio asienta la sustancia propia, compuesta por un tejido conectivo laxo. En él existen vasos y tejido linfoide asociado a la conjuntiva.

Para el estudio histopatológico de la conjuntiva se utilizan como muestras la biopsia conjuntival y la citología de impresión.

BIOPSIA DE CONJUNTIVA

La conjuntiva es una estructura que se ve afectada en los procesos inflamatorios de las estructuras que componen la superficie ocular y también de la esclera, por lo que la biopsia conjuntival supone una herramienta diagnóstica en patología inflamatoria de los tejidos vecinos así como de distintos procesos de la propia conjuntiva <http://www.pathologyoutlines.com> > eye

Indicaciones

Aunque muchos diagnósticos de la superficie ocular son clínicos, se debe indicar una biopsia conjuntival en los siguientes casos:

1. Conjuntivitis cicatriciales crónicas. En concreto, los estudios de inmunofluorescencia constituyen el gold standard y permiten el diagnóstico diferencial de los distintos tipos. En el caso de penfigoide de membranas mucosas, hasta hace unos años, la confirmación diagnóstica a través de la biopsia era fundamental para poder indicar tratamiento dirigido contra la misma.

2. Lesiones escamosas (tumores intraepiteliales de conjuntiva) o pigmentadas. A ser posible se debe realizar biopsia excisional.

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucero, Ana Boto de los Bueis

- 3. Lesiones sugestivas de tumores linfoides conjuntivales
- 4. Cuadros con clínica poco específica o de evolución tórpida como en queratitis ulcerativa periférica, para descartar vasculitis.

Técnica quirúrgica

El procedimiento se debe realizar en quirófano y requiere Consentimiento Informado. Es recomendable contactar previamente con el patólogo antes de la cirugía para conocer el medio de transporte en que enviar la muestra en base a la sospecha clínica. Una vez obtenida el espécimen, se debe enviar al laboratorio debidamente orientada, identificada y con el volante de petición correctamente relleno.

Brevemente, la técnica se realiza bajo anestesia local. Tras instilación de anestésico tópico se inyecta aguja 25 o 30G que contiene anestésico lidocaína 2% con epinefrina 1:100.000 en la zona a biopsiar. Una vez conseguido la anestesia del área, se realizará disección con tijeras Wescott o Vannas y pinzas sin dientes, evitando el traumatismo del tejido.

Una vez obtenida la muestra conjuntival, se orienta y se incluye en medio de fijación adecuado que variará según procesamiento posterior (tabla 1).

Tabla 1. Medios de fijación de la biopsia según procesamiento posterior

Medio Fijación	Procesamiento
Formol 10%	Procesamiento rutinario
Etanol / Metanol	Citología conjuntival
Glutaraldehído	Microscopio electrónico
En fresco	Inmunofluorescencia directa

El medio de fijación más frecuente utilizado es formaldehído al 10%, que evita la degradación de las proteínas, lípidos y carbohidratos. En ocasiones en que no se disponga de medios específicos de transporte, la muestra se enviará en fresco para su posterior manejo en el laboratorio.

Distinguiremos entre biopsia excisional e incisional.

Biopsia excisional. Se realiza ante lesiones sospechosas de tumor. La técnica «no touch» descrita por Shields consiste en la resección del tumor con un margen de 3 mm, con la menor manipulación y evitando la irrigación durante el procedimiento, para disminuir el riesgo de siembra accidental de las células tumorales. La orientación del tejido es fundamental, para ello un método sencillo es el marcado con hilo de sutura en el polo superior y nasal/temporal, especificando en el informe. Algunas lesiones requieren esclerectomía superficial. En caso de afectación de la cornea adyacente, la extracción del epitelio corneal se realiza con escarificador asistido por alcohol diluído al 20%. El procedimiento finalizará con la aplicación de crioterapia en los bordes de la conjuntiva en dos bandas para evitar la diseminación celular. El cierre del defecto se realizará con puntos de aproximación o dependiendo del tamaño se recubrirá con membrana amniótica (1,2) (*Vídeo 1. Biopsia excisional*).

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucerro, Ana Boto de los Bueis

Biopsia Incisional. La **localización** del área a biopsiar depende de la sospecha diagnóstica. En general, ante lesiones inflamatorias difusas, se debe tomar de conjuntiva bulbar superior y evitar fórnix inferior y con ello la fibrosis. Si la sospecha es de enfermedad ampollosa tipo Penfigoide de membranas mucosas, la sensibilidad de la prueba aumenta si la muestra se toma de la zona perilesional, esto es, en el límite entre la zona afectada y la aparentemente sana (2). El **tamaño** de la biopsia es variable, aunque la mayoría de los trabajos indican 4 x 7-10 mm.

Procesamiento y tinciones en el laboratorio

En el laboratorio las muestras serán procesadas, fijadas en parafina y se efectuarán las tinciones convenientes en base al diagnóstico de sospecha (tabla 2.)

Tabla 2. Tinciones de laboratorio

Tinción	Utilizad en conjuntiva
Hematoxilina eosina	Tinción de rutina
PAS	Células calciformes. hongos
Von Kossa	Calcio
Giemsa	<i>Chlamydia</i>
Gram	Bacterias
KOH Plata metenamina de Grocott	Hongos
Calcoflúor	Hongos/ <i>Acanthamoeba</i>
Rojo Congo	Amiloidosis
Tricrómico de Masson	Colágeno (fibrosis)
ZhiehI Neelsen	Mycobacteria

Técnicas especiales

Aunque la mayoría de las muestras se observan al microscopio óptico, algunas requieren técnicas específicas.

Inmunohistoquímica

Consiste en la identificación de las células en base a antígenos específicos. Para ello se emplean anticuerpos primarios frente al antígeno de la célula y anticuerpos secundarios con un cromógeno que cuando se una al primario activará el complejo enzimático y emitirá una coloración. A nivel de conjuntiva son útiles en la identificación de melanomas (fig. 1) y linfomas.

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucero, Ana Boto de los Bueis

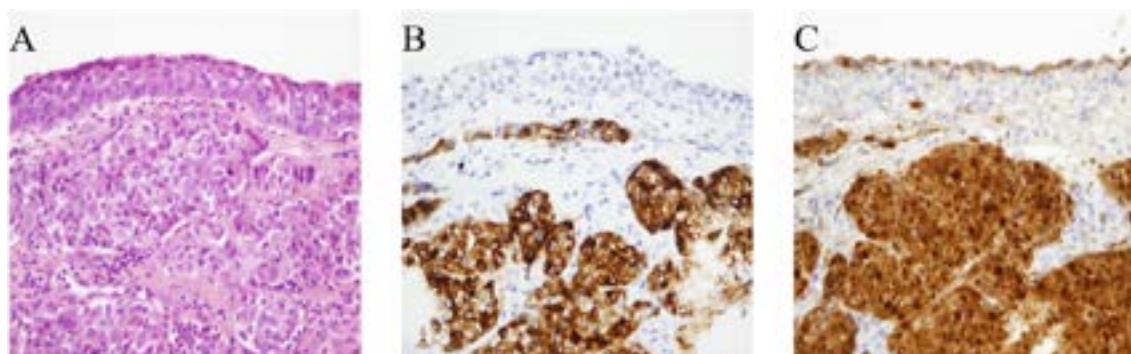


Figura 1: Melanoma Conjuntival (40x). A: Con Hematoxilina eosina se observa infiltración difusa de la lámina propia por una proliferación de células grandes y atípicas, con nucléolos prominentes, que tienden a disponerse en sábana o formando grandes nidos. B: Identificación de las células mediante anticuerpos anti Melan A y C: anti S100.

Tabla 3. Antígenos específicos de melanomas y linfomas

Lesión anatomopatológica	Anticuerpos anti
Melanoma	HMB45, S100, MelanA
Linfoma. Hiperplasia reactiva linfoide	CD3, CD20, Cadenas K/L, CD43, CD5, CD10, Bcl-2
B	CD19, CD20, PAX5
T	CD3, CD4, CD8

Inmunofluorescencia directa

La inmunofluorescencia también aprovecha la capacidad que tienen los anticuerpos para unirse con alta especificidad a un antígeno, pero en esta técnica el anticuerpo lleva una molécula fluorescente. El anticuerpo reconoce la molécula diana y se une a ella directamente. Esta molécula emite una luz que puede ser observada por medio de un microscopio de fluorescencia, identificándose así la región del tejido donde está localizado el antígeno.

Citometría de Flujo (4)

Su utilidad fundamental en conjuntiva es para fenotipado de lesiones linfoides. Requiere que la muestra sea enviada en fresco. El principio de la citometría de flujo se basa en hacer pasar las células en suspensión marcadas con anticuerpos cargados por fluorocromos por delante de un haz luminoso. Permite separar grupos homogéneos de células. Dependiendo de la luz emitida, se generan unas longitudes de onda que se transforman en impulsos eléctricos que se convierten a través de una computadora en histogramas.

Biología Molecular (5)

Las técnicas de biología molecular están muy desarrolladas en el ámbito experimental, pero cada vez se emplean más en la anatomía patológica ocular diagnóstica, ya que en ocasiones van a proporcionar información pronóstica o van a ayudar a seleccionar un

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucero, Ana Boto de los Bueis

tratamiento. Sirve por ejemplo para identificar los genes promotores o inhibidores de tumores o cadenas de ADN o de ARN víricos (p.e *herpesvirus* o *Epstein-Barr*).

Existen distintas técnicas, siendo las más empleadas la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), hibridación in situ (HIS), hibridación in situ con fluorescencia (FISH).

La ventaja de estas técnicas es que pueden realizarse en tejido fijado en formol e incluido en parafina, lo que permite el análisis molecular en muestras que han sido enviadas en los medios habituales para estudio histológico.

1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): amplifica un fragmento de ADN obteniéndose un gran número de copias. Para ello se utiliza una polimerasa termoestable, nucleótidos y cebadores o primers, que son fragmentos cortos de ADN de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar proporcionando un punto de partida para la síntesis de ADN. En primer lugar, se desnaturaliza el ADN para separar las cadenas. A continuación, se desciende la temperatura para que los cebadores se puedan unir a las secuencias complementarias del molde de ADN y posteriormente se vuelve a elevar la temperatura para que la polimerasa sintetice las nuevas cadenas de ADN. De esta forma se obtiene un gran número de copias que sirven para la detección precoz de cáncer, y enfermedades hereditarias o inflamatorias. La PCR se emplea sobre todo para el diagnóstico de linfomas.

La **Reverse transcriptase-PCR (RT-PCR)** es una variante de la PCR en la que el molde inicial es ARN en lugar de ADN, por lo que es necesaria una transcriptasa inversa para realizar la síntesis de un ADN complementario al ARN.

2. Microarrays: Se basa en colocar en un chip miles de secuencias génicas y poner en contacto el ADN o ARN que queremos estudiar para permitir así la hibridación de las bases complementarias. Estas uniones producen una cantidad de luz que se puede medir y de esta manera identifican los genes que se expresan en esa muestra. La ventaja de esta técnica es que se pueden estudiar muchos genes a la vez.

3. Inmunofluorescencia in situ (FISH): estudia los cromosomas mediante la hibridación de estos con una sonda unida a una molécula fluorescente.

4. Hibridación genómica comparativa (CGH): analiza el genoma completo, buscando número de alteraciones de ganancia o pérdida en las copias de ADN.

5. Amplificación de sondas dependiente de ligando (MLPA): basado en la hibridación de sondas con la zona homóloga de interés seguida de amplificación por PCR.

6. Secuenciación de nueva generación (NGS): analiza grandes cantidades de ADN de forma paralela y masiva.

7. SNP oligonucleótido microarray analysis (SOMA): microarray de ADN usada para detectar polimorfismo de único nucleótido (SNP), es decir aquellos que se producen en un solo par de bases.

Casos especiales

Comentaremos cuatro patologías de conjuntiva cuyo diagnóstico anatomopatológico es obligado.

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucerro, Ana Boto de los Bueis

Penfigoide de membranas mucosas

También se denomina Penfigoide Ocular Cicatricial. Como se ha comentado anteriormente, en estos casos las muestras se obtendrán de conjuntiva bulbar, en la zona de transición entre área inflamada y no inflamada, evitando fórnix, y deben dividirse en dos partes, una incluida en formaldehído al 10% para el microscopio óptico y otra en medio especial (Michel o Zeus) o en su defecto en suero salino, para estudio de Inmunofluorescencia directa.

Al microscopio óptico, la tinción con hematoxilina eosina mostrará hallazgos poco específicos, típicos de toda conjuntivitis cicatricial. Existe una disminución de células caliciformes, metaplasia escamosa, e inflamación crónica de la sustancia propia a base de linfocitos, células plasmáticas, macrófagos mastocitos y algunos eosinófilos con fibrosis de la sustancia propia. Dependiendo de la actividad pueden existir neutrófilos. En algunos casos es posible observar despegamiento entre el epitelio y la membrana basal.

Las técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) en Penfigoide de Membranas mucosas muestran depósitos lineales de IgG, IgA, IgM y complemento a nivel de la membrana basal. La técnica presenta una sensibilidad de 20-67% por lo que en casos negativos y alta sospecha clínica, en caso de repetir la biopsia, se debe añadir a la IFD la técnica de Inmunoperoxidasa, que aumentará la sensibilidad al 80% (6,7). Algunos autores recomiendan hacer biopsia de mucosa bucal, aunque no exista sintomatología de la misma, en caso de biopsia conjuntival negativa (8). Por otra parte, la Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) que identifica anticuerpos circulantes tiene una baja sensibilidad aunque se correlaciona con la gravedad de la enfermedad.

La tabla 4 permite hacer un diagnóstico diferencial de las conjuntivitis mucosinequiantes (9).

Tabla 4. Conjuntivitis mucosinequiante. Diagnóstico diferencial. POC (Penfigoide Ocular Cicatricial)

Enfermedad	Edad (años)	Neoplasia	Lesión mucosa	IFD	Anticuerpos en suero
POC	>60	No	Conjuntiva	IgG y C3 lineal en membrana basal	Subunidad B4 de la integrina
POC paraneoplásico	30-90	Tumores sólidos	Conjuntiva, mucosa oral, respiratoria, piel de extremidades superiores y tronco	Ig G y C3 lineal en membrana basal	Laminina 5 (pielepiligrina)
Pénfigo paraneoplásico	>60	Hematológicos	Conjuntiva (66%), oral (100%), piel bajo diafragma	Depósitos IgG y C3 en membrana basal e intercelular	Desmoplaquina I y II, periplaquina y envolplaquina
Penfigo vulgaris	40-60	No	Oral, piel scalp, tronco y extremidades. No conjuntiva.	No tinción membrana basal. IgG y C3 intercelular	Desmogleína 3, desmogleína 1

Neoplasia de la superficie ocular

La anatomía patológica de la conjuntiva en casos de neoplasia de la superficie ocular mostrará un epitelio hiperplásico con atipias que puede presentar queratinización en superficie y pérdida de células de goblet. Lo esencial es la observación de la membrana basal, si está intacta, se habla de Neoplasia Intraepitelial conjuntival (CIN), si la membrana basal está afectada, se habla de carcinoma escamoso invasivo de superficie ocular. La neoplasia intraepitelial se ha clasificado tradicionalmente como leve, moderada o grave en función de la atipia celular y cuando esta atipia es muy intensa y ocupa todo el espesor epitelial en ocasiones se emplea el término de carcinoma escamoso in situ. No obstante, esta graduación no necesariamente posee utilidad pronóstica, por lo que la tendencia es emplear el término genérico de neoplasia intraepitelial conjuntival independientemente del grado de atipia. Las variantes carcinoma mucoepidermoide y de células fusiformes son variantes más agresivas con alta tasa de recurrencia (10).

Linfoma conjuntival

La necesidad de inmunofenotipado en estos tumores hace que sea imprescindible contactar previamente con el patólogo para conocer cómo hay que enviar la muestra.

Ante estas lesiones el patólogo debe hacer diagnóstico diferencial entre la hiperplasia linfoide benigna, que se refiere a proliferación folicular en forma de folículos con centro germinal o a linfoma de anejos oculares.

Los linfomas de anejos oculares suponen un 1-2% de los Linfomas no Hodgking y son en su mayoría de células B. Con hematoxilina eosina, se observarán los principales tipos de linfoma conjuntival, en su mayoría de células B. Los 4 tipos principales de linfoma son: Linfoma conjuntival extranodal de la zona marginal antes denominado linfoma MALT (68%), linfoma folicular (16%), linfoma de células del manto (7%) y linfoma difuso de células grandes B (5%) (11,12).

Lesiones melanocíticas

Los nevos melanocíticos conjuntivales están constituidos por melanocitos que se agrupan formando tecas o nidos. Cuando únicamente hay tecas en la unión entre el epitelio y el estroma se denominan nevos de la unión, cuando además hay tecas en el estroma se denominan nevos compuestos y cuando sólo hay nidos en el estroma se llaman nevos subepiteliales.

La tabla 5 recoge las características de las distintas lesiones melanocíticas conjuntivales.

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucerro, Ana Boto de los Bueis

Tabla 5. Lesiones melánicas de conjuntiva

Lesión	Número de melanocitos basales	Pigmento epitelial	Observaciones
Melanosis Racial	Normal	Aumentado	
Melanosis Adquirida Primaria sin atipias	Aumentado	Aumentado	
Melanosis Adquirida Primaria con atipias	Aumentado Atipias Migración melanocitos superficial	Aumentado	
Melanoma in situ	Todo el espesor Membrana basal respetada		
Melanoma	Rotura membrana basal Atipias en huso/poliédricas		50-70% de PAM con atipia

Citología de impresión conjuntival (13)

La citología de impresión constituye una técnica no invasiva que permite evaluar las células de las capas más superficiales de la superficie ocular. Se realiza en consulta y bajo anestesia tópica. Básicamente mediante un papel de acetato de celulosa (Milipore HAW304), se coloca sobre la conjuntiva bulbar mediante unas pinzas, se hace presión suave unos segundos y se retira. Se consigue que queden pegadas 1-3 capas de epitelio. A continuación se fijan los papeles de acetato en etanol 95% y en el laboratorio se tiñen con hematoxilina o PAS para evaluación al microscopio óptico. El estudio citológico al microscopio óptico permite estudiar la densidad, morfología, tinción, relación núcleo/citoplasma de las células conjuntivales epiteliales y células caliciformes. También se puede realizar inmunocitoquímica, PCR o citometría de flujo.

Estudio microbiológico conjuntival

Indicaciones

La conjuntiva ocular está colonizada por microbiota habitual o saprofita (tabla 6), que puede variar en situaciones como en portadores de lentes de contacto o uso de antibióticos.

Aunque en general el diagnóstico de la conjuntivitis infecciosa es clínico y su tratamiento empírico, se debe realizar estudio microbiológico de la conjuntivitis infecciosa en los siguientes casos:

1. Conjuntivitis hiperaguda purulenta con intensa secreción, infiltrado y úlcera corneal donde se sospecha *Neisseria gonorrhoeae* en adultos u oftalmía neonatorum.
2. Conjuntivitis crónica, ante sospecha de *Chlamydia trachomatis*.

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucerro, Ana Boto de los Bueis

3. Conjuntivitis con evolución tórpida.
4. Úlceras conjuntivales no justificadas por traumatismo o cirugía.

Tabla 6. Flora comensal conjuntival

Microorganismo	% portadores
<i>Staphylococcus coagulasa-negativa</i>	75-90%
<i>Cutibacterium spp (Propionibacterium spp)</i>	50-70%
<i>Corynebacterium spp</i>	20-70%
<i>Staphylococcus aureus</i>	25-40%
<i>Streptococcus spp</i>	1-10%
<i>Moraxella catarrhalis</i>	5%
Bacilos gram-negativos	0-5%

Técnica (14-17)

La comunicación con el microbiólogo y el diagnóstico de presunción son fundamentales para interpretar el resultado.

Los tipos de muestras a realizar son el **exudado** o el **raspado** conjuntival con torunda o hisopo.

En caso de patógenos intracelulares como virus o *Chlamydia*, la muestra debe arrastrar células conjuntivales por lo que debe realizar un raspado más profundo. Si la sospecha es de conjuntivitis bacteriana o fúngica realizaremos un exudado conjuntival. En caso de sospecha de conjuntivitis hiperaguda, además de la toma de muestra para cultivo está indicado hacer una segunda toma para hacer un frotis sobre un portaobjetos (rotando la torunda por el portaobjetos) para posterior tinción en el laboratorio (tabla 2).

Obtención de la muestra

Se recomienda suspender el colirio antibiótico 48 horas antes de la toma de la muestra. La instilación de colirio anestésico puede tener efecto inhibitorio sobre los microorganismos, por lo que es preferible realizar el procedimiento sin colirio anestésico. Esto es especialmente importante cuando se van a realizar técnicas moleculares de PCR. Debido a que la conjuntiva está colonizada por microbiota saprofita, la recogida de la muestra de ambos ojos ayudará a la interpretación de los resultados.

Para realizar un exudado utilizaremos un hisopo de algodón, dacron o de alginato cálcico, (se debe evitar el algodón si la sospecha es de *Chlamydia* y el alginato cálcico si se sospechan virus, ya que puede inhibir su crecimiento) que previamente se debe embeber en solución fisiológica para hacerlo más tolerable al paciente. El paciente mirará hacia arriba, el explorador traccionará del párpado inferior hacia abajo y arrastraremos la torunda por la conjuntiva del fórnix de temporal a nasal y viceversa ([Vídeo 2. Toma de muestra conjuntival](#)).

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucero, Ana Boto de los Bueis

En caso de blefaroconjuntivitis, la toma de muestra se realizará mediante hisopado de los bordes palpebrales. La forma de proceder es similar a la conjuntivitis bacteriana.

Por último, ante la sospecha de *Demodex folliculorum* en pestañas, se extraerán 2-4 pestañas que se enviarán a microbiología para estudio bajo microscopio óptico.

Transporte y conservación

Es preferible realizar la siembra en las placas de cultivo en el momento de la extracción, pero si no es posible se enviarán al laboratorio en el medio de transporte adecuado. Los exudados obtenidos en torunda para estudio de bacterias u hongos se deben enviar en medio gel de Stuart o Amies o medio líquido de Amies y para estudio de virus o *Chlamydia* en medio adecuado para ello.

Las muestras deben enviarse en el menor tiempo posible. Si no pudiesen procesarse inmediatamente, se conservarán a 4° C durante 24 horas.

Recepción de la muestra

En la muestra debe identificarse correctamente el ojo del que procede, así como los factores de riesgo de interés y tratamiento previo. La comunicación oftalmólogo-microbiólogo debe ser bilateral. En caso de muestras de pequeño tamaño, se debe decidir la técnica o estudio más rentable.

Procesamiento

Las muestras recibidas inoculadas en los medios de cultivo se incubarán, las que no, serán procesadas en campanas de bioseguridad siguiendo las recomendaciones pertinentes.

– Los medios de cultivo habituales para aislamiento de las bacterias más frecuentes son placas de agar sangre (crecimiento de la mayoría de los microorganismos), agar chocolate (similar a agar sangre, en el que además crece *Haemophilus influenzae*, *Bartonella spp*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*), caldo tioglicolato (crecimiento microaerófilos y anaerobios) y agar Sabouraud (hongos). Otros medios específicos son agar Löwenstein-Jensen para Micobacterias, Thayer-Martin para *Neisseria gonorrhoeae* o *meningitidis* o agar enriquecido con *E. coli* para *Acanthamoeba spp*.

– En caso de conjuntivitis por *Chlamydia* o víricas, los cultivos en líneas celulares están en desuso en la mayoría de los laboratorios y han sido sustituidos por técnicas moleculares con una mayor sensibilidad. La técnica más empleada en la mayoría de los laboratorios es la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR). Actualmente destacan las PCR a tiempo real con tecnología Taqman con formato multiplex para virus (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). Por otra parte, hay test rápidos (*point-of-care*) de inmunocromatografía (ej. AdenoPlus™ -RPS ADP; Rapid Pathogen

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucero, Ana Boto de los Bueis

Screening Inc.) que detectan antígenos de Adenovirus en lágrimas del paciente en 10 minutos. Los datos de sensibilidad y especificidad varían según los estudios publicados entre un 40-93% y un 95-98% respectivamente. Aunque no se realiza en los laboratorios microbiológicos supone una herramienta útil en atención primaria.

– En cuanto a *Chlamydia*, también existen diversidad de productos comercializados de PCR como: GeneXpert® de Cepheid, Aptima® Hologic, o Amplicor® de Roche). En los laboratorios donde no se realicen técnicas moleculares, el diagnóstico se hará mediante Inmunofluorescencia Directa (IFD) en el frotis aunque su sensibilidad es baja.

Interpretación de los resultados

La interpretación de los resultados exige conocer que la conjuntiva está colonizada por estafilococos coagulasa-negativa, *Corynebacterium spp* y *Cutibacterium spp* y en menor proporción por *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* y *Moraxella spp*. En general, se dará valor al cultivo si se observa la presencia de *S. aureus*, *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae*, *H. influenzae*, *P. aeruginosa* y enterobacterias o microorganismos colonizadores con un crecimiento abundante en la placa de cultivo (más de 10 colonias en el sitio de cultivo), crecimiento en más de un medio, así como diferencias respecto al cultivo del ojo adelfo.

La detección de *C. trachomatis* en una muestra conjuntival es siempre significativa.

Determinación de sensibilidad

Los puntos de corte que determinan la sensibilidad de los antimicrobianos, establecidos por el EUCAST (European Committee on antimicrobial susceptibility testing) están desarrollados según estudios clínicos que correlacionan la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos, la concentración plasmática del fármaco y los resultados tras administración sistémica. Es importante constatar que estos puntos de corte no están disponibles para la vía tópica, por lo que los resultados deben interpretarse con precaución (con vía tópica se alcanzan concentraciones muy altas de antibiótico en la mucosa conjuntival).

Información de los resultados

La información debe ser pronta, anotada o telefónica. En caso de crecimiento de microorganismos comensales se informará como tal, así como de la existencia de no crecimiento.

RESUMEN

La biopsia conjuntival está indicada ante conjuntivitis crónica, sospecha de lesiones tumorales y cuadros refractarios a tratamiento.

Se debe realizar estudio microbiológico en conjuntivitis hiperagudas, oftalmía neonatorum, conjuntivitis crónica o de evolución tórpida.

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucero, Ana Boto de los Bueis

BIBLIOGRAFÍA

1. Shields JA, Shields CL, De Potter P. Surgical management of conjunctival tumors. The 1994 Lynn B. McMahan Lecture. *Arch Ophthalmol*. 1997; 115(6): 808-815.
2. Sivaraman KR, Karp CL. Medical and surgical management of ocular surface squamous neoplasia. In: Mannis MJ, Holland EJ, eds. *Cornea*. Vol 1. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2017: 427-433.
3. Coco G, Romano V, Menassa N, Borroni D, Iselin K, Finn D, Figueiredo GS, Tacea F, Field EA, Ahmad S, Kaye SB. Conjunctival biopsy site in Mucous Membrane Pemphigoid. *Am J Ophthalmol*. 2020 Aug; 216: 1-6.
4. Barrera Ramirez L, Drago Serano E, Cecilia Zamora A, Gómez Arroyo F, Sanz Espumas T, Mendoza Pérez F. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004; 17(1): 42-55.
5. Mendoza PR, Grossniklaus HE. Updates in ophthalmic pathology. *Indian J Ophthalmol* 2017; 65: 347-53.
6. Ahmed M, Zein G, Khawaja F, Foster CS. Ocular cicatricial pemphigoid: Pathogenesis, diagnosis and treatment. *Prog Retin Eye Res*. 2004; 23(6): 579-92.
7. Tauber J, Sainz de la Maza M, Foster CS. Systemic chemotherapy for ocular cicatricial pemphigoid. *Cornea*. 1991; 10: 185-195.
8. Saw V, Dart J. Ocular mucous membrane pemphigoid: diagnosis and managements strategies. *Ocular Surface* 2008; 6(3): 128-42.
9. Ahuero AE, Jakobiec FA, Bhat P, et al. Paraneoplastic conjunctival cicatrization: two different pathogenic types. *Ophthalmology*. 2010; 117(4): 659-64.
10. Polski A, Sibug Saber M, Kim JW, Berry JL. Extending far and wide: the role of biopsy and staging in the management of ocular surface squamous neoplasia. *Clin Exp Ophthalmol*. 2019; 47(2): 193-200.
11. Shields CL, Chien JL, Surakiatchanukul T, et al. Conjunctival Tumors: Review of Clinical Features, Risks, Biomarkers, and Outcomes--The 2017 J. Donald M. Gass Lectur. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)*. 2017; 6(2): 109-120.
12. Ferreri A, Sassone M, Miserocchi E, et al. Treatment of MALT lymphoma of hte conjunctiva with intral- esional rituximab supplemented with autologous serum. *Blood Adv*. 2020; 24: 4(6): 1013-1019.
13. Calonge M, Diebold Y, Sáez V, Enriquez de Salamanca A, et al. Impression cytology of the ocular sur- face: a review. *Exp Eye Res*. 2004; 78(3): 457-72.
14. Babitha V, Jyothi PT. Microbiology for general ophthalmologist. *Kerala J Ophthalmol* 2017; 29: 72-78.
15. Krachmer JH, Mannis MJ, Holland E. *Cornea, Fundamentals, diagnosis and management*. 3rd ed. Lon- don: Mosby/Elsevier; 2011. p. 139-146.
16. Díaz-López MD, García-Garrote F, Perales-Palacios I, Pescador-Martín P. Diagnóstico microbiológico de las infecciones oculares. 2019. 31 a. García-Garrote F (coordinador). *Procedimientos en Microbi- ología Clínica*. Cercenado-Mansilla E, Cantón-Moreno R (editores). Sociedad Española de Enferme- dades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). 2019. Accesible en www.seimc.org.
17. Rodríguez -Díaz JC, Ferrer-Rodríguez C, Pérez-Santonja JJ. Técnicas de diagnóstico en infecciones de la córnea. En Pérez-Santonja JJ, Hervás-Hernandis JM, Celis Sánchez J eds. *Actualización en infecciones de la córnea. Métodos de diagnóstico y tratamiento*. Sociedad Española de Cirugía implanto-refracti- va, 2018; 33-66.

3. Estudios de laboratorio

Almudena del Hierro Zarzuelo, Pedro Fernández Pérez, Eva Fernández Gutiérrez, Elena Ruiz Bravo-Burguillos, Manuela de Pablos Gómez, Paola Vázquez Coloma, Ana Martín Ucerro, Ana Boto de los Bueis

PREGUNTA TIPO TEST

(pulse en la flecha para comprobar las respuestas)

1. Respecto a la biopsia de conjuntiva:

- a) Requiere Consentimiento Informado
- b) Es importante contactar con el anatomopatólogo antes de realizarla
- c) Ante sospecha de tumor se debe hacer «en seco»
- d) Las muestras enviadas para IFD se envían en formol 10%
- e) La citología de impresión conjuntival aporta más información que la biopsia

2. Respecto al estudio microbiológico de la conjuntiva:

- a) Se debe retirar colirio antibiótico 24-48 horas antes de la toma de la muestra
- b) Para técnicas de biología molecular (PCR) es aconsejable instilar gota de anestésico
- c) En general no es necesario hacer frotis en el estudio de la conjuntiva
- d) Las técnicas de biología molecular tienen ventajas frente a cultivos celulares para el diagnóstico de *Chlamydia*
- e) Es aconsejable la comunicación fluida con el microbiólogo