

1-1-2016

Identificación de la microbiota conjuntival en adultos escolares saludables, mediante el sistema automatizado VITEK y la susceptibilidad antimicrobiana

Winy Valeria Jaimes Niño
Universidad de La Salle

Laura Victoria Martín Algarra
Universidad de La Salle

Follow this and additional works at: <https://ciencia.lasalle.edu.co/optometria>

Citación recomendada

Jaimes Niño, W. V., & Martín Algarra, L. V. (2016). Identificación de la microbiota conjuntival en adultos escolares saludables, mediante el sistema automatizado VITEK y la susceptibilidad antimicrobiana. Retrieved from <https://ciencia.lasalle.edu.co/optometria/107>

This Trabajo de grado - Pregrado is brought to you for free and open access by the Facultad de Ciencias de la Salud at Ciencia Unisalle. It has been accepted for inclusion in Optometría by an authorized administrator of Ciencia Unisalle. For more information, please contact ciencia@lasalle.edu.co.

**IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA CONJUNTIVAL EN ADULTOS
ESCOLARES SALUDABLES, MEDIANTE EL SISTEMA AUTOMATIZADO
VITEK Y LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.**

**WINNY VALERIA JAIMES NIÑO
50121031**

**LAURA VICTORIA MARTIN ALGARRA
50121032**

Estudiantes de Optometría X Semestre

**UNIVERSIDAD DE LA SALLE
Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Optometría**

Bogotá, 2016

**IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA CONJUNTIVAL EN ADULTOS
ESCOLARES SALUDABLES, MEDIANTE EL SISTEMA AUTOMATIZADO
VITEK Y LA SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.**

**WINNY VALERIA JAIMES NIÑO
50121031**

**LAURA VICTORIA MARTIN ALGARRA
50121032**

Directora

**Dra. MARTHA FABIOLA RODRÍGUEZ
Bacterióloga. MSc; Ph.D.**

**Trabajo de Grado presentado a la Facultad de Ciencias de la Salud para
optar al título de Optómetra**

Modalidad de grado

Desarrollo de proyecto de investigación disciplinar o interdisciplinar

Bogotá, 2016

NOTA DE ACEPTACIÓN

Firma de jurado

Firma de jurado

Bogotá D.C, _____

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen del Pilar que día a día acompañan y encaminan mi proyecto de vida, a mis padres por ser los patrocinadores de mis sueños, a mi hermana por todo su apoyo y por aceptar de igual forma este reto, a mis abuelos por su dedicación, sus sabios consejos y su paciencia, a mi tía por ser la persona que me inspiro a seguir este camino y a William por no dejarme desfallecer nunca.

Valeria Jaimes

A ese ser que aunque no está presente en cuerpo siempre lo estará en espíritu, al mismo que me enseñó que somos infinitos en nuestra mente, al hombre que dio todo por mí y que guardaré para siempre en mi corazón, para que desde el cielo se sienta orgulloso de la nieta que formó, a ti Abuelo.

Victoria Martin

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de antemano a la doctora Martha Fabiola por todo su apoyo y acompañamiento permanente a lo largo de este importante proceso académico, por sus enseñanzas y por permitirme conocer lugares que recordaré eternamente. A las doctoras Patricia Hernández y Ludy Pabón por su generosa colaboración y tiempo brindado.

A la facultad de Optometría y a los docentes que aportaron sus conocimientos para que este trabajo fuera posible.

Valeria Jaimes

Agradezco infinitamente a Dios por acompañarme en este proceso formativo y guiarme en cada paso que doy, a mis padres por su constante apoyo en cada uno de mis proyectos, especialmente en esta investigación, a mi hermano por ser el complemento que permitirá cumplir cada sueño propuesto, a mi abuela por su paciencia y bondad, a mi padrino por ser mi respaldo a lo largo de la carrera.

A la Doctora Martha Fabiola por ser el pilar de esta investigación, por todas sus enseñanzas y apoyo brindado durante mi formación académica.

A la Universidad de la Salle y en especial a la facultad de Optometría por ser los mediadores en el cumplimiento de esta meta y por formarme como una profesional idónea, con principios y valores.

Victoria Martin

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	9
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. MARCO TEÓRICO	16
4.1. BACTERIAS	16
4.1.1. Patogénesis de la infección bacteriana	16
4.1.2. Patógenos oportunistas	17
4.2. MICROBIOTA	20
4.2.1. Microbiota en piel y mucosas	21
4.2.2. Microbiota ocular en humanos	22
4.3. SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE LA MICROBIOTA OCULAR	22
4.4. TECNICAS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA	23
4.4.1. Microbiológicos y bioquímicos	23
4.4.2. Sistemas comerciales de identificación microbiológica y bioquímica	25
4.4.3. Métodos serológicos	25
4.4.4. Métodos moleculares	26
4.5. VITEK	26
4.6. ANTIBIOGRAMA	28
5. OBJETIVOS	30
5.1. Objetivo General	30
5.2. Objetivos Específicos	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
6.1. Tipo de estudio	31
6.2. Población	31
6.3. Muestra	31
6.4. Criterios de inclusión y exclusión	31
6.5. Aspectos éticos y recolección de información	31

6.6. Análisis estadístico	32
6.7. Metodología	32
7. RESULTADOS	34
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	39
9. CONCLUSIONES	44
10. RECOMENDACIONES	45
11. BIBLIOGRAFÍA	46
12. ANEXOS	50

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Bacterias oportunistas que hacen parte de la Microbiota ocular frecuentemente aisladas de conjuntiva de acuerdo a la edad	17
TABLA 2. Bacterias oportunistas que hacen parte de la Microbiota ocular aislados en párpados	18
TABLA 3. Bacterias oportunistas del ambiente, aislados en el ojo de sujetos con o sin infección ocular	18
TABLA 4. Bacterias oportunistas zoonóticas aisladas de ojos humanos con o sin patología	19
TABLA 5. Microbiota en diferentes regiones del cuerpo	21
TABLA 6. Halo de inhibición de crecimiento del <i>Staphylococcus</i> frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared	36
TABLA 7. Halo de inhibición de crecimiento del <i>Staphylococcus</i> frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos	37
TABLA 8. Halo de inhibición de crecimiento del <i>Staphylococcus</i> frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas	37

INDICE DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. Total de aislamientos	33
GRÁFICA 2. Géneros identificados en la microbiota conjuntival	34
GRÁFICA 3. Especies aisladas del género <i>Staphylococcus</i>	34
GRÁFICA 4. Microbiota de hombres y animales presentes en conjuntiva	35
GRÁFICA 5. Microbiota gastrointestinal presente en conjuntiva	35
GRÁFICA 6. Microorganismos ambientales presentes en conjuntiva.....	36

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Sistema automatizado VITEK	27
--	----

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Consentimiento informado	50
ANEXO 2. Formato de historia clínica	52

RESUMEN

Introducción. La microbiota hace referencia a la población de microorganismos que habitan en la piel y mucosas que revisten la superficie del ojo y de los sistemas respiratorio, digestivo, urinario y genital de las personas sanas; la microbiota ocular se encuentra especialmente en la conjuntiva y está constituida por bacterias del género *Staphylococcus*, *Bacillus* spp y *Streptococcus* spp, esta diversidad puede variar de acuerdo a condiciones estacionales, temperatura, edad y exposición ambiental. La microbiota de la conjuntiva de sujetos sanos que no presentan patología ocular se ha estudiado principalmente con técnicas microbiológicas y bioquímicas convencionales, lo cual limita la identificación real en cuanto a diversidad y por lo tanto se desconoce su susceptibilidad microbiana. **Objetivo.** Identificar la diversidad de la microbiota de la conjuntiva en adultos escolares saludables mediante el sistema automatizado VITEK. **Metodología.** Se tomaron 2 muestras del saco conjuntival de un ojo de 50 sujetos voluntarios, hombres y mujeres entre 18 y 25 años que cumplieran con los criterios de inclusión y que aceptaran firmar el consentimiento informado. Las muestras se cultivaron en agar sangre y agar chocolate a 37°C por 24 horas. Las colonias aisladas se identificaron mediante la coloración de Gram y se procedió resembrar en agar nutritivo para la identificación de género y especie por el sistema automatizado VITEK. Posteriormente se realizó el antibiograma para evaluar la resistencia o susceptibilidad microbiana. **Resultados.** Se procesaron 100 muestras en el sistema automatizado VITEK, hubo crecimiento en el 82% de las mismas y se obtuvieron 106 aislamientos de los cuales el más frecuente hace referencia a cocos Gram positivos, se determinaron 25 microorganismos diferentes, siendo el *Staphylococcus* el género más frecuente. Existen gran cantidad de géneros y especies bacterianas habitando en la microbiota conjuntival e inesperadamente muchos de estos son agentes patógenos oportunistas de la superficie ocular teniendo en cuenta que la mayoría de cepas fueron resistentes a la Penicilina y a la Bacitracina. **Conclusión.** Existe una gran diversidad de microorganismos en la microbiota conjuntival, la cual se evidencia con la identificación de especies del género *Staphylococcus* y géneros como el *Acinetobacter*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* y *Rhizobium* que no se han reportado en la literatura.

Palabras claves: Microbiota ocular, antibiograma, VITEK, conjuntiva, patógenos oportunistas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La flora microbiana normal o microbiota hace referencia a la población de microorganismos que habitan en la piel y las mucosas que revisten la superficie del ojo y de los sistemas respiratorio, digestivo, urinario y genital de las personas sanas, por esta razón la microbiota es considerada como la primera línea de defensa, otorgando protección contra microorganismos invasores y estimulando de manera específica la producción del anticuerpo de superficie IgA en mucosas, con el fin de evitar la invasión de tejidos más profundos (1).

En el ojo la microbiota se encuentra principalmente en párpados y conjuntiva, ya que la córnea gracias a su localización y curvatura es prácticamente desprovista de microorganismos. La superficie ocular (cornea y conjuntiva), la película lagrimal y el epitelio conjuntival forman una barrera contra los microorganismos patógenos y representan una interfase para la microbiota del ojo, la cual puede variar de acuerdo a condiciones estacionales, temperatura, edad, exposición ambiental, trauma ocular, procedimientos quirúrgicos, ojo seco, uso de lentes de contacto, medicamentos, enfermedades sistémicas y condiciones generales de higiene (2).

Teniendo en cuenta lo anterior, numerosos estudios han examinado la flora normal conjuntival utilizando técnicas tradicionales de microbiología para su identificación, sin embargo estos métodos de cultivo detectan solamente una pequeña fracción de la microbiota.

Según el estudio de Gündüz *et ál.*, en el año 2008 se determinó que la flora normal de las 50 personas sanas sin enfermedad sistémica ni ocular evaluadas se encontraba constituida en un 48% por *Staphylococcus coagulasa negativos*, seguido por *Bacillus* spp y *Neisseria* spp en un 12%, además de *Staphylococcus aureus* y *Moraxella* spp con 8%, y en una última instancia *Candida* spp y *Streptococcus* spp con 4% de representatividad, destacando que la identificación de las bacterias se realizó por métodos estándar de laboratorio clínico (3).

De igual manera, en los sujetos control del estudio de Bilen *et ál.*, en el año 2007 los microorganismos más frecuentemente aislados fueron *Staphylococcus*

epidermidis (22%), *Staphylococcus aureus* (12%) y *Corynebacterium spp* (10%), identificados a partir de pruebas bioquímicas como catalasa, oxidasa y coagulasa, además de tener en cuenta la morfología de la colonia, la hemólisis y la tinción de Gram (4).

En un estudio similar realizado en el año 2009 por Capriotti *et ál.*, para identificar la flora normal conjuntival en una población rural en Sierra Leona, se estableció que los microorganismos más frecuentes en ojos sanos fueron *Staphylococcus coagulasa negativos* (28,6%), *Staphylococcus aureus* (19,9%), *Pseudomona aeruginosa* (6,2%), *Bacillus spp* y *Klebsiella* (4,3%), *Actinomyces spp* (3,6%), *Nocardia spp* (2,9%), *Micrococcus spp* y *Escherichia coli* (2,5%), *Haemophilus influenzae* (2,2%), *Enterobacter cloacae* (1,4%) y *Proteus mirabilis* (0,7%) (5).

Por otra parte, estudios anteriores como el de McNatt en 1978 y Thiel en 1994 demostraron que con el aumento de la edad los cocos aeróbios son menos comunes que los anaerobios obligados, el *Staphylococcus epidermidis* fue el más común de ellos, presente en un 32,6%, además se determinó la existencia de *Corynebacterium spp* y *Propionibacteria spp* en 49.5% de los ojos evaluados (6) (7).

Los estudios revelan un gran número de géneros considerados patógenos que hacen parte de la flora normal de la conjuntiva y en varios casos presentan alta resistencia a los antimicrobianos. En Colombia la investigaciones microbiológicas a nivel ocular son limitadas, aunque haciendo un paralelo con los estudios en infecciones hospitalarias han demostrado que *S. aureus* es el principal microorganismo aislado (25,7%) y de estos un 64% de los casos presentó resistencia a los betalactámicos (8).

A partir de lo anterior, la identificación de los microorganismos presentes en la superficie ocular se ha realizado, en la mayoría de investigaciones, mediante técnicas microbiológicas y bioquímicas convencionales, que aunque permiten determinar la mayoría de las bacterias clínicamente significativas y sus características metabólicas, limitan la identificación real en cuanto a la diversidad de especie y por lo tanto se desconoce su susceptibilidad

microbiana, siendo necesario utilizar pruebas más específicas a partir de sistemas comerciales especializados en este proceso.

Teniendo en cuenta esto, a partir de la utilización de métodos moleculares como el PCR, secuenciación y bioinformática han sido identificadas un número considerable de bacterias atípicas en la superficie ocular de pacientes sanos (9), sin embargo son métodos dispendiosos y muy costosos a los cuales los profesionales tienen poco acceso.

De esta manera, gracias a la existencia de sistemas automatizados, se ha podido realizar el mismo método de identificación que hacen las pruebas moleculares mediante equipos tecnológicos como el VITEK, el cual es económico, fácil de usar, posee una alta sensibilidad de identificación bacteriana y sus resultados son confiables ya que se resta la subjetividad (10), sin embargo esta técnica no ha sido utilizada a nivel ocular y se desconoce su especificidad en la microbiota conjuntival.

Por esta razón es necesario utilizar el VITEK dentro de la investigación, ya que es un equipo de alta precisión y rapidez que identifica un amplio rango de microorganismos, permitiendo de esta manera conocer la diversidad de la microbiota conjuntival y su susceptibilidad en sujetos sanos.

Formulación del problema: ¿Cuál es la diversidad de la microbiota conjuntival de adultos jóvenes identificada mediante el sistema automatizado VITEK?

JUSTIFICACIÓN

Numerosos estudios han examinado la flora normal conjuntival utilizando técnicas tradicionales de microbiología para su identificación, que detectan una fracción de la microbiota ampliamente reconocida a nivel mundial, no obstante, estos métodos limitan la identificación de especie, impidiendo conocer su susceptibilidad microbiana.

En la última década se han venido desarrollado equipos automatizados que permiten identificar un amplio rango de especies bacterianas poco comunes, con alta especificidad y sensibilidad en un período que oscila entre 2 y 7 horas comparado con el tiempo que habitualmente tardan los métodos tradicionales (15-24 horas), teniendo en cuenta que en el área medioambiental el empleo de estos instrumentos permite obtener resultados de identificación y antibiograma reproducibles, con rapidez y precisión (10).

En efecto, es el sistema automatizado VITEK un equipo desarrollado para la identificación bacteriana mediante la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas, además se encarga del estudio de sensibilidad antimicrobiana a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos (11), cabe resaltar que este equipo ha sido utilizado para la identificación de microorganismos presentes en el medio ambiente, sin embargo aún no se ha implementado a nivel ocular, motivo por el cual se hace necesario incluirlo para obtener resultados más específicos y confiables.

Son diversos los estudios que han evaluado el rendimiento del sistema VITEK en la identificación bacteriana de aislamientos clínicos y su susceptibilidad antimicrobiana, Salazar y colaboradores en el año 2010, evaluaron la utilidad del sistema VITEK para la identificación de 92 aislamientos bacterianos provenientes de ecosistemas dulceacuícolas, en los cuales también utilizaron 15 antibióticos para determinar su respuesta frente a ellos y lo compararon con métodos convencionales de laboratorio, donde determinaron que el tiempo promedio para obtener resultados fue de 6 y 24 horas respectivamente (10).

Así mismo, el 100% de los aislamientos evaluados fueron identificados hasta el nivel de especie con el sistema VITEK, definiendo género y especies más comunes en este tipo de aislamiento. Estos resultados evidencian la sensibilidad y precisión de este instrumento, con base en los criterios indicados en la octava edición del *Manual of Clinical Microbiology*, que señalan que cuando la identificación es superior al 90% de los aislamientos comunes, el sistema es preciso (10).

De esta manera, el método de identificación con el sistema automatizado VITEK permite obtener resultados precisos de manera eficaz, los cuales contribuyen a la caracterización integral de la información adquirida. Además las ventajas que este instrumento ofrece son numerosas, teniendo en cuenta la facilidad de uso, sensibilidad para la identificación de cualquier tipo de bacteria, tiempo que se requiere para su utilización y rentabilidad destacando la relación costo/beneficio (11).

Por otra parte es necesario mencionar que la microbiota conjuntival puede verse afectada por factores ambientales y de higiene que modifiquen los microorganismos presentes allí (2), debido a esto es de vital importancia comparar ambientes en los que se desenvuelvan dos poblaciones con actividades diferentes, como lo son los estudiantes de Optometría y Veterinaria de la Universidad de la Salle, con el fin de verificar si la microbiota se ve influenciada por el entorno en el que se desarrollan, teniendo en cuenta que en los dos existe interacción con otros individuos (personas y animales).

En el caso de las infecciones bacterianas de la conjuntiva, generalmente son auto limitadas, motivo por el cual no se realiza identificación microbiológica ni susceptibilidad y resistencia en la mayoría de casos, sin embargo se formulan antibióticos tópicos de acuerdo a la clínica del paciente, los cuales son de venta libre en el comercio. Con respecto a esto, la resistencia antimicrobiana está relacionada principalmente con el uso indiscriminado de los antibióticos, al no tener en cuenta la prescripción, el tiempo y la regularidad en la toma del medicamento, aumentando de esta manera la tasa de resistencia antimicrobiana (12)(13).

Por esta razón, el aporte realizado con los resultados de la investigación son el informe de géneros y especies prevalentes que no se han reportado en la literatura en Colombia, generando así conocimiento en este campo de la Optometría. Así mismo, en la parte clínica, la inclusión de microorganismos patógenos oportunistas que se deberían tener en cuenta para el diagnóstico clínico, entendidos como agentes etiológicos de patologías como la conjuntivitis y su manejo a partir de la susceptibilidad antimicrobiana.

Adicionalmente, de acuerdo a los hallazgos, tener en cuenta la implicación de los hábitos saludables y de higiene a nivel ocular por parte de los pacientes y la modificación de la flora normal una vez se está en contacto con los animales.

Por lo anterior, esta investigación pretende identificar la microbiota de la conjuntiva en adultos saludables mediante el sistema automatizado VITEK debido a su precisión, confiabilidad y rapidez en la obtención de resultados. Así mismo, esta investigación es viable ya que se cuenta con los recursos humanos y técnicos para su realización, además brindará herramientas útiles a la hora de conocer la diversidad de microorganismos presentes en la conjuntiva y su susceptibilidad microbiana.

MARCO TEORICO

1. BACTERIAS

Son los microorganismos unicelulares más pequeños y hacen parte de las células procariotas, las cuales están conformadas por citoplasma, núcleo, membrana citoplasmática, cápsula, flagelos y pared celular; gracias a este tipo de estructura son capaces de duplicarse por sí solas (división simple) dependiendo del medio que los rodea. Además se presentan en tres tipos morfológicos básicos: cocos, bacilos y espirilos, que a su vez se clasifican en Gram positivas y Gram negativas de acuerdo a la composición de la pared y su reacción frente a la coloración de Gram (14).

El número de especies bacterianas es abundante en la naturaleza ya que suelen encontrarse en el suelo, aire, agua, hombre y animales; algunas pueden causar enfermedades, ya que poseen una estructura antigénica capaz de inducir en el organismo el desarrollo de anticuerpos específicos contra cada uno de sus componentes, sin embargo la mayor parte son necesarias para la vida animal (15).

1.1. Patogénesis de la infección bacteriana.

Esta incluye el inicio del proceso infeccioso y los mecanismos que inducen el desarrollo de signos y síntomas de la enfermedad, destacando que dentro de las características de las bacterias patógenas se encuentra la transmisibilidad, adherencia e invasión a las células y tejidos del huésped, toxigenicidad y capacidad para evadir el sistema inmunitario del mismo (16).

Las bacterias se adaptan al ambiente donde normalmente residen y subsisten, de esta forma, la bacteria asegura su supervivencia e incrementa su posibilidad de transmitirse; cuando produce infección asintomática o enfermedad leve no genera muerte del huésped, por el contrario aumenta la posibilidad de transmitirse de una persona a otra. Muchos patógenos oportunistas que causan infecciones nosocomiales se transmiten de un paciente a otro a través de las manos del personal del hospital, por lo tanto, el lavado de manos, es un elemento importante en el control de infecciones (17).

De esta manera, una vez las bacterias entran al cuerpo deben adherirse a las células huésped para establecer un sitio primario de infección y a su vez multiplicarse y propagarse directamente a través de los tejidos o por el sistema linfático hacia el torrente sanguíneo, permitiendo a la bacteria difundirse en el cuerpo y alcanzar tejidos para su multiplicación (18).

1.2. Patógenos oportunistas

Se ha demostrado a través de investigaciones mediante ensayos clínicos en humanos y animales e in vitro que la microbiota ocular tiene una variación desde que el ser humano nace hasta que avanza su edad, al nacimiento predominan *Haemophilus*, *Streptococcus viridans*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *Bacteroides*, *Propionibacterium* y *Lactobacillus*, similar a la microbiota del cérvix, pero dos días después del nacimiento, *S. epidermidis*, *S. aureus* y *E. coli*, son más comúnmente aislados, y en los niños y adultos los más frecuentes son *Staphylococcus coagulasa negativos*, *Propionibacterium*, *Bacillus spp.*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *S. aureus* y *Corynebacterium* (19).

Las bacterias oportunistas más frecuentes en conjuntiva y párpados son el *S. epidermidis* que predomina en diferentes condiciones en la conjuntiva; una de estas es la edad, presentado variación desde el nacimiento hasta la mayoría de edad, al igual que las otras bacterias que se encuentran presentes en la conjuntiva (Tabla 1). En los párpados la bacteria que se encuentra con mayor frecuencia es *Propionibacterium spp.* en individuos jóvenes principalmente (Tabla 2).

Tabla 1: Bacterias oportunistas que hacen parte de la microbiota ocular frecuentemente aisladas de conjuntiva de acuerdo a la edad			
Microorganismo	Porcentaje %	Individuos	Referencia
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	36.4%	Bebés sanos menores de 5 meses	Hua, (20)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	29-60%	Adultos jóvenes Individuos con ojos sanos	Capriotti (5) Singer e Isenberg (21) Willcox (19)
<i>Pseudomonas</i> <i>Actinomyces</i>	7-10% 6.5%	Adultos con ojos sanos	Capriotti (5). Rajkarnikar y Ratna (22).

<i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Corynebacterium spp.</i>	51-69% 21.5%	Adultos mayores con diagnóstico de catarata	Sharma (23).
<i>Propionibacterium spp.</i> <i>Micrococcus sp.</i>	10-35% 12%	Adultos con ojos sanos	Nicola (24) Salinas (25)

Tabla 2: Bacterias oportunistas que hacen parte de la microbiota ocular aislados en párpados			
Microorganismo	Porcentaje %	Individuos	Referencia
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4%	Individuos jóvenes con ojos sanos	Willcox (19)
<i>Moraxella catharrhalis</i>	-----		
<i>Propionibacterium spp</i>	20%		
<i>Corynebacterium spp</i>	15%		
<i>Acinetobacter</i>	12%		

Este grupo de bacterias es relativamente homogéneo en la superficie ocular, sin embargo los nuevos estudios con técnicas moleculares han ampliado la cantidad de géneros y especies que se encuentran en la flora normal de la conjuntiva, incluyendo géneros como *Pseudomonas* (20%), *Bradyrhizobium* (16%), *Acinetobacter* (12%), *Brevundimonas* (5%), *Aquabacterium* (2%) y *Sphingomonas* (1%), habitantes frecuentes del ambiente, del agua y suelo (26).

En el ojo, las bacterias oportunistas habitantes del ambiente (agua, aire y suelo) que se aíslan con mayor frecuencia son: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Bacillus*, y *Bradyrhizobium*, en la Tabla 3 se observan las bacterias oportunistas del ambiente aisladas en los ojo de sujetos con o sin infección ocular (27).

Tabla 3: Bacterias oportunistas del ambiente, aislados en el ojo de sujetos con o sin infección ocular.			
Agua y suelo	Aire	Condición ocular	Referencias
<i>Enterobacter aerógenes</i>		Superficie ocular sana, conjuntivitis, queratitis.	Biantovskaya, (28).
Citrobacter		Infecciones oculares tipo conjuntivitis	Hernández (27).
<i>Sphingomona paucimobilis</i>		Endoftalmitis.	Martínez (29).
		Quemaduras, heridas	

	<i>Bacillus subtilis</i> y <i>B. cereus</i> .	traumáticas, postquirúrgicas, queratitis, endoftalmitis y panoftalmitis	Cubides (30)
<i>Clostridium spp</i>		Panofltamitis severa.	Biantovskaya, (28).
<i>Bradyrhizobium</i>		Infecciones oculares.	
<i>Aquabacterium</i>		Infecciones oculares.	
<i>Brevundimonas</i>		Infecciones oculares.	
<i>Pseudomona</i>		Conjuntivitis y queratitis	
<i>Serratia</i>		Endoftalmitis posoperatorias, panoftalmitis metastásica, queratitis purulenta y conjuntivitis.	

En el ojo humano las bacterias oportunistas que participan en las zoonosis y que afectan el ojo son: *Francisella tularensis*, *Yersinia pestis*, *Brucella*, *Pasteurella multocida*, *Chlamydia psittacii*, *Leptospira*, *Listeria* y *Campylobacter spp* (Tabla 4) (27).

Tabla 4: bacterias oportunistas zoonóticas aisladas de ojos humanos con o sin patología			
Bacteria	Especie animal	Aislamiento en el ojo humano	Referencia
<i>Francisella tularensis</i>	Lagomorfos (conejos y liebres), roedores (ratones y ratas de campo y las ratas almizcladas) y los castores.	Microbiota, conjuntivitis, queratitis.	Biantovskaya, (28).
<i>Yersinia pestis</i>	Roedores (ratas) y pulgas de la rata.	Uveítis, edema.	
<i>Brucella</i>	Ovinos, ternera, búfalos, carnero, porcinos, liebre, renos y roedores.	Infecciones oculares.	
<i>Pasteurella multocida</i>	Mamíferos (gatos y perros) y aves.	Microbiota.	
<i>Chlamydia psittacii</i>	Aves y mamíferos.	Conjuntivitis.	
<i>Leptospira</i>	Rata, bovinos, porcinos, perros	Uveítis.	
<i>Listeria monocytogenes</i>	Estiércol oveja, ternera y vaca.	Endoftalmitis.	
		Conjuntivitis,	

<i>Campylobacter</i> spp	Estiércol vaca.	infecciones oculares	
--------------------------	-----------------	----------------------	--

Existen situaciones específicas en las cuales el individuo es más propenso a adquirir infecciones por microorganismos oportunistas, tales como: antecedentes de traumatismo, ojo seco, abuso de fármacos tópicos y de lentes de contacto, el proceso inflamatorio y las enfermedades sistémicas, además el uso inadecuado de medicamentos tópicos y lentes de contacto, favorece la infección por bacterias oportunistas, debido a su efecto sobre el epitelio, y en la alteración del equilibrio de la microbiota (27).

Sin embargo algunas de esas bacterias no ocasionan enfermedad y se encuentran conviviendo con nosotros, las cuales hacen parte de la microbiota.

2. MICROBIOTA

Hace referencia a las comunidades microbianas que habitan en el cuerpo de animales sanos específicamente en la piel y las mucosas que revisten la superficie de los sistemas respiratorio, digestivo, urinario y genital, teniendo en cuenta que dichos microorganismos pueden clasificarse en dos grupos (31):

El primero denominado microbiota residente, la cual se constituye por una población permanente de microorganismos no invasores que desempeñan una función determinante según la región donde se localice, evitando la colonización por patógenos y posibles enfermedades con el fin de conservar la salud. Y un segundo grupo constituido por la microbiota transitoria que incluye microorganismos no patógenos derivados del ambiente que habitan la piel o las membranas mucosas durante horas, días o semana (18).

Por este motivo los miembros de la flora normal transitoria tienen poca relevancia en cuanto la flora residente normal permanezca intacta, ya que si esta última se altera, los microorganismos transitorios pueden colonizar, proliferar y producir enfermedad, así mismo su crecimiento en una

determinada región dependerá de factores fisiológicos como temperatura, humedad y nutrientes (32).

2.1 Microbiota en piel y mucosas

La cantidad y diversidad de microorganismos frecuentemente encontrados en piel y mucosas varía según su localización (Tabla 5).

Tabla 5. Microbiota en diferentes regiones del cuerpo	
Región	Microorganismos
Piel	<i>Corynebacterium, Propionibacterium, S. epidermidis, Neisseria, S. aureus, S. viridans, Peptostreptococcus, Candida albicans y Acinetobacter.</i>
Nariz	<i>S. aureus, S. epidermidis, Streptococcus, Corynebacterium, Haemophilus, Neumococos, Neisseria, Prevotella.</i>
Bucofaringea	<i>S. aureus, S. viridans, S. pyogenes, S. pneumoniae, S. mutans, Fusobacterium, Neisseria, Haemophilus influenzae, Veillonella y Peptostreptococcus.</i>
Aparato gastrointestinal	<i>Enterococcus, Streptococcus, S. aureus, E. coli, Bacteroides fragillis, Fusobacterium, Lactobacillus, S. faecalis, Clostridium, Neisseria, Klebsiella, Peptostreptococcus.</i>
Genitales	<i>Corynebacterium, Lactobacillus, Streptococcus, Enterococcus, S. epidermidis, Prevotella, Clostridium, Peptostreptococcus, Difteroides, Veillonella y Candida albicans.</i>

(Levinson (33), Brooks (18), Spicer (32))

2.2 Microbiota ocular en humanos

Se encuentra situada en conjuntiva y párpados, destacando que en este último la microbiota residente puede ser modificada por su proximidad con la conjuntiva, ya que gracias al flujo lagrimal y sus componentes antibacterianos conserva la microbiota estable (18).

Teniendo en cuenta esto, la microbiota de personas sanas sin enfermedad sistémica ni ocular está constituida en un 48% por *Staphylococcus*

coagulasa negativos, seguido por *Bacillus* spp, *Neisseria* spp en un 12%, *Corynebacterium* spp 10%, además de *Staphylococcus aureus* y *Moraxella* spp con 8% y en una última instancia *Streptococcus* spp con 4% de representatividad (3).

3. SUSCEPTIBILIDAD Y RESISTENCIA DE LA MICROBIOTA OCULAR:

Teniendo en cuenta que los *Staphylococcus* *coagulasa* negativa representan la mayor proporción de aislamientos, es importante destacar que el 90% son susceptibles a la cefotaxima, levofloxacin, imipenem, meropenem, vancomicina, y cada uno de los aminoglucósidos, excepto la neomicina, además entre 70% y 90% fueron susceptibles a la cefazolina, ciprofloxacina, ofloxacina, norfloxacina, y cloranfenicol y menos de 70% son sensibles a los análogos de la penicilina, ceftazidima, eritromicina y tetraciclina (34).

En contraste con la investigación de Musgo y colaboradores en 2010, en la cual el 80% fueron susceptibles a la gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina, e imipenem. Entre 60% y 80% fueron susceptibles a las cefalosporinas y fluoroquinolonas de nueva generación y menos del 60% a los análogos de la penicilina, eritromicina, fluoroquinolonas y las generaciones anteriores (35).

Por otra parte se investigó la prevalencia de las mutaciones de los genes *gyrA*, *gyrB*, *grlA* y *grlB* de aislamientos clínicos con resistencia a la meticilina luego de infecciones oculares por *Staphylococcus aureus*, dando como resultado una alta frecuencia de mutaciones ya que el 62,5% de los aislamientos tenía cuatro o cinco mutaciones, lo cual sugiere que la aplicación de fluoroquinolonas en soluciones oftálmicas con altas concentraciones y las mutaciones pueden ocasionar un alto nivel de resistencia a las mismas (36).

De igual manera, la proporción de infecciones por *Staphylococcus aureus* con cultivo positivo de resistencia a la meticilina aumentó de 29,5% en el año 2000 al 41,6% en 2005, teniendo en cuenta que existe una resistencia para 3 o más agentes antibióticos, incluyendo todas las fluoroquinolonas

ensayadas, razón por la cual los autores aseguran que se necesitan programas nacionales de vigilancia a gran escala para monitorear las tendencias de resistencia antimicrobiana in vitro en aislamientos oculares (37).

Teniendo en cuenta lo anterior, la resistencia a los agentes antibióticos es cada vez más frecuente entre las infecciones oculares ya que entre el 19% y 60% de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* aislados han demostrado resistencia a los agentes antibióticos tales como: macrólidos, penicilina y fluoroquinolonas, sin olvidar que las fluoroquinolonas tópicas se consideran la primera línea de tratamiento en las infecciones oculares (38).

Además, un estudio de resistencia bacteriana analizó las bacterias Gram positivas y Gram negativas respectivamente, observando resistencia a la gatifloxacina, moxifloxacina, ciprofloxacina y la levofloxacina, lo que sugiere que la interpretación de esta superioridad debe hacerse con precaución en el campo clínico, ya que otros factores, como la penetración tisular y la actividad in vivo, se debe tener en cuenta (39).

Por lo tanto, los análisis microbiológicos de las muestras obtenidas de la conjuntiva son necesarios para asegurar la elección de un antibiótico efectivo frente a las bacterias de la superficie ocular (40).

4. TÉCNICAS DE IDENTIFICACIÓN BACTERIANA

Actualmente existen diferentes técnicas que permiten realizar la identificación bacteriana bien sea por sus características fenotípicas o genotípicas, dentro de los cuales se incluyen métodos convencionales, moleculares y basados en equipos automatizados.

4.1. Microbiológicos y bioquímicos

Los métodos convencionales de identificación fenotípica se basan en las características observables de las bacterias como su morfología, desarrollo, propiedades bioquímicas y metabólicas, teniendo en cuenta su crecimiento

invitro en medios de cultivo, dicha identificación se establece en tres niveles de procesamiento (41):

- a. Características macroscópicas: Se basa en una identificación preliminar de la morfología de las colonias en donde se evalúan características de tamaño, forma, consistencia y color, además se valora la presencia o ausencia de hemolisis en medios que contienen sangre, para de esta manera realizar la primera diferenciación de los microorganismos.
- b. Características microscópicas: Incluye pruebas primarias que se basan en la morfología de la bacteria teniendo en cuenta la tinción de Gram, su crecimiento en diferentes medios de cultivo y atmósferas de incubación, esto con el fin de determinar el género al que pertenece un aislamiento a partir de métodos como Gram, morfología, catalasa, oxidasa, oxidación-fermentación, fermentación de glucosa, producción de esporas y movilidad.
- c. Pruebas bioquímicas: Permiten identificar género y algunas especies de los microorganismos aislados a partir de la evaluación de sus características metabólicas. Algunas de las pruebas que se utilizan en la identificación preliminar con lectura inmediata son la catalasa y oxidasa, mientras que la lectura de pruebas como la hidrólisis del hipurato, aminopeptidasa, ureasa e indol se realiza en menos de seis horas, sin embargo, existen pruebas lentas con lectura de 18 a 48 horas dentro de las cuales se encuentran la reducción de nitratos, oxido-fermentación, rojo de metileno, fermentación de azúcares, coagulasa y lipasa.

A partir de lo anterior, es evidente que las técnicas convencionales, a pesar de mostrar bacterias significativas, son dispendiosas ya que requieren de un número determinado de bioquímicas para identificar género y especie, el principal inconveniente de este proceso es que resultados inexactos en las pruebas primarias pueden llegar a generar una identificación errónea, perdiendo así tiempo y recursos; por fortuna ese mismo método se ha sistematizado en equipos de alta precisión, en los cuales todo el proceso se realiza de manera automatizada a partir de tarjetas que contienen diferentes bioquímicas para la identificación bacteriana.

4.2. Sistemas comerciales de identificación microbiológica y bioquímica:

En el mercado existen numerosos sistemas multipuebas que se basan en la identificación bioquímica convencional y permiten optimizar el tiempo en la identificación bacteriana, dichos equipos pueden ser manuales o automatizados (42).

- a. Sistemas manuales: Se fundamentan en una serie de celdillas aisladas con un sustrato liofilizado, las cuales se inoculan individualmente, permitiendo la realización simultánea de 10 a 50 pruebas bioquímicas; los resultados se traducen de forma numérica para catalogar las reacciones obtenidas y se agrupan en tríos que se reducen a un solo dígito, cabe resaltar que cada especie está definida por un código numérico, el cual permite conocer la bacteria que se logró identificar. Algunos de los sistemas comerciales disponibles en el mercado son: API, Enterotube, Oxi/Ferm Tube y Biochemical ID systems.
- b. Sistemas automatizados: Se basan en multipuebas como las descritas en el apartado anterior, sin embargo su inoculación, incubación y lectura se realizan de manera automatizada ya que los datos obtenidos se incorporan en un computador que proporciona un alto índice de confiabilidad; además contienen paneles con diversos antimicrobianos para efectuar pruebas de antibiograma de los microorganismos en estudio. Los principales sistemas comerciales son: MicroScan, VITEK, ATB, Pasco, Wider y Phoenix.

4.3. Métodos serológicos:

Requieren la utilización de inmunoglobulinas específicas a partir de preparaciones provenientes del suero o de un reactivo, con el fin de identificar bacterias en muestras biológicas. Se basan en la reacción de un antígeno presente en el agente bacteriano teniendo en cuenta su respectivo anticuerpo, además los serotipos permiten realizar una diferenciación de los microorganismos a partir de sus especies (43).

Los métodos inmunológicos usados principalmente son la aglutinación directa, inmunofluorescencia y enzimoimmunoanálisis, las cuales se basan en una proteína de superficie mediante antisueros y anticuerpos monoclonales para la identificación bacteriana.

4.4. Métodos moleculares:

Para resolver los problemas que se presentan en los métodos de identificación fenotípica, se han implementado métodos moleculares que incluyen una familia de multigenes para establecer relaciones filogenéticas entre las bacterias, esta amplia variedad de genes permite realizar un estudio taxonómico en los distintos géneros y especies bacterianas, basando su análisis en la secuencia genética del ARNr16 como marcador inicial para realizar una identificación precisa, esto a través de procedimientos y reactivos que detectan determinadas secuencias de ADN propias de un determinado agente microbiano (42).

Los genes con mayor utilidad taxonómica bacteriana frecuentemente descritos en técnicas moleculares como PCR, secuenciación y amplificación del ARNr son los que se desarrollan en conjunto con el ARNr16s, estos son: 16S-23S ARNr, ARNr 23S, *rpoB* (subunidad β de la ARN polimerasa) y *gyrB* (subunidad β de la ADN girasa), los cuales se aplican generalmente para la identificación de microorganismos de una manera más precisa y que no fueron identificados por métodos tradicionales de laboratorio (36).

Estos métodos en general, disminuyen el tiempo para la obtención de resultados al ser comparados con las técnicas convencionales, ya que no dependen de un medio de cultivo y van directamente relacionados con la genética de la bacteria en estudio, sin embargo tienen un costo superior, ya que los equipos utilizados son de alta tecnología y no se dispone de ellos en todos los laboratorios microbiológicos lo que limita su accesibilidad.

5. VITEK

Es un sistema automatizado de identificación microbiana que utiliza la innovadora tecnología de espectrometría de masas (MALDI-TOF), se emplea para la identificación y el estudio de susceptibilidad antimicrobiana

de bacterias clínicamente significativas aisladas de procesos infecciosos u otras fuentes como alimentos y agua (44).

Figura 1. Sistema automatizado VITEK



Recuperado de: <https://static.fishersci.com/images/53134-01~wl.jpg>

Se compone de una serie de láminas desechables con 48 posiciones cada una y un código de barras específico que permite flexibilidad para el usuario, reduciendo al mínimo la introducción manual de datos, aumentando la trazabilidad y evitando tiempo de limpieza innecesario, gracias a los códigos de barras únicos en los medios de placa se garantiza el flujo de trabajo completo, en donde se analizan las láminas en grupos de 4, es decir 192 aislamientos por pista (11).

Mediante la inoculación de una suspensión de microorganismos en tarjetas con determinados paneles de reacciones bioquímicas, además se encarga del estudio de sensibilidad antimicrobiana a través de tarjetas que contienen diluciones estandarizadas de distintos antibióticos (10).

El uso de este sistema permite la obtención de resultados de forma temprana contribuyendo a la caracterización integral de estos aislados, destacando que el empleo de instrumentos automatizados permite también al laboratorio de microbiología obtener resultados de identificación y antibiograma reproducibles, con rapidez y precisión, ajustándose a guías internacionales actualizadas (10).

A partir de lo anterior, es importante destacar que todas las técnicas de identificación bacteriana poseen ventajas y desventajas significativas a la hora

de su utilización, sin embargo el sistema automatizado VITEK proporciona resultados comparables con la identificación molecular sin la necesidad de utilizar equipos tan complejos y se basa en la identificación bioquímica convencional, lo que le permite ser mucho más preciso y confiable ya que se resta la subjetividad, reduce el tiempo que se requiere para la obtención de resultados, es fácil de usar, posee una alta sensibilidad de identificación bacteriana al cubrir gran parte de géneros y especies y se mantiene la relación costo beneficio.

6. ANTIBIOGRAMA

El estudio de la susceptibilidad y resistencia a los antibióticos de la flora ocular ha evidenciado que el 55,2% de las especies de *Staphylococcus* coagulasa negativas presentan resistencia a tres o más antibióticos, el 83% a Penicilina, 48% a oxacilina, 49% a eritromicina y el 28,1% a fluoroquinolonas. El 100% de estas bacterias fue susceptible a la vancomicina, 95% a la gentamicina y el 91.3% a las tetraciclinas (45).

Estos resultados demuestran un porcentaje significativo de resistencia de las bacterias de la flora ocular, a los antibióticos posiblemente por el abuso en la utilización de estos fármacos en la práctica clínica como agentes profilácticos y quimioterapéuticos, llevando al incremento de bacterias multiresistentes. Actualmente se ha reportado un aumento en la resistencia de los microorganismos a los antibióticos; debido al uso indiscriminado, al no tener en cuenta la prescripción, el tiempo y la regularidad en la toma del medicamento (12) (13).

La disminución de la efectividad de los antibióticos, frente a los microorganismos resistentes y las cepas de bacterias multi-resistentes no tratables ha crecido vertiginosamente en los últimos años como consecuencia de mutaciones en los microorganismos y la presión de selección por el uso de ciertos antibióticos que proporciona una ventaja competitiva en las cepas mutadas. Adicionalmente, dosis no óptimas, la falta de control en la venta de los antibióticos, el bajo nivel social y académico de la población, el uso de los antibióticos en la industria y la

agricultura, son determinantes que contribuyen en la generación de la resistencia producida a nivel cromosomal y cada vez más en los plásmidos fácilmente transmisibles (6).

La propagación global de esta resistencia se facilita por la transmisión de genes entre las especies, la falta de saneamiento e higiene en las comunidades y hospitales, los viajes y el comercio trayendo implicación en la salud y el ambiente constituyéndose en un grave problema para la salud pública y si a esto se asocian, los efectos tóxicos y secundarios de los medicamentos se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento, que presenten los mínimos efectos secundarios y contrarreste los casos de resistencia, contaminación ambiental y transferencia de genes que en los últimos años han ido aumentando vertiginosamente (16) (46).

OBJETIVOS

Objetivo General

Identificar la diversidad de la microbiota de la conjuntiva en adultos escolares saludables mediante el sistema automatizado VITEK.

Objetivos Específicos

Comparar los microorganismos presentes en la microbiota de la conjuntiva de adultos escolares que se encuentran en condiciones de práctica clínica diferente: humana-veterinaria.

Evaluar la susceptibilidad y resistencia antimicrobiana del género más frecuente en la microbiota conjuntival.

MATERIALES Y METODOS

Tipo de estudio: Observacional descriptivo de corte transversal.

Población: Estudiantes de la facultad de optometría y medicina veterinaria de la Universidad de la Salle de Bogotá.

Muestra: A conveniencia, se estudiaron 50 jóvenes seleccionando un ojo al azar, que cumplieran con los criterios de inclusión y desearan participar en el estudio mediante la firma del consentimiento informado. Los participantes fueron escogidos teniendo en cuenta condiciones similares de género y edad.

El periodo de tiempo en el que se realizaron las pruebas con su respectivo análisis fue de 8 meses y 13 días, iniciando el 17 de marzo 2015 y finalizando el 30 noviembre 2015.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con el segmento anterior sano, sin patología ocular.
- Pacientes hombres y mujeres de 18 a 25 años.

Criterios de exclusión:

- Presencia de enfermedades infecciosas o sistémicas.
- Usuarios de lentes de contacto.
- Pacientes que hayan tenido una infección reciente y le hayan medicado antibióticos con un tiempo inferior a tres semanas.

Aspectos éticos y recolección de información

Para su realización, la investigación contó con la aprobación del comité de ética de la facultad según la resolución 008430. Todos los pacientes incluidos en la investigación firmaron un consentimiento informado en el cual de manera libre y voluntaria aceptaron participar en el estudio, con previa explicación detallada del procedimiento que se realizó y de los riesgos potenciales del mismo (Anexo N° 1).

Se utilizó un formato de historia clínica en el que se incluyeron los datos personales del paciente, edad, ocupación y evaluación del segmento anterior por biomicroscopía, seguido de un formato de siembra y lectura de microorganismos en el cual se consignaron las características morfológicas de cada colonia, los resultados obtenidos luego de la coloración de Gram y el microorganismo identificado por el sistema VITEK (Anexo N° 2).

Análisis estadístico

Se determinaron los porcentajes de cada género y especie aislada, en total y por facultades, así como los porcentajes de especies susceptibles o resistentes a cada uno de los antibióticos utilizados, el respectivo análisis se realizó en el programa Excel.

Metodología

Procedimientos: En primera medida se examinó el segmento anterior mediante biomicroscopía, evaluando las estructuras oculares para descartar cualquier alteración o patología. Posteriormente se tomaron dos muestras, con intervalo mínimo de una semana, del fondo de saco conjuntival de un ojo seleccionado al azar de 50 sujetos voluntarios, mediante un hisopo seco con punta de algodón estéril humedecido con solución salina fisiológica y sin anestesia tópica.

Cultivo: Las muestras se cultivaron en agar sangre (Gibco) a 37°C por 24 horas, cada colonia aislada se identificó mediante la coloración de Gram y se procedió a resembrar en agar Tripticasa de soya (Gibco) en las mismas condiciones de temperatura y tiempo, con el fin de purificarla para su posterior identificación de género y especie por el sistema automatizado Vitek® 2 compact (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France). Para la clasificación de los microorganismos Gram positivos se emplearon las tarjetas Vitek® 2- GP (Referencia 21342), y la tarjetas Vitek® 2- GN (Referencia 21341) para los microorganismos Gram negativos.

Identificación microbiológica: Para la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos (antibiograma), se utilizó el método de Kirby Bauer modificado,

en el cual las bacterias seleccionadas se sembraron por agotamiento en agar Tripticasa de Soya por 24 horas a 37°C. Posteriormente, se tomó cada colonia aislada con ayuda de un escobillón estéril y se suspendieron en 3,0 mL de solución salina estéril al 0,45%, pH 7,0 (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) en un tubo de ensayo de poliestireno transparente de 12 x 75 mm, hasta alcanzar la concentración del tubo 0,5 de la escala de Mac Farland, correspondiente a $1,5 \times 10^6$ UFC/ml, la cual se midió con el densiCHECK plus (BioMerieux).

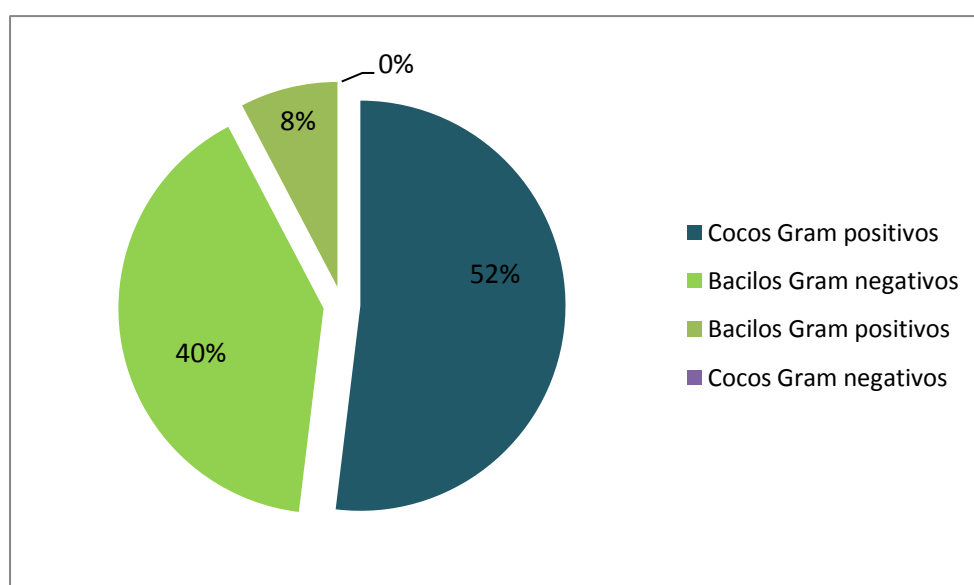
Finalmente, se adicionó 100ul de la dilución de las bacterias en agar Mueller Hinton y se sembró de manera masiva, se colocaron por caja cinco sensidiscos con los respectivos antibióticos (oxid), Penicilina, Oxitetraciclina, Vancomicina, Lincomicina, Neomicina, Bacitracina, Trimetroprim, Eritromicina, Streptomina, se incubaron a 37 °C durante 24 horas y se midieron los halos de inhibición alrededor de los discos.

RESULTADOS

Se procesaron 100 muestras en el sistema automatizado VITEK, teniendo en cuenta que el 47% de los participantes pertenecían al género femenino y el 53% al masculino. La edad promedio de los participantes fue de 20 años, destacando que el 45% pertenecían a la facultad de optometría y el 55% a medicina veterinaria.

Por otra parte, hubo crecimiento en el 82% de las muestras, destacando que se obtuvieron 106 aislamientos, de los cuales el más frecuente hace referencia a cocos Gram positivos con 52%, seguidos de bacilos Gram negativos con 40% y en una última instancia bacilos Gram positivos con 8% (Gráfica 1).

Gráfica 1. Total de aislamientos.

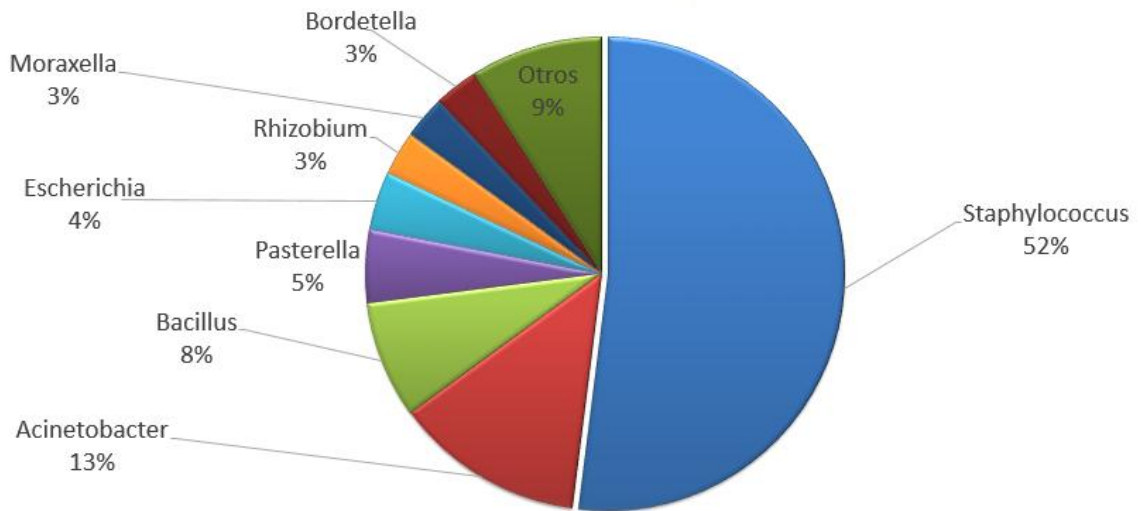


Así mismo, a partir de la identificación de género y especie por medio del VITEK se determinaron 25 microorganismos diferentes, de los cuales los géneros más frecuentemente aislados fueron *Staphylococcus* con un 52%, *Acinetobacter* 13%, *Bacillus* 8%, *Pasterella* 5% y *Escherichia* 4% (Gráfica 2).

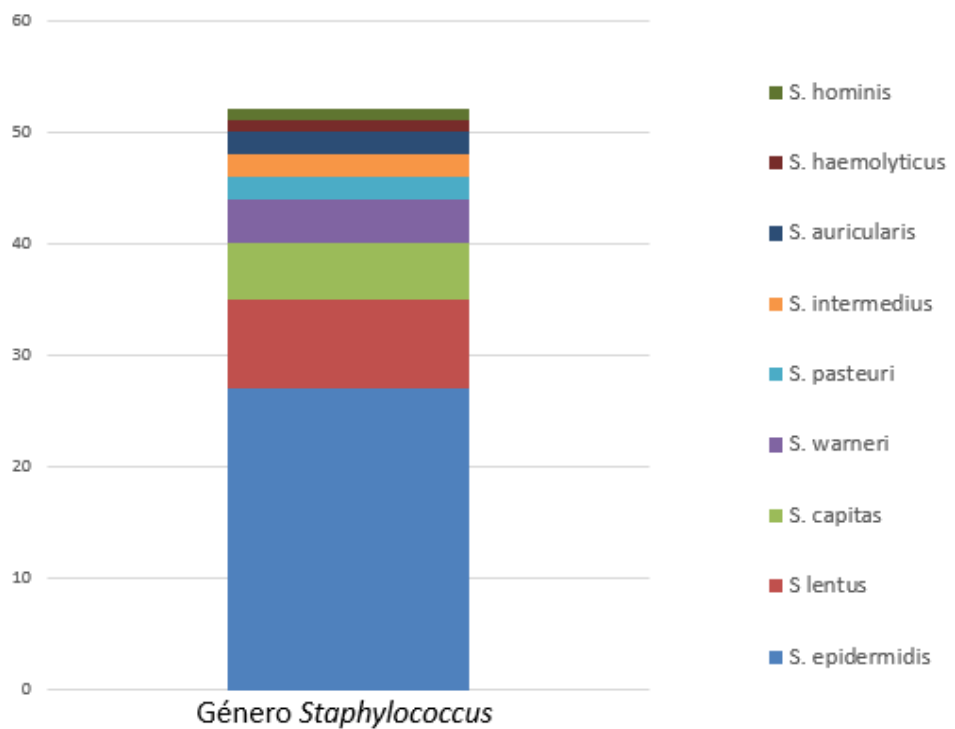
En cuanto al *Staphylococcus*, es importante mencionar que fue el género con mayor diversidad de especies dentro de las cuales se encuentran: *S. auricularis*, *S. warneri*, *S. intermedius*, *S. pasteurii*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*,

S. epidermidis, *S. lentus* y *S. capitis*, siendo estas tres últimas las especies más aisladas (Gráfica 3).

Gráfica 2. Géneros identificados en la microbiota conjuntival.

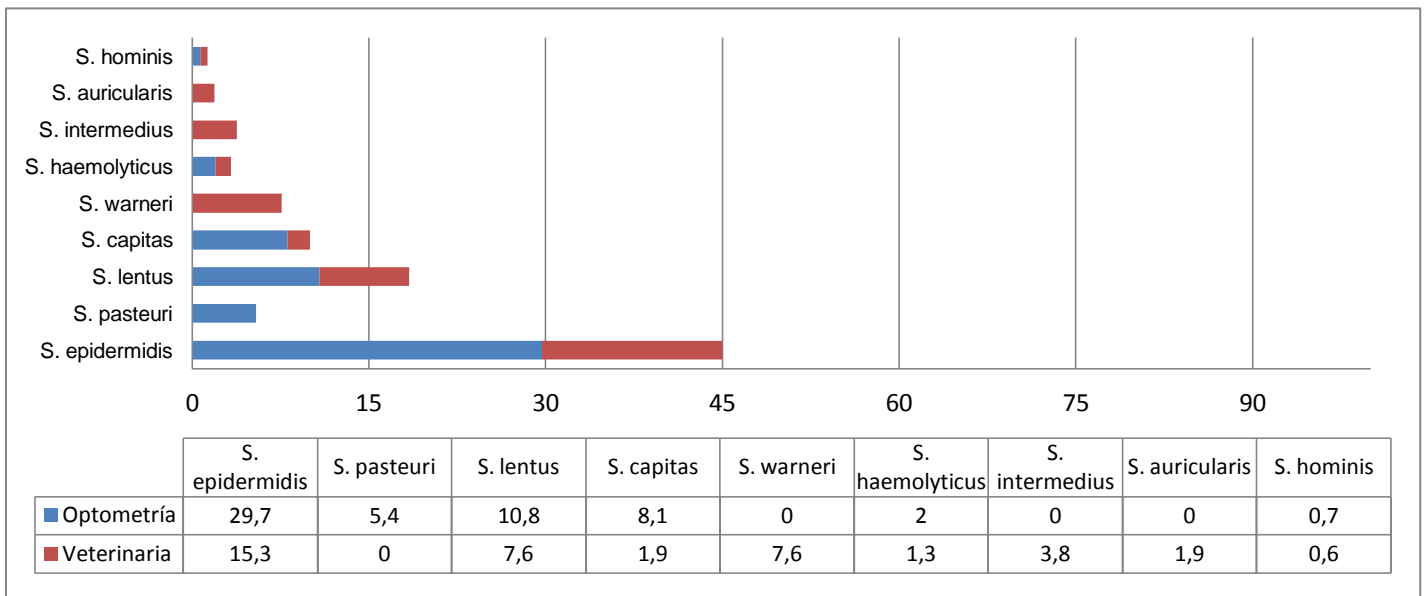


Gráfica 3. Especies aisladas del género *Staphylococcus*.

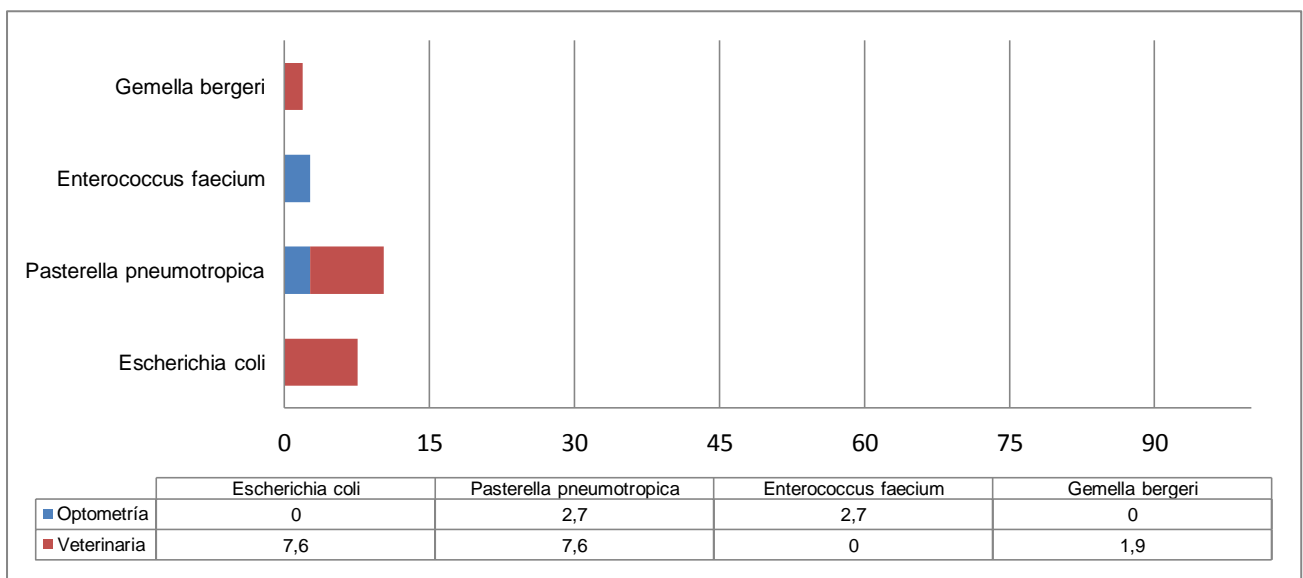


Por otra parte, se compararon los microorganismos presentes en la microbiota de la conjuntiva de adultos escolares que se encontraban en condiciones de práctica clínica diferente, siendo el *Staphylococcus epidermidis* el microorganismo más frecuentemente aislado tanto en la facultad de Optometría como en la de Medicina Veterinaria. De esta manera, fue necesario clasificar los microorganismos identificados según su localización en: Microbiota de hombres y animales, gastrointestinal y ambientales (Gráficas 4, 5 y 6)

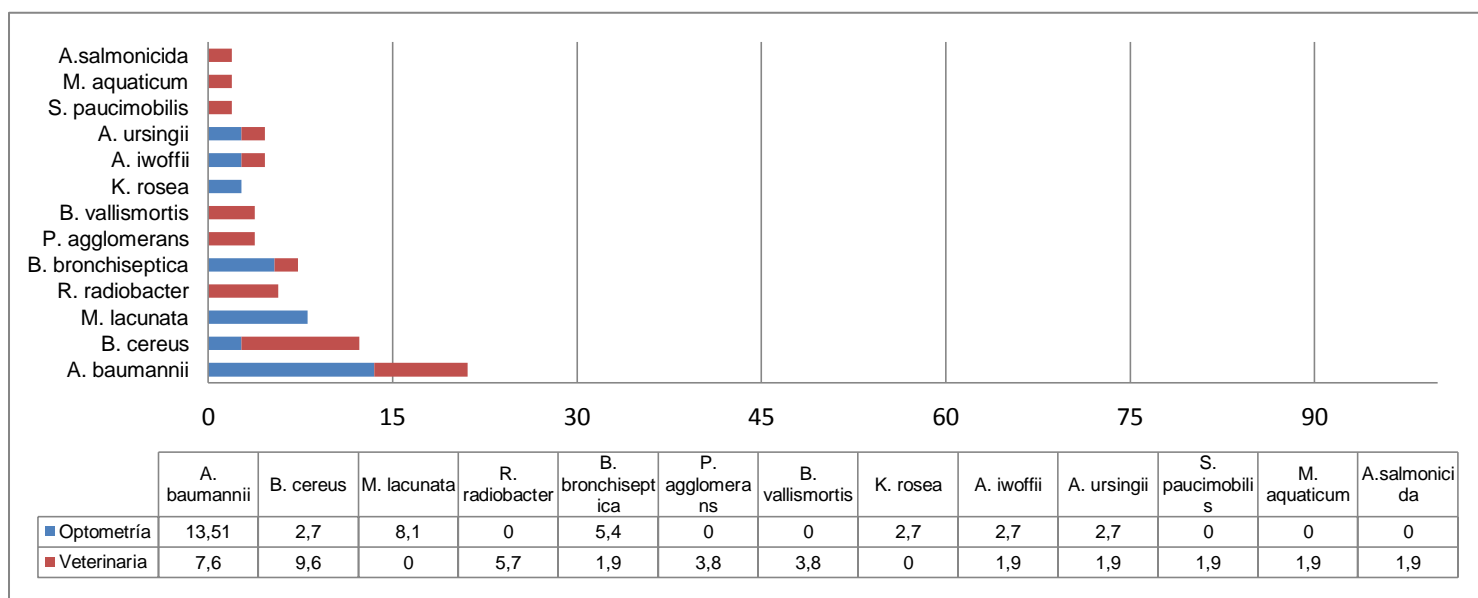
Gráfica 4. Microbiota de hombres y animales presentes en conjuntiva.



Gráfica 5. Microbiota gastrointestinal presente en conjuntiva.



Gráfica 6. Microorganismos ambientales presentes en conjuntiva.



Ahora bien, el antibiograma se realizó en el *Staphylococcus*, al ser el género más frecuentemente aislado y en sus respectivas especies, tomando como referencia la medida del halo de inhibición para determinar su actividad antimicrobiana dependiendo de la susceptibilidad y resistencia que presentara a los 14 antibióticos utilizados, mostrando que la mayoría de cepas fueron resistentes al grupo inhibidores de la pared, excepto a la vancomicina; de igual forma 100% sensibles a los inhibidores de los ácidos nucleicos incluida una quinolona, 100% sensibles a los aminoglucósidos, una tetraciclina y algunas cepas resistentes a la eritromicina (Tablas 6, 7 y 8).

Tabla 6. Halo de inhibición de crecimiento del *Staphylococcus* frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis de la pared

CEPA	Penicilina	Carbenicilina	Cefalotina	Vancomicina	Bacitracina
<i>S. capitis</i>	31	26	35	19	0
<i>S. warnerii</i>	11	12	20	21	0
<i>S. epidermidis</i>	19	13	23	23	0
<i>S. auricularis</i>	21	11	22	20	0
<i>S. aureus</i>	23	12	20	21	0

Sensible: Gris. Resistente: Blanco

Tabla 7. Halo de inhibición de crecimiento del *Staphylococcus* frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos

CEPA	Trimetoprim	(SXT)	Ciprofloxacina
<i>S. capitis</i>	33	39	30
<i>S. warnerii</i>	38	34	32
<i>S. epidermidis</i>	40	32	29
<i>S. auricularis</i>	38	34	30
<i>S. aureus</i>	44	35	33

Tabla 8. Halo de inhibición de crecimiento del *Staphylococcus* frente a los antibióticos inhibidores de la síntesis de proteínas

CEPA	Gentamicina	Tobramicina	Estreptomina	Neomicina	Oxacillin	Eritromicina
<i>S. capitis</i>	25	26	15	25	26	21
<i>S. warnerii</i>	22	25	17	29	20	32
<i>S. epidermidis</i>	29	26	24	32	24	0
<i>S. auricularis</i>	25	24	16	30	19	—
<i>S. aureus</i>	26	25	18	36	23	39

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con los resultados encontrados luego de la identificación de la microbiota conjuntival mediante el sistema automatizado VITEK, es importante destacar que los microorganismos más frecuentes a nivel ocular hacen referencia a cocos Gram positivos, encontrándose en un 52% de los aislamientos, tal y como lo reportado en diferentes investigaciones como la de Gündüz *et ál.* en el año 2008 (3), en donde se determinó que la microbiota conjuntival de personas sanas sin enfermedad sistémica ni ocular se encontraba constituida en un 48% por *Staphylococcus coagulasa negativos*.

Además, es de vital importancia resaltar que el género *Staphylococcus* fue el más frecuente con un 52% de representatividad en concordancia con los autores, no obstante en la literatura generalmente son reportadas en la microbiota conjuntival tres especies pertenecientes a los *Staphylococcus coagulasa negativos* que son *S. epidermidis*, *S. aureus* y *S. warneri* (5) (47), en contraste con las nueve especies identificadas mediante el sistema automatizado VITEK dentro de las cuales se encuentran *S. auricularis*, *S. warneri*, *S. intermedius*, *S. pasteurii*, *S. hominis*, *S. haemolyticus*, *S. epidermidis*, *S. lentus* y *S. capitis*; esto debido a la alta sensibilidad de identificación bacteriana del VITEK tal y como lo señala Romeu en el 2010 (10).

Por otra parte es fundamental mencionar que a partir de los resultados obtenidos se evidencia gran diversidad en la microbiota conjuntival, ya que fueron reportados 25 microorganismos diferentes de los cuales solamente se conocían 10, teniendo en cuenta que estos últimos hacían parte de un grupo de bacterias relativamente homogéneas, identificadas siempre con técnicas convencionales de laboratorio (5).

Sin embargo en el presente estudio se demostró que existen gran cantidad de géneros y especies bacterianas habitando en la microbiota conjuntival e inesperadamente muchos de estos se designan comúnmente como agentes patógenos oportunistas de la superficie ocular, dentro de las cuales se encuentran: *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Methylobacterium*, *Aeromonas*, *Rhizobium*, *Bordetella*, *Gemella*, *Kocuria*, *Pantoea* y *Pasterella*, habitantes

frecuentes de la microbiota de animales, gastrointestinal y del ambiente (agua y suelo), en concordancia con el estudio de Dong, *et ál.* en el año 2011 quienes utilizaron técnicas moleculares para la identificación bacteriana, encontrando también este tipo de microorganismos en sus aislamientos a nivel ocular (26).

Con relación a los microorganismos identificados en la microbiota, es preciso mencionar que la *Moraxella lacunata* se encontró presente en una muestra de la facultad de Optometría, la cual representa el 3% de los aislamientos y que como lo reporta la literatura, es considerado un patógeno reconocido en las conjuntivitis, además de ser la causa más frecuente de blefaroconjuntivitis angular y puede estar implicada en queratitis, endoftalmitis posquirúrgica, blefaritis, entre otras (48) (49).

De modo que es importante analizar los ambientes de interacción de los individuos así como los hábitos de higiene, no obstante, al encontrarse dicho microorganismo en la microbiota se considera con bajo potencial patogénico (50), siempre y cuando no exista alguna lesión en el segmento anterior que le permita convertirse en un patógeno oportunista.

Con respecto a los microorganismos tales como el *Enterococcus faecium*, *Pasteurella pneumotropica*, *Gemella bergeri* y *Escherichia coli* presentes en la conjuntiva y que generalmente hacen parte del tracto gastrointestinal, es preciso destacar, que la presencia de estas bacterias puede estar relacionada con el porcentaje de participantes pertenecientes a la facultad de medicina veterinaria (55%) y a la convivencia con los animales, puesto que la actividad que realizan los individuos incrementa la diversidad y la cantidad de la microbiota ambiental que probablemente incide en la comunidad de bacterias que hacen parte de la flora normal de piel y mucosas (51).

Ahora bien, como se mencionó anteriormente en la presente investigación se identificó una gran diversidad de géneros y especies, dentro de los cuales se pueden destacar el *Acinetobacter* y sus especies (*A. baumannii*, *A. iwoffii* y *A. ursingii*), *Sphingomonas paucimobilis*, *Aeromonas salmonicida*, *Methylobacterium aquaticum*, *Pantoea agglomerans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Rhizobium radiobacter*, entre otros; los cuales en su mayoría son habitantes

frecuentes del ambiente y que al hacer una distinción, se encuentran principalmente en la microbiota transitoria, ya que la conjuntiva alberga cierta cantidad de microorganismos que proceden de la piel o del contacto mano-ojo, sin olvidar que el flujo lagrimal efectúa un continuo barrido de las partículas que se depositan en la conjuntiva, gracias a sus propiedades antibacterianas (52). Razón por la cual, estos microorganismos colonizan de forma intermitente durante horas, días o semanas (18) y varían de un ser humano a otro, lo que permite que esta microbiota incluya bacterias potencialmente patógenas para el propio individuo u otras personas que entran en contacto con él.

A partir de lo anterior se hace necesario destacar que los microorganismos encontrados se clasificaron en tres grupos diferentes dependiendo de su localización y hábitat, para de esta manera conocer las implicaciones que tienen y las posibles patologías que podrían llegar a ocasionar en dado caso de que se presente alguna infección.

Iniciando entonces con los provenientes de la microbiota de hombres y animales, los cuales se encuentran representados por el *Staphylococcus* y sus nueve especies diferentes, señalando que el *S. epidermidis*, se encuentran en la microbiota habitual de piel y mucosas (4) siendo este el más frecuente en los aislamientos obtenidos, por otra parte, el *S. capitis* es la especie más virulenta ya que ocasiona un gran número de padecimientos infecciosos al ser humano y puede penetrar al organismo por la vía oftálmica, teniendo en cuenta que una vez el agente infectante ha colonizado los tejidos dañados, puede penetrar al torrente circulatorio ocasionando septicemias y consecuentemente, endocarditis, artritis y meningitis.

Lo anterior, con base a la investigación realizada por Predari en el 2007 (53), quien establece que las especies más frecuentemente involucradas en patología humana son: *S. aureus*, *S. pasteurii*, *S. auricularis* y *S. capitis*, destacando que esta última especie junto con el *S. intermedius*, *S. lentus* y *S. warneri* hacen parte de la microbiota de animales como lo son cabras, ovejas, gatos y ganado respectivamente, y a su vez la mayoría de ellos se encontraron exclusivamente en la microbiota conjuntival de los estudiantes de la facultad de

Medicina Veterinaria, evidenciándose entonces la implicación del ambiente y el contacto con animales en la variación de la microbiota conjuntival.

El segundo grupo se encuentra conformado por la microbiota gastrointestinal, en la cual microorganismos como el *Enterococcus faecium*, *Pasteurella pneumotropica*, *Gemella bergeri* y *Escherichia coli* se encuentran presentes en conjuntiva, recalcando que este tipo de bacterias tienen implicaciones importantes en patologías sistémicas y oculares, ya que pueden cursar con meningitis neonatal, endocarditis, neumonía, obstrucción de conductos lagrimales y conjuntivitis (16).

En el tercer grupo se encuentran reunidos todos los microorganismos habitantes del ambiente, patógenos oportunistas y que están presentes a nivel ocular, uno de los principales es el *Acinetobacter Baumannii* el cual se encontró en el 13% de los aislamientos, teniendo en cuenta que este microorganismo solo ha sido reportado por investigadores que usan técnicas moleculares y al igual que en los resultados de este proyecto encontraron un alto porcentaje de esta bacteria en sus aislamientos (26), destacando que junto con el *A. iwoffii* y el *A. ursingii* son una importante fuente de infección en los hospitales y pueden llegar a producir alteraciones en los aparatos respiratorio y urinario.

Por otra parte, bacterias como el *R. radiobacter* y *P. agglomerans* comúnmente encontrados en el suelo y material orgánico, son patógenos oportunistas en personas con sistemas inmunes comprometidos y su presencia es nosocomial, es decir que se adquieren en ambientes hospitalarios, demostrándose su presencia únicamente en la clínica de medicina veterinaria. Así mismo la *B. bronchiseptica* causa enfermedades en vía respiratorias de cerdos y perros teniendo en cuenta que los seres humanos no son portadores naturales de esta bacteria y sin embargo fue encontrada en la microbiota ocular; existen además microorganismos que aunque su hábitat es el ambiente en general, se encuentran también en la región nasofaríngea de animales ganaderos como los bovinos, tal es el caso de la *M. lacunata*, que cursa como un agente etiológico de queratitis y blefaroconjuntivitis en los humanos (54). Señalando además que especies como la *K. rosea*, *S. paucimobilis*, *A. salmonicida* y *M. aquaticum* son

aislados principalmente en suelo y aguas no purificadas y al igual que el *B. cereus* y *B. vallismortis* causan envenenamiento por consumo.

Por otra parte, en cuanto a la cantidad de microorganismos presentes en la microbiota de los estudiantes de la facultad de Optometría y de Medicina veterinaria, se pudo determinar que el microorganismo que presentó mayor frecuencia fue el *Staphylococcus* y que sus respectivas especies se encontraron en gran medida en las dos facultades, mientras que los microorganismos de la microbiota gastrointestinal y de tipo ambiental se presentaron en mayor proporción en la facultad de Medicina veterinaria, esto debido al cambio de la microbiota de acuerdo a la exposición ambiental y a las condiciones generales de higiene (2).

De manera que el contacto mano-ojo, como se mencionó anteriormente conduce a que exista colonización de microorganismos y que en este caso pueden llegar a ser patógenos oportunistas, además de observar que el personal hospitalario posee una gran diversidad de microorganismos que hacen parte de la microbiota transitoria; lo cual permite señalar que los microorganismos pueden variar en función de las facultades debido a la relación y contacto con humanos o animales.

Ahora bien, los reportes de susceptibilidad de los *Staphylococcus coagulasa* negativos, indican que estas especies son resistente a la bacitracina, tiene muy baja sensibilidad a la penicilina (17%), una sensibilidad intermedia a la eritromicina, buena sensibilidad a los aminoglucósidos, tetraciclinas y en general son 100% susceptibles a la vancomicina (45), en concordancia con los resultados del presente estudio. Razón por la cual, es importante replantear los diagnósticos bacterianos del segmento anterior debido a la presencia de microorganismos identificados y que actualmente no se tienen en cuenta para el diagnóstico de patologías oculares, resaltando que su actividad antimicrobiana puede variar y por ende la efectividad del tratamiento efectuado.

CONCLUSIONES

El género más frecuente en la microbiota conjuntival fue el *Staphylococcus* con un 45% de representatividad, acorde con lo descrito en la literatura.

Existe una gran diversidad de microorganismos en la microbiota ocular, la cual se evidencia con la identificación de especies del género *Staphylococcus* y que no se han reportado en la literatura.

La especificidad del VITEK permitió identificar microorganismos como el *Acinetobacter*, *Methylobacterium*, *Sphingomonas* y *Rhizobium* presentes en la superficie ocular, los cuales solo se han reportado por investigaciones que utilizan técnicas moleculares.

Existen microorganismos potencialmente patógenos en la microbiota conjuntival tanto para el individuo portador como para las personas que se encuentran en contacto con él.

Los microorganismos de la microbiota conjuntival pueden variar en función de las facultades debido a la relación y contacto con humanos y/o animales.

Existe una buena sensibilidad de las especies del género *Staphylococcus* a los aminoglucósidos, tetraciclinas y en general 100% de sensibilidad a la vancomicina.

RECOMENDACIONES

Informar a la comunidad académica de las dos facultades sobre los resultados de la investigación, con el fin de concientizar acerca de la importancia de la bioseguridad.

Reevaluar las prácticas de higiene que se están teniendo durante las prácticas clínicas, debido a la presencia de microorganismos patógenos oportunistas en la microbiota conjuntival.

Utilizar medios de cultivo más enriquecidos en investigaciones posteriores debido a los requerimientos nutricionales de algunas especies para su crecimiento, con el fin de incluirlas en la diversidad de la microbiota conjuntival.

BIBLIOGRAFÍA

1. Proctor LM. The National Institutes of Health Human Microbiome Project. Semin Fetal Neonatal Med [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2016.05.00>
2. Balikoglu-Yilmaz M, Sen E, Sevket O, Polat Y, Karabulut A, Uysal O. Comparison of aerobic conjunctival bacterial flora in pregnant, reproductive-aged and postmenopausal women. *International Journal of Ophthalmology*. 2012; 5(6): 731-736. Available from: <http://doi.org/10.3980/j.issn.2222-3959.2012.06.15>
3. Gündüz A, Gündüz A, Cumurcu T, Seyrek, A. Conjunctival flora in Behçet patients. *Canadian Journal of Ophthalmology*. 2008 43(4): 476-479.
4. Bilen H, Ates O, Astam N, Uslu H, Akcay G, Baykal O. Conjunctival flora in patients with type 1 or type 2 diabetes mellitus. *Adv Ther*. 2007;24(5):1028–1035.
5. Capriotti J, Pelletier J, Shah M, Caivano D, Ritterband D. Normal ocular flora in healthy eyes from a rural populaton of Sierra Leone. *Int J Ophthalmol*. 2009;29(2):81–4.
6. McNatt J, Allen SD, Wilson LA et al. Anaerobic flora of the normal human conjunctival sac. *Arch Ophthalmol* 1978;96:1448–50
7. Thiel HJ, Schumacher U. [Normal flora of the human conjunctiva: examination of 135 persons of various ages] *Klin Monbl Augenheilkd*. 1994;205(6):348–57.
8. Secretaria Distrital de Salud de Bogotá, D.C. Propuesta de Política de Prevención, Control, y Vigilancia Epidemiológica de Infecciones Intrahospitalarias para Bogotá DC. 2004 [Consultado: noviembre 11 de 2015]. Disponible en <http://www.saludcapital.gov.co/secsalud/noticias/Politica.pdf>.
9. Graham J. E., Moore J. E., Jiru X., et al. Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*. 2007;48(12):5616–5623. doi: 10.1167/iovs.07-0588.
10. Romeu B, Salazar P, Navarro A, Lugo D, Hernández U, Rojas N, Eslava C. Utilidad del sistema VITEK en la identificación y determinación de la susceptibilidad antimicrobiana de bacterias aisladas de ecosistemas dulceacuícolas. *Revista CENIC*, 2010, 4(39).
11. Jordá Vargas Liliana, Vila Andrea, Lanza Alejandra, Bonvehi Pablo, Nazar Javier, Mikietuk Analía et al. Utilidad del sistema VITEK en la identificación bacteriana y estudios de sensibilidad antimicrobiana. *Acta bioquím. clín. latinoam*. [Internet]. 2005; 39(1): 19-25. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-29572005000100005&lng=es.
12. Avorn JL, Barret JF, Davey PG, McEwen SA, O'Brian FF, Levy SB. Antibiotic resistance synthesis of recommendations by expert policy grups. World Health Organization. Boston; 2001.
13. Laboratory capacity to detect antimicrobial resistance, 1998. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2000 Jan 7;48(51-52):1167–1171.

14. Rao PN, Rao KN. Study of the normal conjunctival flora (bacterial and fungal) and its relations to external ocular infections. *Indian Journal of Ophthalmology*, 1972; 20: 164-170.
15. Carmona O. Gómez M. Montes T. Marcano C. Mariño F. *Microbiología médica de Divo*. Venezuela: McGraw Hill; 1997.
16. Hannaoui EJ, Villalobos LB, Martínez RE. Escherichia coli shigatoxigénica: Patogénesis, diagnóstico y tratamiento. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [Internet]. 2009 Jun; 29 (1): 13-20. Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562009000100004&lng=es.
17. Gilstrap LC, 3rd, Ramin SM. Urinary tract infections during pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2001;28:581–91. [PubMed]
18. Brooks G, Morse S, Butel J. *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. México: Ed. Manual Moderno; 2002.
19. Willcox MDP. Characterization of the normal microbiota of the ocular surface. *Exp Eye Res* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013;117:99–105. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2013.06.003>.
20. Hua N, Wang J, Shi T, Li X. Normal conjunctival flora in healthy infants aged from 1 to 4 months. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi*, 2010; 46(6):537-41. Base de datos PubMed
21. Singer T, Isenberg J. Conjunctival Anaerobic and Aerobic Bacterial Flora in Paediatric versus Adult Subjects. *The British Journal of Ophthalmology*, 1988; 72(6): 448–451.
22. Rajkarnikar P, Ratna N. Conjunctival Flora of Normal Human Eye. *Revista JSM Ophthalmology*, 2014; 2(2): 10-21
23. Sharma PD, Sharma N, Gupta RK, Singh P. Aerobic bacterial flora of the normal conjunctiva at high altitude area of Shimla Hills in India: a hospital based study. *Int J Ophthalmol* [Internet]. 2013;6(5):723–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3808928&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
24. Nicola F. El laboratorio en la conjuntiva inflamada. Consejo Argentino de Oftalmología, 2010.
25. Salinas B, Ruiz G. Estudio microbiológico de la conjuntiva de pacientes con dermatitis atópica. *Revista Mexicana de Oftalmología*, 2002; 76(1): 4-10.
26. Dong Q, Brulc JM, Iovieno A, Bates B, Garoutte A, Miller D, et al. Diversity of bacteria at healthy human conjunctiva. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(8):5408–13.
27. Hernández P, Quintero G. Perfil microbiológico de pacientes con patología infecciosa del segmento anterior. *Revista Ciencia & Tecnología para la Salud Visual y Ocular*. 2003; 0(1).

28. Biantovskaya H, Stenson S. *Infecciones externas del ojo. 3ª ed.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, 1987.
29. Martínez J, Caldevilla B, Perales R, Pérez F. Síndrome de Stevens-Johnson: a propósito de un caso de fiebre y erupción cutánea. *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 2010; 38(4):245-247.
30. Cubides E, Díaz Y. Infecciones oculares por otras especies de *Bacillus*. *Revista J Clin Microbiol*; 2002; 40 (21): 87-91.
31. Delgado S. Microbiota intestinal humana: análisis y evolución de poblaciones representativas e identificación de bacterias probióticas. Oviedo: Ed. Universidad de Oviedo, 2005.
32. Spicer W. *Microbiología clínica y enfermedades infecciosas*. Barcelona: Elsevier, 2009.
33. Levinson W, Jawetz E. *Microbiología e inmunología: Autoevaluación y repaso*. México: Ed. El manual moderno, 1998.
34. Chang HC, Chang JJ, Chan SH, Huang AH, Wu TL, Lin MC, Chang TC. Evaluation of Etest for direct antifungal susceptibility testing of yeasts in positive blood cultures. *J Clin Microbiol*. 2001; 39:1328–1333. doi:10.1128/JCM.39.4.1328-1333.
35. Evans DJ, McNamara N a, Fleiszig SMJ. Life at the front: dissecting bacterial-host interactions at the ocular surface. *Ocul Surf [Internet]*. 2007;5(3):213–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660895>
36. Shah MM, Iihara H, Noda M, et al. *dnaJ* gene sequence-based assay for species identification and phylogenetic grouping in the genus *Staphylococcus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007; 57(1):25–30.
37. Asbell PA, Sahm DF, Shaw M, Draghi DC, Brown NP. Increasing prevalence of methicillin resistance in serious ocular infections caused by *Staphylococcus aureus* in the United States: 2000 to 2005. *J Cataract Refract Surg*. 2008; 34: 814–8.
38. Klevens RM, Edwards JR, Tenover FC, McDonald LC, Horan T, Gaynes R, et al. Changes in the epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in intensive care units in US Hospitals, 1992–2003. *Clin Infect Dis*. 2006; 42 (3): 389–91.
39. Wong C a., Galvis V, Tello A, Villareal D, Rey JJ. In vitro antibiotic susceptibility to fluoroquinolones. *Arch la Soc Española Oftalmol (English Ed [Internet]*. *SEGO*; 2012;87(August 2010):72–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oftale.2012.05.008>
40. Carreras B. [Bacteriological analysis in the management of conjunctivitis. Comparison of antibiotic resistance between 1982 and 2008]. *Arch Soc Esp Oftalmol [Internet]*. *SEGO*; 2012;87(4):107–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22482893>
41. Cercenado E, Cantón R. *Procedimientos en Microbiología Clínica*. España: Seimc, 2010.

42. Bou G, Olmos A, García C, Nieto J, Valdezate S. *Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología*. Madrid: Centro nacional de microbiología, 2012.
43. Fundora HH, Puig PY, Chiroles RS, Rodríguez AM, Gallardo DJ, Milián SY. Métodos inmunológicos utilizados en la identificación rápida de bacterias y protozoarios en aguas. *Rev Cubana Hig Epidemiol* . 2013; 84-96.
44. BioMerieux. *VITEK GNI+ technical bulletin*. Inc., Hazelwood, 2016.
45. Hsu H, Lind J, Tseng L, Miller D. Ocular flora and their antibiotic resistance patterns in the midwest: a prospective study of patients undergoing cataract surgery. *American Journal of Ophthalmology*, 2013; 155 (1): 36-44.
46. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi A, Wertheim H, Sumpradit N. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 2013; 13(12): 57-98.
47. Keshav BR, Basu S. Normal conjunctival flora and their antibiotic sensitivity in Omanis undergoing cataract surgery. *Oman Journal of Ophthalmology*. 2012; 5(1):16-18. doi:10.4103/0974-620X.94722.
48. Tosco T, Bolaños M, Herman E, Pérez J. Queratitis por *Moraxella lacunata*: a propósito de un caso. *Rev. Española Quimioterapia*, 2013; 26(2):164-165.
49. Koneman E, Washington C, Stephen D, Janda W, Procop G, Schreckenberger P, Gail W. *Diagnóstico microbiológico*. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 2008.
50. Kettleison EM, Adhikari A, Vesper S, Coombs K. Key determinants of the fungal and bacterial microbiomes in homes. *Environ Res [Internet]*. Elsevier; 2015; 138:130–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.02.003>
51. Torres M. *Temas de bacteriología y virología médica*. Montevideo: Instituto de Higiene, 2006.
52. Predari SC. *Estafilococos coagulasa negativos: el enemigo silencioso*. *Rev. argent. microbiol. [Internet]*. 2007; 39 (1): 1-3. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412007000100001&lng=es
53. Pujol M, Limón E. *Epidemiología general de las infecciones nosocomiales*. Barcelona: Elsevier, 2013.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO UNIVERSIDAD DE LA SALLE FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD CENTRO DE INVESTIGACIÓN CISVI DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS GRUPO BIOMIGEN

IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA CONJUNTIVAL EN ADULTOS ESCOLARES SALUDABLES, MEDIANTE EL SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Apreciado participante le estamos invitando a formar parte de este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado, siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La microbiota (bacterias que se reproducen en un tejido sano sin ocasionar patología) de la conjuntiva se ha estudiado principalmente con técnicas microbiológicas y bioquímicas convencionales, lo cual limita la identificación real en cuanto a diversidad y por lo tanto se desconoce su susceptibilidad microbiana. El presente trabajo de investigación hace parte del macroproyecto titulado *“Etnomedicina una alternativa en la selección de plantas colombianas y su relación con la actividad antibacterial in vitro” que busca a través del conocimiento fitoquímico de las plantas medicinales nuevos antimicrobianos naturales.*

BENEFICIOS DEL ESTUDIO

Aumentar el conocimiento científico y clínico acerca de la diversidad y susceptibilidad microbiana de la microbiota conjuntival en los jóvenes adultos escolares; este será un estudio base para promover este conocimiento en el país, dado que no se conoce la totalidad de géneros bacterianos saprofitos o patógenos que están presentes en la conjuntiva y si su susceptibilidad microbiana este contribuyendo a la patogénesis de las infecciones oculares. Estos resultados además servirán para que se pruebe *in vitro* la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas medicinales, como base científica que ayudará a validar la práctica de la medicina tradicional como patrimonio cultural. Este proyecto no tiene ningún interés económico directo para los investigadores y las instituciones que representa, el único beneficio es de carácter académico.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos, se examinará el segmento anterior del ojo con la lámpara de hendidura y posteriormente se obtendrá la muestra de la conjuntiva mediante un frotis del fondo del saco conjuntival con un escobillón estéril.

RIESGOS PARA LOS PARTICIPANTES

La obtención de la muestra de la conjuntiva se realizará mediante un frotis del fondo del saco conjuntival con un escobillón estéril, esta prueba es en principio un procedimiento exento de riesgo y sus posibles complicaciones son las mismas que las de cualquier frotis conjuntival, como irritación ocular y lagrimeo. El examen con lámpara de hendidura del segmento anterior no tiene ningún riesgo potencial conocido.

CONFIDENCIALIDAD

La información resultante de su participación es confidencial, los registros serán codificados para la obtención de resultados y en ellos nunca se utilizará su nombre. Este material estará en custodia de los investigadores.

ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, informando las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado anexa a este documento.

FORMATO CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo _____ identificado (a) con cédula de ciudadanía No. _____ de _____ Manifiesto que he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación.

FIRMA DEL PARTICIPANTE

DECLARACIÓN JURAMENTADA DEL INVESTIGADOR

Yo certifico, que he explicado en forma individual la naturaleza y propósito del estudio, la metodología, los beneficios potenciales y riesgos, además de haber respondido todas las preguntas que han surgido.

FIRMA Y NOMBRE DEL RESPONSABLE DEL CONSENTIMIENTO INFORMADO

INFORMACIÓN DE LOS INVESTIGADORES

Director: MARTHA RODRÍGUEZ	VALERIA JAIMES	VICTORIA MARTIN
Bacterióloga MSc Profesor Asistente UNISALLE	Estudiante Optometría VIII semestre UNISALLE	Estudiante Optometría VIII semestre UNISALLE
mafaroedriguez@unisalle.edu.co	wjaimes31@unisalle.edu.co	lmartin32@unisalle.edu.co
3488000 Ext 116	3488000 Ext 116	3488000 Ext 116

Investigador Principal macroproyecto: LUDY PABÓN	Coinvestigador macroproyecto: PATRICIA HERNÁNDEZ
Química MSc Profesor Asistente UNISALLE	Bióloga, Esp, MSc Profesor Asistente UNISALLE
lupabon@unisalle.edu.co	phernandez@unisalle.edu.co



IDENTIFICACIÓN DE LA MICROBIOTA CONJUNTIVAL EN ADULTOS ESCOLARES SALUDABLES, MEDIANTE EL SISTEMA AUTOMATIZADO VITEK Y SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA.

Historia clínica

Fecha: _____ Historia N° _____

Nombre: _____ Edad: _____

Estudiante facultad: _____

Otras actividades: _____

Biomicroscopía

OD

OI

Apto: SI __ NO __

Formato de siembra y lectura de microorganismos

Toma	Fecha	Agar Sangre	Agar Chocolate	Repique	VITEK
1					
2					

Observaciones

