



UNIVERSIDAD DE LEÓN

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Biología Molecular
Área de Bioquímica y Biología Molecular**

**Estudio de la flora conjuntival y su
capacidad de formación de biofilm sobre
material protésico en pacientes
anoftálmicos**

Tesis Doctoral presentada por

José Álvaro Toribio García

Noviembre, 2015



Universidad de León

**INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005)**

Los Dres. D. Miguel Ángel Ferrero García, Dña. Honorina Martínez Blanco y D. Leandro Rodríguez Aparicio como Directores¹ de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la flora conjuntival y su capacidad de formación de biofilm sobre material protésico en pacientes anoftálmicos” realizada por D. José Álvaro Toribio García en el Departamento de Biología Molecular, informan favorablemente el depósito de la misma, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León
a X de X de 2015

Fdo.: Dr. Miguel Ángel Ferrero García Fdo.: Dra. Honorina Martínez Blanco

Fdo.: Dr. Leandro Rodríguez Aparicio

¹Si la tesis está dirigida por más de un director tienen que constar los datos de cada uno y han de firmar todos ellos.



Universidad de León

ADMISIÓN A TRÁMITE DEL DEPARTAMENTO
(Art. 11.3 del R.D. 56/2005 y
Norma 7ª de las Complementarias de la ULE)

El Departamento de Biología Molecular en su reunión del día X de X de 2015 ha acordado dar su conformidad a la admisión a trámite de lectura de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de la flora conjuntival y su capacidad de formación de biofilm sobre material protésico en pacientes anoftálmicos”, dirigida por los Dres. D. Miguel Ángel Ferrero García, Dña. Honorina Martínez Blanco y D. Leandro Rodríguez Aparicio y elaborada por D. José Álvaro Toribio García.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al art. 11.3 del R.D. 56/2005, en León a X de X de 2015.

A mis padres,

a mi hermana

y a mi mujer

AGRADECIMIENTOS

Quisiera mostrar mi gratitud a todas las personas que de un modo u otro han contribuido en la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar he de agradecer a mis Directores de Tesis, los Dres.: Dña. Honorina Martínez Blanco, D. Leandro Rodríguez Aparicio y D. Miguel Ángel Ferrero García, su enorme paciencia y ayuda en la elaboración de esta Tesis. Sus enseñanzas en las técnicas de laboratorio y manejo de microorganismos, así como en la metodología para desarrollar una actividad investigadora, han sido fundamentales en la realización de este trabajo.

En segundo lugar, y no por ello menos importante, al Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de León, especialmente a su jefa de servicio, la Dra. Isabel Fernández Natal, por haberme permitido realizar el estudio microbiológico de los pacientes anoftálmicos con los medios de su servicio, y muy especialmente a la Dra. Teresa Marrodán Ciordia por todo su tiempo y su dedicación en el aislamiento de la flora conjuntival, así como sus explicaciones en la metodología empleada en microbiología clínica. También a M^a Dolores, técnico de laboratorio, por su amabilidad en todas las ocasiones en que le pedí ayuda.

Debo agradecer también a la Gerencia del Hospital Universitario de León, y en particular, al Dr. Manuel Franco Benito, jefe del servicio de Oftalmología, el haberme asignado una actividad laboral que me permitiera desarrollar simultáneamente mi labor asistencial e investigadora.

Al Dr. García Ruíz de Morales, jefe de sección de Inmunología del Hospital Universitario de León, por sus buenos consejos y su disponibilidad.

A todos mis compañeros, tanto del servicio de oftalmología (Miguel, Elena, Carlos, Esther, Bárbara,...) como del laboratorio de bioquímica de la Universidad de León (Iñaqüi, Álvaro, Alfredo, Sergio, Fany, Pepelu, Joaquín, Elías,...). Gracias por vuestra ayuda y comprensión. Os deseo a todos lo mejor.

Al Servicio de Microscopía de la Universidad de León, especialmente a Antonio, por haber contribuido en diversas partes de este trabajo.

A D. Alberto Merino, representante del laboratorio AJL, por haberme facilitado muestras de implantes porosos para los experimentos de adhesión.

A Dña. Mónica Pinotti, ocularista, por su amabilidad para suministrarme placas de resina acrílica con las especificaciones que le pedí.

A mis padres por haberme convertido en lo que soy, por haberme inculcado los valores de trabajo y tenacidad que me han llevado conseguir todas las metas que me he propuesto. A mi hermana por haber confiado siempre en mí, por su cariño y por su apoyo. También a mi abuela Rosa, que aunque ya no está aquí, sé que se hubiera sentido muy orgullosa. Esta Tesis también es vuestra.

A mi mujer, Ana Belén, gracias por TODO. Por tu apoyo incondicional, por tu paciencia, tu cariño, tus ánimos y por estar siempre ahí. Gracias por hacerme tan feliz.

A todas aquellas personas que no he nombrado pero que también han contribuido de alguna manera a esta tesis. Muchas gracias a todos.

Finalmente, he resaltar que este trabajo ha sido parcialmente financiado mediante un proyecto de investigación concedido por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León (Ref. LE283U14).

INTRODUCCIÓN	19
1. Las prótesis en la medicina	21
1.1. Concepto de prótesis	21
1.2. Clasificación de las prótesis	22
1.2.1. Finalidad.....	22
1.2.2. Localización	22
1.2.3. Grado de inclusión	23
1.2.4. Material de fabricación.....	23
1.3. Otros tipos de prótesis	23
1.4. Características de la prótesis ideal	25
1.5. Complicaciones asociadas a las prótesis	26
1.6. Historia de las prótesis	26
2. Las prótesis en la oftalmología	28
2.1. Prótesis ópticas	29
2.2. Prótesis derivativas.....	31
2.3. Prótesis oculoplásticas o perioculares	34
2.3.1. Prótesis palpebrales	35
2.3.2. Prótesis de la vía lagrimal	38
2.3.3. Prótesis de globo ocular	45
2.3.4. Prótesis de relleno orbitario.....	50
2.3.5. Prótesis de paredes orbitarias	60
2.4. Materiales empleados en las prótesis oftalmológicas.....	63
3. La flora microbiana	65
4. La flora conjuntival	68
4.1. Flora conjuntival habitual.....	68
4.1.1. Flora conjuntival bacteriana aeróbica.....	69
4.1.2. Flora conjuntival bacteriana anaeróbica.....	70
4.1.3. Flora conjuntival fúngica	71
4.1.4. Otros microorganismos de la flora conjuntival	72

4.1.5. Definición de flora conjuntival normal	72
4.2. Factores modificadores de la flora conjuntival	73
4.2.1. Enfermedades sistémicas modificadoras de la flora conjuntival.....	74
4.2.2. Enfermedades oculares modificadoras de la flora conjuntival.....	75
4.2.3. Tratamientos sistémicos que modifican la flora conjuntival.....	76
4.2.4. Tratamientos tópicos que modifican la flora conjuntival	76
4.2.5. Prótesis oftalmológicas que modifican la flora conjuntival	77
4.3. Repercusiones clínicas de una flora conjuntival alterada.....	79
5. El crecimiento bacteriano en biofilm	81
5.1. Concepto de biofilm.....	82
5.2. Formación de biofilm.....	83
5.2.1. Adhesión reversible.....	83
5.2.2. Adhesión irreversible	85
5.2.3. Microcolonia	86
5.2.4. Biofilm maduro	86
5.2.5. Propagación del biofilm	88
5.3. Factores modificadores de la adhesión del biofilm	89
5.3.1. Factores microbiológicos	89
5.3.2. Factores medioambientales	92
5.3.3. Factores dependientes del sustrato	92
5.3.3.1. Tipo de material	93
5.3.3.2. Topografía de la superficie de contacto	94
5.4. Mecanismos de defensa y agresión del biofilm.....	94
5.5. Trascendencia clínica de los biofilm.....	97
5.5.1. En medicina general	97
5.5.2. En oftalmología.....	98
5.6. Sistemas de diagnóstico y estudio de los biofilms en implantes.....	101
OBJETIVOS	105
MATERIALES Y MÉTODOS.....	111

1. Materiales y métodos clínicos	113
1.1. Diseño y tipo de estudio clínico	113
1.2. Selección de los pacientes	113
1.2.1. Criterios de selección	113
1.2.2. Características epidemiológicas	114
1.2.3. Retirada del estudio y uso de tratamientos concomitantes	114
1.3. Evaluación oftalmológica. Variables a estudio	114
1.3.1. Anamnesis	114
1.3.2. Evaluación de la tolerancia de la prótesis ocular.....	115
1.3.3. Exploración biomicroscópica	116
1.4. Evaluación microbiológica.....	117
1.4.1. Obtención de las muestras.....	117
1.4.2. Procesamiento de las muestras	119
1.4.3. Identificación de los microorganismos.....	119
1.4.4. Determinación de actividad antimicrobiana.....	120
1.4.5. Cálculo de la tasa de aislamiento global y por especie	121
1.4.6. Cuantificación de la densidad microbiana conjuntival.....	121
2. Materiales empleados en los estudios de adhesión y formación de biofilm... 121	
2.1. Material biológico	121
2.2. Reactivos	122
2.3. Medios de cultivo	123
2.3.1. Medios de cultivo elaborados.....	123
2.3.2. Medios de cultivo comerciales	125
2.4. Materiales de bioadhesión.....	126
3. Métodos empleados en los estudios de adhesión y formación de biofilm. 127	
3.1. Inoculación inicial y condiciones generales de crecimiento	127
3.2. Mantenimiento de las cepas	127
3.3. Determinación del crecimiento bacteriano.....	127
3.4. Valoración de la capacidad de adhesión y de formación de biofilm.....	128

3.4.1. Cinética de adhesión bacteriana	128
3.4.2. Cuantificación de la adhesión bacteriana sobre diferentes materiales	129
3.5. Estudio microscópico	130
4. Análisis estadístico	132
RESULTADOS	135
1. Identificación microbiológica de la flora conjuntival en pacientes portadores de prótesis ocular	137
1.1. Características epidemiológicas de los pacientes incluidos	137
1.2. Flora conjuntival en los ojos sanos.....	138
1.3. Flora conjuntival en las cavidades anoftálmicas	139
1.4. Comparación de la flora conjuntival pre-prótesis, retro-prótesis y del ojo sano contralateral.....	141
1.4.1. Comparación de la flora conjuntival en función del tiempo requerido para el crecimiento microbiano.....	141
1.4.2. Comparación de la flora conjuntival por grupos de microorganismos.....	143
1.4.3. Comparación de la flora conjuntival por patogenicidad.....	146
2. Cuantificación de la densidad microbiana conjuntival.....	147
3. Factores modificadores de la flora conjuntival.....	150
3.1. Características epidemiológicas de los pacientes	152
3.1.1. Edad.....	152
3.1.2. Sexo.....	152
3.1.3. Enfermedades sistémicas.....	152
3.2. Características de la cavidad anoftálmica	154
3.2.1. Lado de la anoftalmía	154
3.2.2. Causa de la anoftalmía	154
3.2.3. Tiempo de anoftalmía.....	155
3.2.4. Tipo de procedimiento quirúrgico.....	156
3.2.5. Presencia de implante orbitario	156
3.2.6. Epífora y obstrucción de la vía lagrimal	158

3.2.7. Inflamación de la cavidad anoftálmica.....	159
3.2.8. Tratamientos tópicos empleados en la cavidad anoftálmica	159
3.3. Características de la prótesis ocular en relación a su cuidado.....	160
3.3.1. Antigüedad de la prótesis ocular	160
3.3.2. Frecuencia y método de lavado de la prótesis ocular	160
4. Factores en relación con la tolerancia subjetiva de la prótesis ocular	161
4.1. Características epidemiológicas de los pacientes.....	162
4.2. Características de la cavidad anoftálmica	162
4.3. Cuidados de la prótesis ocular.....	164
5. Influencia de la flora conjuntival en la tolerancia de la prótesis ocular	164
6. Sensibilidad antibiótica de las bacterias de la flora conjuntival	166
6.1. Sensibilidad antibiótica por grupos de bacterias conjuntivales.....	168
6.2. Relevancia de la presencia de <i>S. epidermidis</i> resistentes	170
7. Evaluación de la adhesión y formación de biofilm	173
7.1. Cinética del crecimiento bacteriano	173
7.2. Cinética de adhesión bacteriana	174
7.3. Cuantificación de la adhesión bacteriana sobre diferentes materiales	178
7.4. Estudio electromicroscópico de los materiales y de la formación de biofilms	182
7.4.1. Evaluación electromicroscópica de la superficie de los materiales protésicos seleccionados.....	183
7.4.2. Evaluación electromicroscópica de la formación del biofilm según la cepa bacteriana	185
7.4.3. Electromicroscopía de la adhesión bacteriana <i>in vivo</i>	188
DISCUSIÓN.....	193
1. Estudio microbiológico de la flora conjuntival en pacientes portadores de prótesis ocular	195
1.1. Flora conjuntival en los ojos sanos.....	195
1.2. Flora conjuntival en las cavidades anoftálmicas	199
2. Cuantificación de la densidad microbiana conjuntival	203

3. Factores modificadores de la flora conjuntival.....	205
3.1. Características del paciente	205
3.2. Características de la cavidad anoftálmica	206
3.2.1. Antecedentes de la pérdida ocular.....	206
3.2.2. Estado actual de la cavidad	207
3.2.3. Tratamientos tópicos empleados en la cavidad anoftálmica	208
3.3. Cuidados de la prótesis ocular.....	208
4. Factores en relación con la tolerancia subjetiva de la prótesis ocular	209
5. Influencia de la flora conjuntival en la tolerancia de la prótesis ocular	210
6. Sensibilidad antibiótica de las bacterias de la flora conjuntival	211
6.1. Tipos de antibióticos evaluados	211
6.2. Sensibilidad antibiótica por grupos de bacterias conjuntivales.....	212
6.3. Relevancia de la presencia de <i>S. epidermidis</i> resistentes	214
7. Evaluación de la adhesión y formación de biofilm	217
7.1. Cinética del crecimiento bacteriano	217
7.2. Cinética de adhesión bacteriana	218
7.3. Cuantificación de la adhesión bacteriana sobre diferentes materiales	219
7.4. Estudio electromicroscópico de los materiales y del biofilm.....	221
CONCLUSIONES	225
BIBLIOGRAFÍA	229

ABREVIATURAS

AA: Ácido acrílico.	log: logaritmo decimal
a.C.: Antes de Cristo.	MEB: Microscopio electrónico de barrido.
AINE: Antiinflamatorio no esteroideo.	MRSA: medio Agar de “Man Rogosa Sharpe”.
ANOVA: Análisis de la varianza.	NB: medio “Nutrient Broth”.
ATCC: “American Type Culture Collection”.	N.D.: No disponible.
BHI: medio “Brain Heart Infusion”.	PBS: “Phosphate Buffered Saline”.
BSS: solución salina balanceada.	PCR: “Polymerase Chain Reaction”.
CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.	PIO: Presión intraocular.
CLSI: “Clinical and Laboratory Standards Institute”.	PMMA: Polimetilmetacrilato.
CMB: Concentración Mínima Bactericida.	PNAG: poli-beta-1,6-N-acetil-D-glucosamina.
CFI: Concentración Mínima Inhibitoria.	PPAD: Polietileno poroso de alta densidad.
χ^2 : test estadístico Chi-cuadrado.	SARM: <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la metilicina.
DM: Diabetes mellitus.	SCN: Estafilococos coagulasa negativos.
DMAEMA: Di-metil-amino-etil-metacrilato.	SCP: Estafilococos coagulasa positivos.
DNA: Ácido desoxirribonucleico.	SD: Desviación estándar.
DNAe: Ácido desoxirribonucleico extracelular.	SDS: Dodecilsulfato sódico.
DNAsa: Enzima desoxirribonucleasa.	SERM: <i>Staphylococcus epidermidis</i> resistente a la metilicina.
D.O.: Densidad óptica.	SEIMC: Sociedad española de Enfermedades infecciosas y Microbiología clínica.
ePTFE: Politetrafluoretileno expandido.	TAE: Tasa de aislamiento por especie microbiana.
ESCRS: “European Society of Cataract and Refractive Surgeons”.	TAG: Tasa de aislamiento global.
EVSG: “Endophthalmitis Vitrectomy Study Group”.	TMAO: N-óxido trimetilamina.
HEMA: Hidroxi-etil-metacrilato.	TSA: medio “Tryptic Soy Agar”.
HL: Hospital de León	TSB: medio “Tryptic Soy Broth”.
LB: medio “Lysogeny Broth”.	UFC: Unidades formadoras de colonias.
LC: Lente de contacto.	
LIO: Lente intraocular.	

INTRODUCCIÓN

1. Las prótesis en la medicina

1.1. Concepto de prótesis

Desde los comienzos de la humanidad ha existido interés por reparar los miembros dañados o perdidos, haciendo uso de instrumentos que permitieran sustituir en parte el miembro o la función perdida. Así, un cazador del paleolítico herido en una pierna tras un lance con un animal, seguramente recurriría al empleo de una rama a modo de muleta que le permitiera continuar caminando. Aunque una muleta constituye un método sencillo de sustituir una extremidad inferior, actualmente no se considera una prótesis, ya que no se encuentra fija de ningún modo a nuestro cuerpo. El término “prótesis” del griego *προθεσις*, compuesto por los vocablos *pro-* (*προ-*) que significa “delante” y *tesis* (*θεσις*) que significa “disposición, colocación, proposición”, harían que el término prótesis significara etimológicamente “poner delante un elemento”, “añadir”, “adicionar”.

Así pues, una **prótesis** se define como un dispositivo que, añadido a nuestro cuerpo, sustituye artificialmente un órgano, una parte de él o alguna de sus funciones.

La diferencia entre una prótesis y un injerto estriba en la naturaleza del material a añadir o introducir en el cuerpo, que será un material artificial, o bien biológico abiótico, en el caso de las prótesis y un tejido biológico vivo en el caso de los injertos. Así, para ambos casos, podemos clasificar los materiales como: autólogos o autoinjertos (materiales biológicos procedentes del propio paciente); isólogos o isoinjertos (materiales genotípicamente idénticos al receptor, es decir obtenidos un gemelo monocigótico); homólogos, homoinjertos o aloinjertos (procedentes de otro individuo de la misma especie); heterólogos o xenoinjertos (materiales biológicos procedentes de un ser vivo de otra especie); o materiales aloplásticos (los fabricados de forma artificial, que son los más empleados en las prótesis). A su vez, según su comportamiento cuando son implantados en el cuerpo, los materiales artificiales pueden ser reabsorbibles, que serán eliminados por el propio organismo después de un lapso de tiempo variable, o no reabsorbibles. Nuestro estudio lo centraremos en los materiales aloplásticos no reabsorbibles, mientras que los reabsorbibles no serán tratados.

1.2. Clasificación de las prótesis

La clasificación de las prótesis se puede realizar atendiendo a varios criterios: finalidad, localización anatómica, grado de fijación al cuerpo, material de fabricación, etc.

1.2.1. Finalidad

La finalidad de una prótesis puede ser múltiple: **funcional, estética o mixta**. Así, un pie protésico tendrá una finalidad funcional, puesto que nos permitirá caminar; por el contrario un ojo artificial, también denominado prótesis ocular, tendrá una finalidad exclusivamente estética ya que mejorará nuestra apariencia, pero no nos permitirá recuperar la visión. En ocasiones se consiguen los dos objetivos: por ejemplo un diente artificial nos permitirá realizar una mejor masticación y además mejorará nuestro aspecto estético.

Dentro de las prótesis funcionales podemos distinguir diferentes tipos de dispositivos (Lodder *et al.*, 2010):

- **Mecánicos:** aquellos que sustituyen las propiedades físicas de una estructura corporal. A su vez pueden ser pasivos, es decir cuando son movilizados por otros elementos corporales, como por ejemplo las prótesis ortopédicas o los implantes dentarios; o activos, aquellos que son móviles por sí mismos, como las válvulas cardíacas o el corazón artificial.
- **Sensoriales:** aquellos que permiten la percepción de estímulos, como los implantes cocleares o las prótesis de retina.
- **Estimuladores electrofisiológicos:** aquellos que producen un impulso eléctrico sobre un tejido diana, como los marcapasos cardíacos o gástricos, o los electro-estimuladores cerebrales en la enfermedad de Parkinson.
- **Administradores de fármacos:** aquellos que, mediante un reservorio y un sistema de control, liberan medicaciones, como las bombas de insulina o de analgésicos.

1.2.2. Localización

En cuanto a su localización, las prótesis pueden clasificarse en prótesis craneofaciales o corporales. Las **prótesis craneofaciales** son aquellas que se implantan

en la cabeza, y se distinguen varios tipos: prótesis faciales, maxilofaciales, dentales, auriculares, auditivas, nasales, orbitarias y oculares. Las **prótesis corporales** son las que se localizan en el resto del cuerpo, e incluirían las prótesis mamarias (prótesis de mama completa, prótesis de pezón), de extremidades (en el miembro superior: prótesis de hombro, codo, muñeca, mano completa, mano parcial,...; y en el miembro inferior: prótesis de cadera, rodilla, pie, dedo gordo del pie,...), prótesis vertebrales, prótesis genitales, etc.

1.2.3. Grado de inclusión

Por su grado de inclusión y fijación al cuerpo, las prótesis pueden clasificarse como **externas**, aquellas que son extraíbles, como una pierna protésica, un ojo artificial, una gafa o una lente de contacto; o **internas**, aquellas que no son extraíbles, pudiendo ser total o parcialmente interna, como por ejemplo, una prótesis de cadera que se encuentra en el interior de nuestro cuerpo o como un implante dentario, respectivamente.

1.2.4. Material de fabricación

Respecto al material empleado, las prótesis se clasifican en **biológicas**, aquellas que emplean materiales tratados pero formados en otros seres vivos; y **aloplásticas**, aquellas que emplean materiales fabricados por el ser humano, como son las cerámicas, los metales o los polímeros. También podemos clasificar las prótesis en función de la porosidad del material; así, podemos hablar de prótesis **integrables**, si el material de fabricación es poroso y permite el crecimiento celular a su través, y de prótesis **no integrables**, si el material no permite la invasión celular. Posteriormente comentaremos, con más detalle, los principales materiales empleados en las prótesis oftalmológicas.

1.3. Otros tipos de prótesis

Además de las clasificaciones expuestas anteriormente, existen también algunos términos específicos para designar a unos tipos de prótesis especiales. Así, se emplea el término **ortesis**, del griego orto- (*ορτο*) que significa “recto” y tesis (*θεσις*), para referirse a un tipo de prótesis que no sustituye al miembro si no que aporta rigidez, con

la finalidad de que se mantenga firme, como es el caso de las prótesis peneanas. También podemos considerar como ortesis diversos dispositivos externos, como rodilleras, tobilleras y muñequeras, que aportan estabilidad a las articulaciones.

El término **epítesis**, del griego epi- ($\epsilon\pi\iota$ -) que significa “sobre, encima de, en la superficie” y tesis ($\theta\epsilon\sigma\iota\varsigma$), se emplea para referirse a prótesis craneofaciales con finalidad estética cuya misión es disimular daños en zonas visibles del rostro (Figura 1).

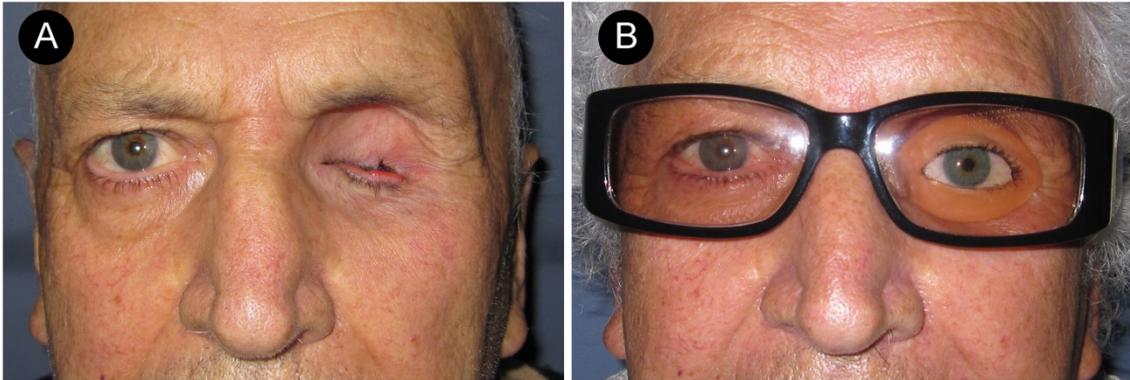


Figura 1. A. Paciente sometido a exenteración orbitaria izquierda conservando párpados, por presentar mucormicosis rino-orbitaria con riesgo vital. B. Mismo paciente 6 meses después, con epítesis oculopalpebral izquierda. (Colección particular del autor).

Dado que la misión de las epítesis, como prótesis craneofaciales estéticas, es actuar en las zonas visibles del rostro, sólo son fijadas de forma superficial, mediante adhesivos, implantes magnéticos, o gafas (Figura 2) (Wagenblast *et al.*, 2008).



Figura 2. Detalle de la epítesis oculopalpebral del paciente de la Figura 1. Se observa que la epítesis está fijada a la montura de la gafa. (Colección particular del autor).

Las epíttesis, al no estar introducidas en el cuerpo ni tener una misión funcional, tienen menos complicaciones y requerimientos que el resto de las prótesis, que deben aproximarse lo máximo posible a la prótesis ideal.

1.4. Características de la prótesis ideal

Existen una serie de características que la **prótesis ideal** debería cumplir (modificado de Martínez-Rodríguez y Paz-Jiménez, 1995; y de Potter *et al.*, 2012):

- Ser biocompatible: no debe producir reacciones no deseadas en la interfaz material-tejido.
 - o No debe provocar inflamación, reacción a cuerpo extraño o alergia.
 - o No puede causar toxicidad local o sistémica.
 - o No puede ser cancerígena.
 - o No debe ser trombogénica.
 - o Debe estar constituida por un material inerte (que no provoque reacciones) o bioactivo (que induzca reacciones deseables en el tejido circundante).
- Tener alta resistencia a la degradación, tanto química (a los fluidos orgánicos) como física (roce mecánico, tensiones del flujo).
- Tener una densidad, flexibilidad y tenacidad similar a los tejidos corporales que sustituye.
- Ser fácil de manejar.
- Ser integrable, sufriendo una incorporación biológica total y rápida.
- Ser resistente a la infección, impidiendo la adhesión y proliferación de microorganismos no deseables.
- Ser esterilizable sin que se produzca una alteración químico-estructural.
- Ser radio-opaca.
- Ser fácil de fabricar y a costo reducido.

Obviamente la prótesis ideal no existe, pero los avances en el diseño de materiales han permitido que se haya mejorado notablemente desde los primeros intentos de sustituir estructuras corporales a los modernos dispositivos de bioingeniería.

1.5. Complicaciones asociadas a las prótesis

Las complicaciones más severas se presentan en las prótesis internas, ya que en las prótesis externas las molestias no suelen trascender del roce mecánico. Por el contrario, la introducción, total o parcial, de materia no viva en un organismo se asocia con una serie de complicaciones, a pesar de que los materiales empleados cada vez se aproximan más a las características de la prótesis ideal.

Las principales complicaciones de las prótesis internas son: la colonización microbiana de la superficie del dispositivo durante su introducción en el organismo, la reacción granulomatosa a cuerpo extraño por parte del tejido receptor, el desplazamiento hacia el exterior del organismo por necrosis del tejido que recubre la prótesis (exposición), o el desplazamiento no deseado hacia el interior corporal (migración). Además, en caso de producirse una exposición, la flora microbiana adyacente colonizará la prótesis, favoreciendo la infección y la expulsión de la prótesis del organismo (extrusión).

La mayoría de estas complicaciones podrían evitarse empleando injertos, es decir material biológico vivo, aunque éstos pueden presentar otros inconvenientes como la necrosis del injerto, la lesión de la zona donante en el caso de injertos autólogos, el rechazo inmunológico o la transmisión de priones, virus lentos u otro tipo de patógenos desconocidos si el donante es distinto del receptor.

Por ello, para emplear prótesis internas de forma segura, es imprescindible una correcta esterilización de la prótesis, asepsia en la zona de implantación durante el procedimiento quirúrgico generalmente acompañada de tratamiento antibiótico, correcta fijación de la prótesis al lecho receptor y meticuloso recubrimiento de la misma con tejidos del organismo con buena vitalidad.

1.6. Historia de las prótesis

La primera prótesis funcional conocida es un artefacto de tres piezas realizado en madera y cuero que sustituye a un dedo gordo del pie derecho (Figura 3), encontrado en una momia de una mujer noble egipcia, y cuya manufactura data entre los años 950 y 710 a.C. (Finch, 2011).

Puede que este tipo de prótesis fuera relativamente común entre los egipcios, ya que existe otra prótesis muy similar, también egipcia y también para sustituir un dedo

gordo del pie derecho, pero fabricada en papel maché con lino y cola de origen animal, y datada como anterior al año 600 a.C. Utilizando copias modernas de estas prótesis antiguas y con la participación de voluntarios que habían perdido su dedo gordo derecho, se han realizado estudios funcionales consiguiendo demostrar que estas primigenias prótesis funcionaban sorprendentemente bien (Finch, 2011).



Figura 3. Prótesis del dedo gordo del pie derecho, fabricada en madera y cuero. Se considera la prótesis funcional más antigua descubierta. (Museo del Cairo, Egipto).

Las prótesis dentales también fueron unas de las primeras prótesis funcionales. Se han recuperado varias de origen etrusco (Figura 4), fabricadas con una lámina de oro que permitía la sujeción de un diente protésico a los dientes sanos (Becker, 1999).



Figura 4. Prótesis dental etrusca, en torno al siglo V a.C. La banda de oro puro permite la fijación de dientes de animales, para reemplazar los ausentes. (Museo de la Escuela Dental, París).

La primera prótesis funcional de gran tamaño conocida es la llamada “pierna de Capua”, de alrededor del año 300 a.C. De esta pieza se conserva una copia en escayola

en el Museo de la Ciencia de Londres, ya que la original fue destruida durante los bombardeos de la ciudad en 1941 (Finch, 2011).

En el área de las prótesis estéticas destaca el sorprendente hallazgo de un ojo protésico (Figura 5), encontrado en una tumba iraní fechada entre los años 2900 y 2800 a.C. (Sajjadi *et al.*, 2008). Este dispositivo, del que hablaremos más adelante, puede ser considerado, actualmente, como la prótesis estética más antigua conocida.



Figura 5. Primera prótesis ocular conocida. Está fabricada en brea seca, y tiene un diámetro de unos 3 cm. Presenta dos orificios laterales para su fijación al rostro mediante hilos. A. Cara anterior: el fino dibujo, hecho con filamentos de oro, imita el iris. B. Cara posterior. (Modificada de Sajjadi *et al.*, 2008).

2. Las prótesis en la oftalmología

La oftalmología es el área de la medicina dedicada al estudio, prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades del sistema visual y del área periocular, lo que incluye al globo ocular, los párpados, la órbita y la vía lagrimal. Los ojos artificiales han sido sin duda el tipo de prótesis más empleada en oftalmología a lo largo de la historia. No obstante, durante del siglo XX se han desarrollado diferentes dispositivos para recuperar distintas estructuras y funciones del ojo y sus anexos, que podríamos agrupar bajo el término común de **prótesis oftalmológicas**.

Podemos diferenciar las prótesis oftalmológicas en tres grandes grupos: las prótesis para recuperar o mejorar la visión (**prótesis ópticas**), las prótesis para disminuir la presión intraocular en pacientes con glaucoma (**prótesis derivativas**), y las prótesis para mejorar el aspecto o la función de los anexos oculares (**prótesis oculoplásticas o perioculares**). Estas últimas las comentaremos en mayor detalle, al tratarse de nuestro objeto de estudio.

2.1. Prótesis ópticas

Actualmente la cirugía de catarata es el tipo de intervención quirúrgica más practicada en el mundo (Foster, 2001 y Malot *et al.*, 2010), lo que convierte a las **lentes intraoculares** (LIO), no sólo en el tipo de prótesis oftalmológica más empleada, si no en el tipo de prótesis más empleada en medicina. La cirugía de la catarata consiste en la extracción del cristalino opacificado, y la colocación de una LIO, lo que permite recuperar el equilibrio óptico en el interior del ojo (Figura 6).

El 29 de noviembre de 1949, el oftalmólogo británico Harold Ridley realizó la primera implantación de una lente intraocular. Estaba fabricada en Perspex®, un material plástico con el que se fabricaban las carlingas de los aviones en la II Guerra Mundial. Ridley observó en pilotos que tenían cuerpos extraños intraoculares de este material, procedentes de esquirlas durante los combates aéreos, que no provocaba inflamación ocular y era bien tolerado (Apple, 2006). A partir del descubrimiento revolucionario de H. Ridley se han ido sucediendo distintas generaciones de materiales plásticos para la fabricación de LIO: polimetilmetacrilato (PMMA), silicona, y polímeros acrílicos hidrofóbicos e hidrofílicos.

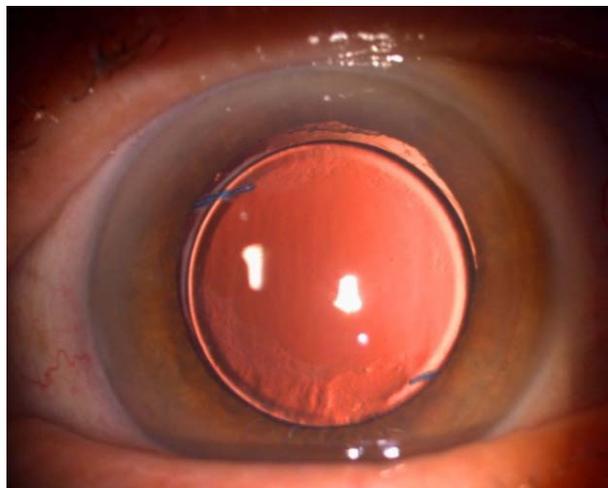


Figura 6. LIO de tres piezas: óptica acrílica y varillas de sujeción (hápticos) de polipropileno. (Colección particular del autor).

Añadiendo a la LIO un dibujo opaco en la parte periférica, se podía reproducir el iris, por lo que se desarrolló otro nuevo tipo de prótesis oftalmológica, la pupila artificial o **prótesis iridiana** (Atkinson, 1954), siendo fabricadas actualmente en los mismos materiales que las LIO.

En la década de 1960 se publicaron varios artículos sobre la posibilidad de emplear lentes intracorneales (Bowen *et al.*, 1961; Henderson y Belau, 1964), aunque su uso de forma rutinaria no comenzó hasta la década de 1990, con el empleo de **anillos intracorneales** de PMMA para la corrección de defectos refractivos (D'Hermies *et al.*, 1991).

Al mismo tiempo que surgieron las lentes intracorneales, se intentó dar un paso más sustituyendo completamente una córnea dañada, sin transparencia, por una córnea artificial o **queratoprótesis** que actuara a modo de lente convergente como hace una córnea natural (Cardona, 1962). Los principales inconvenientes de este tipo de prótesis, eran su fijación al globo ocular del paciente y la facilidad con la que se producían infecciones intraoculares al estar el globo ocular sellado por un material no biológico. En un ingenioso intento de solucionar ambos problemas se propuso el empleo de material biológico dental a modo de soporte de la lente de PMMA, u osteo-odonto-queratoprótesis (Strampelli *et al.*, 1965). No obstante, con este tipo de prótesis parcialmente biológicas persistían las complicaciones. Aún en los dispositivos más modernos como las queratoprótesis Boston I y Boston II diseñadas por el oftalmólogo americano Claes Dohlman (Ma *et al.*, 2005) de mejor tolerancia, existe la formación de membranas retroprotésicas en más de la mitad de los pacientes, y de infección intraocular en casi un 20% de los casos (Muñoz-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Otros materiales protésicos empleados para mejorar la visión, han sido los **cerclajes esclerales**, utilizados en la cirugía del desprendimiento de retina desde 1937, cuando A. Jess empleó una gasa para presionar la esclerótica a fin de conseguir aproximar la coroides a la retina desprendida (Rezaei y Abrams, 2005). Con el desarrollo de nuevos materiales plásticos, el uso de bandas de cerclaje comenzó a ser rutinario desde la década de 1960, empleándose distintos materiales: silicona sólida, silicona en esponja o hidrogel acrílico hidrofílico (Das y Namperumalsamy, 1991). Aunque estas bandas artificiales pueden modificar la refracción ocular y permiten mejorar la visión al ayudar a corregir el desprendimiento de retina, no las podemos considerar como prótesis ópticas, ya que la luz no incide directamente sobre ellas. Por el contrario las **lentes de contacto (LC)** sí cumplen los criterios para considerarlas prótesis ópticas, ya que modifican la refracción y mejoran la visión en pacientes con ametropías. Las LC están fabricadas en diferentes materiales: PMMA, silicona, polímeros acrílicos hidrofílicos, etc.

Las últimas prótesis diseñadas para mejorar la visión son las **prótesis de retina**, que sí tienen un componente óptico: son sensibles a la luz, transformando ésta en señales eléctricas que transmiten al nervio óptico o al cerebro (Roush, 1995). No obstante, todavía están en fase de estudio y desarrollo, por lo que su uso en la práctica está limitado a pacientes con profunda pérdida visual, en los que han demostrado producir una mejoría en la visión (Da Cruz *et al.*, 2013).

La infección de las prótesis relacionadas con la visión es relativamente habitual: el crecimiento de agregados bacterianos en forma de biofilm (ver apartado 4 de Introducción) se ha demostrado en LC, en la infección de las LIO y de los anillos corneales. La infección de las LIO provoca una grave reacción inflamatoria en los tejidos intraoculares (endofalmitis), resultando casi siempre una severa pérdida de visión. Los gérmenes causales proceden de la flora conjuntival, habiéndose determinado, en el 82% de los pacientes con endofalmitis post-cirugía de catarata, que los microorganismos presentes en el vítreo eran genéticamente idénticos a los aislados de la conjuntiva (Speaker *et al.*, 1991). Curiosamente, los cerclajes esclerales, muchas veces retirados por una segunda cirugía de retina sin signos clínicos de infección, aparecen con crecimiento bacteriano en biofilm en más de la mitad de los casos, sin que en esta localización extraocular provoque reacción inflamatoria necesariamente (Zegans *et al.*, 2002).

2.2. Prótesis derivativas

El glaucoma es una enfermedad neurodegenerativa, probablemente de etiología vascular, en la que las fibras nerviosas que componen el nervio óptico sufren una muerte acelerada. Aunque pueden existir diferentes factores, el más relevante, estudiado, y sobre el que actúan los tratamientos disponibles en la actualidad es la presión intraocular (PIO). Se considera que en los pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto (el tipo de glaucoma más frecuente) por cada mm de Hg de descenso de la PIO se disminuye en aproximadamente un 10% la posibilidad de progresión de la enfermedad (Leske *et al.*, 2004).

Dada la importancia de controlar la PIO y lo difícil que puede resultar descenderla en determinados tipos de glaucoma, se han diseñado sistemas artificiales de drenaje del

humor acuoso (derivativos) para aquellos pacientes con presión intraocular elevada que no responden a otros tratamientos.

Ya en el siglo XIX Wecker intentó colocar un cable de oro que comunicara el interior del globo ocular con el espacio subconjuntival. Posteriormente, se probó con tubos de oro, pero dejaron de utilizarse por su alta tasa de exposición y expulsión, por lo que no fue hasta el desarrollo de los materiales plásticos en el siglo XX cuando se empezaron a emplear los **tubos para drenaje** del humor acuoso del ojo y así, disminuir la PIO en aquellos pacientes con glaucoma en los que fracasaban otros tratamientos (Kornilaeva, 2003).

El oftalmólogo ruso Bolgov fue el primero, en 1950, en emplear un tubo de polietileno para este fin, mientras que posteriormente Bietti y Zivotovskii emplearon otros materiales plásticos, como el polivinilo (Zhivotovskii, 1967). Un siguiente paso en este tipo de prótesis se consiguió con el denominado **implante de Molteno** (Figura 7), al conectar un tubo fabricado en polímero acrílico a un plato del mismo material, que era suturado a la esclerótica del globo ocular (Molteno, 1969). Este dispositivo, con ligeras modificaciones, como el implante de Baerveldt, se sigue empleando en la actualidad con buenos resultados.

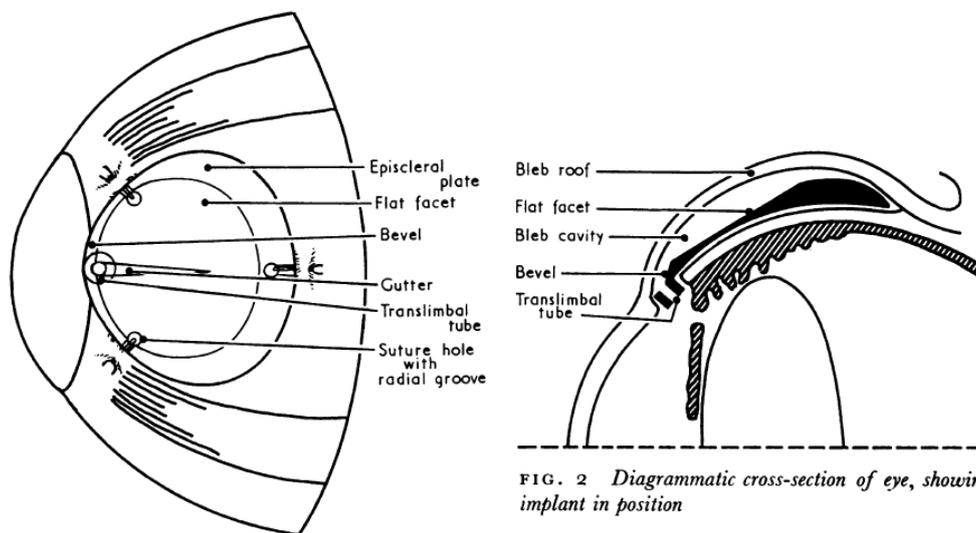


FIG. 1 Diagram showing features of implant and position on sclera

FIG. 2 Diagrammatic cross-section of eye, showing implant in position

Figura 7. Dibujo original publicado por Molteno de su dispositivo de drenaje del humor acuoso. (Tomada de Molteno, 1969).

No obstante la principal desventaja de estos sistemas derivativos es que al carecer de un mecanismo valvular podían provocar importantes hipotonías oculares. Para solucionar esta complicación, Krupin inventó en 1976 el dispositivo de drenaje valvulado (Krupin *et al.*, 1976). En este mismo concepto se basan los sistemas valvulares modernos como la **válvula de Ahmed**, fabricada en silicona, con la que se alcanzan resultados satisfactorios a largo plazo (Wilson *et al.*, 2003).

Otra posible complicación de los implantes derivativos es la necrosis del tejido que recubre el tubo de drenaje, produciéndose la salida parcial de la prótesis (exposición) y la consiguiente colonización del dispositivo por bacterias de la flora conjuntival. Por ello se aconseja, durante la cirugía de colocación del implante, el recubrimiento del tubo con tejido, bien autólogo, homólogo o heterólogo, a fin de prevenir esta grave complicación (Gedde *et al.*, 2001).

La exposición del tubo ha sido una de las razones para el desarrollo de los últimos tipos de prótesis en relación con el glaucoma, que han consistido curiosamente en retomar una antigua idea: emplear tubos de metal para conseguir derivar hacia el exterior del ojo el humor acuoso. El **implante supracoroideo**, fabricado en oro, el implante **ExPRESS®**, de acero, o el **iStent®**, de titanio, están consiguiendo buenos resultados tras modificar su forma y tamaño (Traverso *et al.*, 2005; Freedman, 2010; Skaat *et al.*, 2014). Tanto el implante supracoroideo como el iStent® se colocan atravesando la malla trabecular desde la cámara anterior hacia el espacio virtual entre la coroides y la esclerótica, denominado espacio supracoroideo (Figura 8).

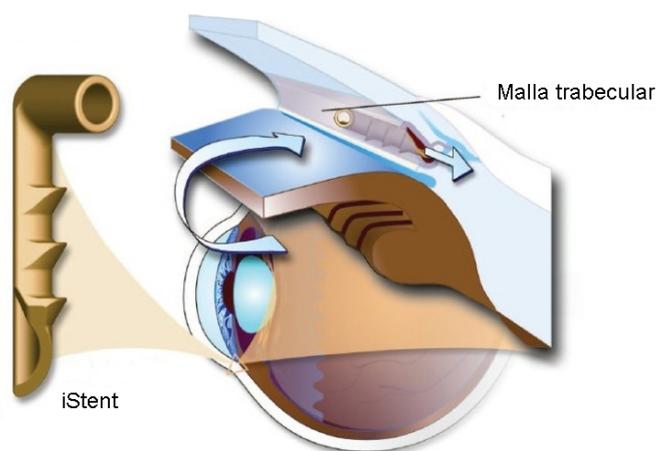


Figura 8. Dibujo del implante iStent®, de tan sólo 1 mm de longitud, diseñado para ser introducido en el ángulo irido-corneal, desde la cámara anterior, atravesando la malla trabecular hasta el espacio supracoroideo. (Modificada de Nichamin, 2009).

El implante iStent®, con tan sólo 1 mm de longitud, es la prótesis más pequeña, hasta la actualidad, que se implanta de forma rutinaria en el ojo humano (Nichamin, 2009). Por el contrario, el implante ExPRESS® se coloca a través de una esclerectomía desde el espacio supracoroideo hasta la cámara anterior (Figura 9).

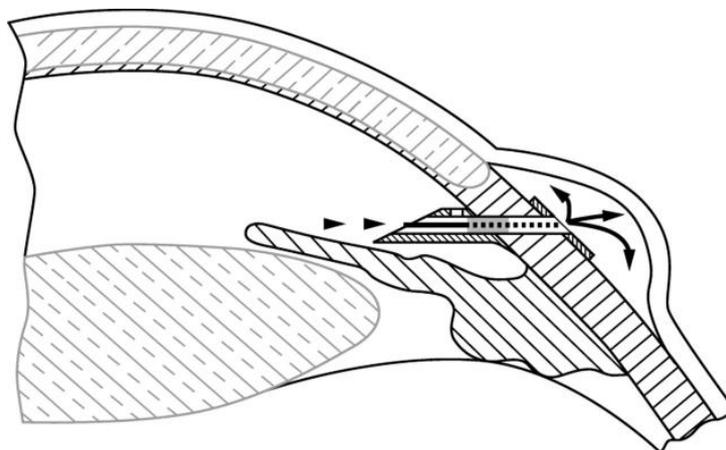


Figura 9. Esquema del implante ExPRESS® diseñado para su colocación, a través de una esclerectomía, desde el espacio supracoroideo a la cámara anterior. (Tomada de Traverso *et al.*, 2005).

2.3. Prótesis oculoplásticas o perioculares

Con el término de cirugía oculoplástica nos referimos a una subespecialidad de la oftalmología encargada del estudio, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de los anexos oculares: párpados, órbita y vía lagrimal.

A lo largo de los siglos, en el área periocular se han desarrollado varios tipos de prótesis oculoplásticas, con finalidad funcional, estética o mixta (Tabla 1).

Esta amplia diversidad de prótesis ha supuesto también el empleo de una gran variedad de materiales, que se ha visto notablemente incrementada con el desarrollo de los polímeros plásticos a lo largo del siglo XX.

A continuación, expondremos los diferentes tipos de prótesis perioculares, deteniéndonos en el desarrollo de los materiales que actualmente tienen un mayor uso y relevancia. También comentaremos las complicaciones que afectan a estos dispositivos, centrándonos en los factores relacionados con las complicaciones infecciosas.

Tabla 1. Diferentes tipos de prótesis en cirugía oculoplástica clasificadas por su función.

PRÓTESIS PERIOCULARES		
FUNCIONALES	ESTÉTICAS	MIXTAS
<p>Prótesis palpebrales</p> <ul style="list-style-type: none"> · Pesas palpebrales · Resortes palpebrales · Ortesis palpebrales · Bandas de tracción palpebral <p>Prótesis vía lagrimal</p> <ul style="list-style-type: none"> · Intubaciones lagrimales · Tapones lagrimales · Tubos de conjuntivorrinostomía 	<p>Prótesis de globo ocular</p> <ul style="list-style-type: none"> · Prótesis oculares · Prótesis esclerales <p>Prótesis de relleno orbitario</p> <ul style="list-style-type: none"> · Implantes orbitarios · Hidrogeles autoexpandibles · Cuñas subperiósticas 	<p>Prótesis paredes orbitarias</p> <ul style="list-style-type: none"> · Láminas y material de osteosíntesis en fracturas de las paredes orbitarias

2.3.1. Prótesis palpebrales

Pesas palpebrales: En 1966 Smellie propuso el empleo de una pesa de oro colocada en el espesor del párpado superior con la finalidad de permitir el cierre de los párpados en los pacientes con parálisis facial, por el efecto de la gravedad sobre la pesa colocada en el párpado (Smellie, 1966). Este tipo de prótesis continúa empleándose de forma habitual en la actualidad. Aunque en general el oro se tolera bien, se han descrito reacciones inflamatorias a estas prótesis (Bair *et al.*, 1995) por lo que se han desarrollado pesas en platino, en forma de cadena, que presentan una tolerancia todavía mejor, aunque su precio es algo más elevado (Bladen *et al.*, 2012).

Resortes palpebrales: Louis de Wecker, en su obra “Thérapeutique oculaire” de 1879, proponía un dispositivo cuya función era mantener la apertura de los párpados en pacientes con ptosis palpebral. Estaba basado en un sistema de muelle, fabricado en plata y diseñado para introducir sus ramas en el espesor palpebral, quedando la zona con el muelle bajo el tejido del reborde orbitario supero-externo (Junceda Avelló *et al.*, 1998). En el siglo XX, otros cirujanos franceses describieron un sistema mecánico para aumentar el cierre palpebral en pacientes con lagofthalmos paralítico (Morel-Fatio y

Lalardrie, 1964). Los resortes palpebrales modernos fueron diseñados por Levine en una aleación de níquel (Levine, 1999), metal que es compatible con la realización de una resonancia magnética, pudiendo emplearse tanto para pacientes con ptosis palpebral miogénica, como en pacientes con lagofthalmos paralítico (Figura 10). A pesar de sus interesantes aplicaciones estos dispositivos no han sido comercializados, por lo que uso continúa siendo escaso ya que su fabricación es artesanal (Fay y Santiago, 2012).

Ortesis palpebrales: En el párpado inferior es frecuente que se produzca la retracción del mismo después de una parálisis facial, enfermedad tiroidea o en el síndrome post-enucleación (Mavrikakis *et al.*, 2009). El cirujano francés Arion propuso una técnica de cerclaje palpebral, empleando una banda de silicona en el espesor del tejido para sostener el párpado (Arion, 1972). Esta técnica, también conocida como hilo de Arion, permitía una corrección dinámica de la parálisis palpebral (English y Apel, 1973). Sin embargo, con el tiempo la silicona perdía tensión disminuyendo su efecto y además podía exponerse al necrosarse el tejido palpebral supra-yacente (Deroche *et al.*, 1977).



Figura 10. Radiografía lateral de cráneo de paciente con resortes palpebrales, uno en cada ojo. Estos dispositivos permiten la apertura palpebral en caso de fracaso conjunto de la función del músculo elevador del párpado y del músculo frontal. (Tomado de Fay y Santiago, 2012).

Otro material que se ha empleado para fabricar ortesis palpebrales ha sido el polietileno poroso de alta densidad (PPAD) (Medpor®), con un diseño de lámina para

ser colocada en el interior del párpado. Aunque en la cirugía oculoplástica el uso del PPAD comenzó con la fabricación de implantes orbitarios (Karesh y Dresner, 1994), su uso como ortesis palpebral obtuvo inicialmente buenos resultados tanto a nivel experimental (Morton *et al.*, 2000) como clínico (Wong *et al.*, 2001). No obstante, al incrementar su empleo se observó que se producían complicaciones (exposición, mala estabilidad, mal contorno,...) en casi la mitad de los pacientes (Tan *et al.*, 2004). En la actualidad su uso como espaciador palpebral es cada vez más reducido, en favor de materiales biológicos como tarso, esclerótica, periostio, fascia lata, cartílago auricular, mucosa de paladar duro o mucosa nasal (Kakizaki *et al.*, 2007). No obstante, como veremos más adelante, la gran versatilidad del PPDA y sus características hacen que actualmente sea uno de los materiales más empleados en cirugía oculoplástica.

Además de las ortesis palpebrales, se han desarrollado ortesis para conseguir la elevación o sujeción de la ceja. Estos dispositivos con finalidad estética, como el Endotine® (Stevens *et al.*, 2003) o el Ultratine® (Apfelberg *et al.*, 2008), están fabricados con polímeros reabsorbibles, y constituyen un ejemplo de prótesis completamente reabsorbible.

Bandas de tracción palpebral: Este tipo de material se implanta para conseguir movilizar una estructura, en nuestro caso el párpado, transmitiendo la contracción de un músculo sano. Al contrario que las ortesis que actúan como un esqueleto artificial, las bandas pretenden actuar como tendones artificiales que transmitan el movimiento.

Una de las patologías más frecuentes en cirugía oculoplástica es la caída del párpado superior o ptosis palpebral. En aquellos pacientes en los que el músculo elevador del párpado no tiene función o es mínima, se realiza la “conexión” del párpado al músculo frontal (siempre que éste tenga capacidad contráctil). Para realizar esta técnica, denominada suspensión frontal, se han empleado bandas de tracción de diferentes materiales, tanto biológicos: fascia lata (Payr, 1909), esclerótica de banco de tejidos (Helveston y Wilson, 1975), tendón palmar largo (Kurihara *et al.*, 1984) o fascia temporal (Fan, 2001); como sintéticos: suturas (Dransart, 1880; Saunders y Grice, 1991; Chow *et al.*, 2011), silicona sólida en forma de tira aplanada (Tillett y Tillett, 1966) o redondeada (Leone *et al.*, 1981), mallas de poliéster (Mersilene®) (Downes y Collin, 1989) o bandas de politetrafluoretileno expandido (ePTFE) (Goretex®) (Adenis *et al.*, 1989).

Las principales complicaciones del uso de bandas fabricadas con materiales sintéticos son la colonización microbiana de las mismas durante su implantación (Saunders y Grice, 1991; Davies *et al.*, 2013), así como la formación de granulomas por reacción a cuerpo extraño, siendo especialmente tendentes a esta complicación la silicona (Hersh *et al.*, 2006), el Mersilene® (Mehta *et al.*, 2004) y el Goretex® (Silvério *et al.*, 2009).

La contaminación de estas prótesis con microorganismos durante su implante suele provocar las primeras manifestaciones clínicas de una a varias semanas después de la cirugía (Figura 11), como es característico del crecimiento bacteriano en biofilm, como veremos más adelante.



Figura 11. Abscesos en párpados y cejas en paciente con síndrome de blefarofimosis, 4 semanas después de la corrección de la ptosis palpebral mediante suspensión frontal con bandas de silicona. En el cultivo se aisló *Mycobacterium chelonae* y *Candida parapsilosis*. La paciente se curó con tratamiento antibacteriano y antifúngico intravenosos y extracción de los bastones de silicona (Tomado de Davies *et al.*, 2013).

2.3.2. Prótesis de la vía lagrimal

Intubaciones o *stent* lagrimales: El término anglosajón *stent* se refiere a un tipo de implante que mantiene la luz de un conducto, generalmente un vaso. La Real Academia Española de la Lengua ha reconocido y adaptado este vocablo al castellano, estando aceptado como *estent*. El origen de este término parece estar en el apellido de Charles Thomas Stent, dentista inglés que patentó un material termoplástico, más

adelante conocido como “pasta de Stent”. Sin embargo fue el doctor Charles Dotter, considerado padre de la radiología intervencionista, quien utilizó el término *stent* para referirse a las espirales de metal que colocaba en las arterias poplíteas en sus experimentos con perros (Ambekar y Nanda, 2013). Un estent es un dispositivo artificial que permite dar consistencia a una estructura tubular, manteniendo permeable su luz, por lo que debemos considerarlo como una ortesis. Un término sinónimo, muy empleado en la práctica clínica, es “intubación”.

Se han desarrollado diferentes tipos de *stents* o intubaciones para solucionar la obstrucción de la vía lagrimal, que lleva la lágrima desde el fondo de saco conjuntival a la fosa nasal. Podemos diferenciarlos en dos grandes grupos: *stents* de paso de lágrima intraluminal y *stents* de paso de lágrima periférico.

Los ***stents* de paso intraluminal** son tubos huecos, de distintos materiales, que se colocan en la vía lagrimal bajo control radioscópico desde la fosa nasal, hasta el saco lagrimal a través del conducto nasolagrimal para que la lágrima circule por su interior. Este tipo de *stent* resultaron de gran interés para los radiólogos intervencionistas, fabricándose en acero expandible (Song *et al.*, 1993), polietileno (Song *et al.*, 1994), poliuretano (Song *et al.*, 1995), nitinol (una aleación de níquel y titanio, con memoria térmica) (Ko *et al.*, 2003) e hidrogel acrílico (Goldberg *et al.*, 2008). Los *stents* de acero resultaron muy poco efectivos, consiguiendo solamente una tasa de permeabilidad a medio plazo de un 25% (Asencio Durán *et al.*, 2004). Con materiales plásticos o con nitinol se alcanzaba un éxito inicial de un 70% pero posteriormente tendían a ocluirse (Ko *et al.*, 2003). Una ventaja de los *stents* fabricados en poliuretano era que su retirada resultaba más fácil, hecho importante, ya que con este tipo de implantes era habitual que los pacientes tuvieran molestias o infecciones (Lunardelli *et al.*, 2008), por lo que en la práctica los cirujanos oculoplásticos han desistido de este tipo de ortesis.

Por el contrario, los ***stents* de paso periférico** de la lágrima gozan de gran uso. Consisten en un hilo cilíndrico de silicona de 1-2 mm de grosor y varios centímetros de longitud, que se coloca desde los puntos lagrimales hasta la fosa nasal, pasando la lágrima entre la silicona y la mucosa de la vía lagrimal. Este material artificial se emplea para favorecer que las cirugías realizadas en la vía lagrimal se mantengan permeables al evitar la cicatrización entre sí de las paredes mucosas, especialmente en sus tramos más estrechos, como son los canalículos lagrimales y la unión del canalículo

común con el saco lagrimal. Por tanto, este tipo de *stents* no expanden las paredes de la vía lagrimal, sino que sólo evitan el contacto entre sí, es decir, lo que realmente realizan es una intubación o tutorización de la vía lagrimal, por lo que habitualmente se denominan “intubaciones”. Aunque inicialmente se emplearon fabricadas en polietileno (Griffith, 1963), posteriormente se emplearon en silicona (Gibbs, 1967) que son las utilizadas actualmente. Estas intubaciones pueden ser bicanaliculares o monocaniculares.

Las intubaciones bicanaliculares, tras pasar un extremo por el canalículo superior y el otro por el inferior, se fijan anudando ambos extremos en la fosa nasal (Griffith, 1963). Las intubaciones monocaniculares (Monoka®, Mini-Monoka®) presentan una dilatación en forma de reloj de arena en un extremo, de manera que éste queda fijado en el punto lagrimal.

Aunque se ha descrito la posibilidad de originar granulomas en la vía lagrimal por el contacto prolongado de la silicona con la mucosa nasal (Allen y Berlin, 1989), su uso se considera necesario para alcanzar una tasa elevada de éxito en las cirugías de la vía lagrimal en las que se produzca una laceración intencionada o accidental de los canalículos (Liang *et al.*, 2012). Aunque estos dispositivos pueden mantenerse de forma prolongada en la vía lagrimal, están pensados para ser retirados unas semanas o meses después de la cirugía (Mehrotra y Rai, 1975), ya que se han realizado estudios de microscopía electrónica que demuestran la presencia de agregaciones bacterianas sobre la superficie de silicona de estas intubaciones (Figura 12), pudiendo relacionarse con un aumento de la secreción mucosa, hiperemia e irritación en la zona del canto interno palpebral en los pacientes portadores de estas intubaciones (Parsa *et al.*, 2010).

Tapones lagrimales: Estos pequeños dispositivos permiten ocluir el punto lagrimal en pacientes con ojo seco, aumentando la cantidad de lágrima disponible al disminuir su drenado (Figura 13). Tienen forma de reloj de arena, de unos 0,4 mm de grosor mínimo por unos 2 mm de longitud máxima, lo que permite que queden sujetos en el esfínter del punto lagrimal. La ventaja de emplear tapones lagrimales frente a la cirugía (termocoagulación o electrocauterización del punto) es la reversibilidad de la técnica (McCabe, 2009): los tapones pueden ser fácilmente retirados en el caso de que provoquen lagrimeo, también denominado epífora.

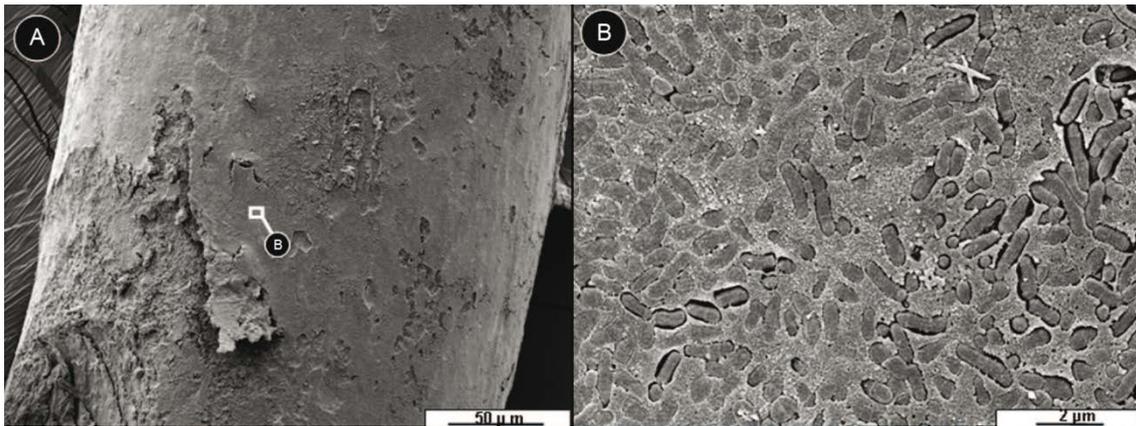


Figura 12. A. Imagen de microscopía electrónica de una intubación bicanalicular de silicona, retirada a las 5 semanas de su implantación: se observa el aspecto rugoso de la superficie con material adherido a la misma. B. Ampliación del cuadro señalado en la figura 12A: se observan formas coco-bacilares embebidas en una matriz extracelular. (Modificada de Parsa *et al.*, 2010).

El uso de tapones lagrimales fue descrito por primera vez por Freeman en 1975 (Piccone, 2000). A finales de 1970 ya se fabricaban en silicona (Adams, 1978), y aunque posteriormente se probó con otros materiales no reabsorbibles como polietileno, polimetilmetacrilato, cianoacrilato (Hirai *et al.*, 2012), teflón (Kompella *et al.*, 2010), o hidrogel acrílico termosensible, actualmente la silicona es el material más empleado.



Figura 13. Tapón lagrimal de silicona en su aplicador, previo a la introducción del mismo en el punto lagrimal (Tomada de McCabe, 2009).

Como complicaciones, pueden producirse extrusiones (pérdida del implante por salida del mismo), migraciones (desplazamiento del dispositivo hacia el interior corporal, en este caso siguiendo la vía lagrimal), granulomas, infecciones e incluso se ha descrito la necrosis aséptica del tejido palpebral circundante (Mukherji *et al.*, 2008).

Aunque la extrusión es la complicación más común (aproximadamente un 30% al año del implante) (Kaido *et al.*, 2013), la migración se asocia con la obstrucción e infección de la vía lagrimal en forma de canaliculitis o dacriocistitis (Rumelt *et al.*, 1997), siendo preciso retirar el tapón lagrimal. Dado su pequeño tamaño, la ecografía (Hurwitz *et al.*, 2004) y la dacrioendoscopia (Takahashi *et al.*, 2013) resultan útiles para localizar el tapón lagrimal migrado. Las migraciones y sus consecuencias pueden disminuirse empleando tapones reabsorbibles por lo que se han fabricado tapones en colágeno, gelatina, catgut, hidroxipropil-metil-celulosa (Hirai *et al.*, 2012), policaprolactona, polidioxanona (Kompella *et al.*, 2010), siendo el colágeno el material reabsorbible más empleado en la actualidad.

Dado que estos dispositivos están en contacto con la flora conjuntival es frecuente la adhesión y colonización de los mismos por los microorganismos que la componen, llegándose a encontrar comunidades microbianas (Figura 14) en forma de biofilm (ver apartado 4 de Introducción) en el 53% de los tapones estudiados (Sugita *et al.*, 2001). De estos agregados se han aislado diferentes microorganismos como: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* (Sugita *et al.*, 2001), *Actinomyces odontolyticus* (Takemura *et al.*, 2002), *Staphylococcus haemolyticus*, *Candida tropicalis* (Yokoi *et al.*, 2000) y *Aspergillus fumigatus* (Tabbara, 2007).

La importancia de la formación del biofilm sobre los tapones lagrimales radica en que éste se ha relacionado con provocar conjuntivitis (Yokoi *et al.*, 2000). Además, la adhesión de los microorganismos depende del material protésico y de la forma del tapón. Así, se ha estudiado *in vitro* la diferencia en la adhesión entre los tapones lagrimales fabricados en silicona y en colágeno, apreciando una adhesión del *S. epidermidis* a los 5 minutos significativamente mayor al colágeno que a la silicona (John *et al.*, 2001). Respecto a la forma, la zona con mayor formación de biofilm corresponde con el orificio del tapón donde se inserta el vástago del aplicador (Tabbara, 2007).

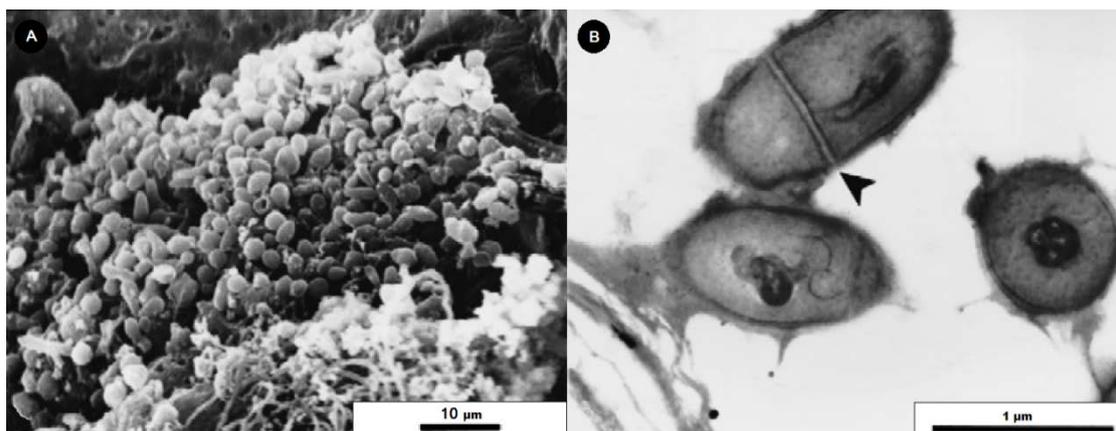


Figura 14. A. Micrografía electrónica de barrido mostrando el biofilm sobre tapón lagrimal: se observa una densa colonia de bacterias coco-bacilares sobre una superficie irregular de material extracelular. B. Micrografía electrónica de transmisión mostrando bacterias del biofilm sobre tapón lagrimal: se observa la división de una de las bacterias (flecha) y la densa matriz extracelular íntimamente asociada a la pared bacteriana. (Modificada de Sugita *et al.*, 2001).

Esta es la razón por la que algunos tapones, como por ejemplo los perforados o *stents* de punto lagrimal (pensados para abrir el punto lagrimal y disminuir la epífora en pacientes con estenosis del punto lagrimal) se fabrican en silicona recubierta de polivinilpirrolidona que hace que la superficie sea menos adherente (Bohlman, 2003).

Tubos de conjuntivorrinostomía: Este tipo de prótesis permite resolver la epífora en aquellos pacientes que presentan una obstrucción severa y proximal de los canalículos, al establecer una comunicación directa entre el fondo del saco conjuntival y la fosa nasal (Figura 15). Esta técnica, denominada conjuntivodacriocistorrinostomía fue propuesta por Jones en 1962 empleando un tubo recto de vidrio Pyrex® (Jones, 1962) que hasta la actualidad ha sido el material más empleado, sufriendo tan sólo algunas pequeñas modificaciones en su forma: recta o angulada (Mombaerts y Colla, 2007), rugosidad (Dailey y Tower, 2005) o grosor (Gladstone y Putterman, 1985). Actualmente, esta técnica se realiza con visión endoscópica nasal, sin necesidad de realizar el paso intermedio a través del saco lagrimal, por lo que se denomina más propiamente conjuntivorrinostomía.

Se ha intentado fabricar tubos de conjuntivorrinostomía con otros materiales como silicona (Carroll y Beyer, 1973), hidrogel hidrofílico (Busse, 1982) o tubos de cristal recubiertos de PPAD (Fan *et al.*, 2008), aunque el material que mejores resultados sigue alcanzando es el vidrio de borosilicato (Pyrex®).

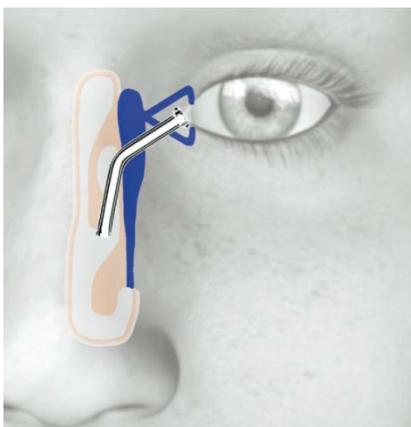


Figura 15. Esquema de la colocación de un tubo de Jones, en este caso angulado. Este tipo de prótesis permite restablecer el paso de la lágrima al crear una comunicación directa o *bypass* desde el fondo de saco conjuntival, a nivel de la carúncula, hasta la fosa nasal. (Tomada de Mombaerts y Colla, 2007).

Pese a que este tipo de prótesis permite resolver la epífora en más de un 95% de los casos (Sekhar *et al.*, 1991), su tasa de complicaciones es también muy elevada: más del 50% de los pacientes presentarán algún tipo de complicación (Lim *et al.*, 2004), siendo las más frecuentes el desplazamiento del tubo, su obstrucción y la formación de granulomas conjuntivales (Mombaerts y Colla, 2007).

La infección del tejido adyacente al tubo también es frecuente (un 5,8 % según Sekhar *et al.*, 1991), dado que este tipo de prótesis está pensada para mantenerse de forma permanente y, además, está en contacto continuo con la lágrima y la flora conjuntival, lo que favorece la formación de biofilms bacterianos. La aparición de secreción, hiperemia y dolor, datos clásicos de infección, se han relacionado con la formación de biofilms sobre la cara externa del tubo (Figura 16) (Parsa *et al.*, 2010).

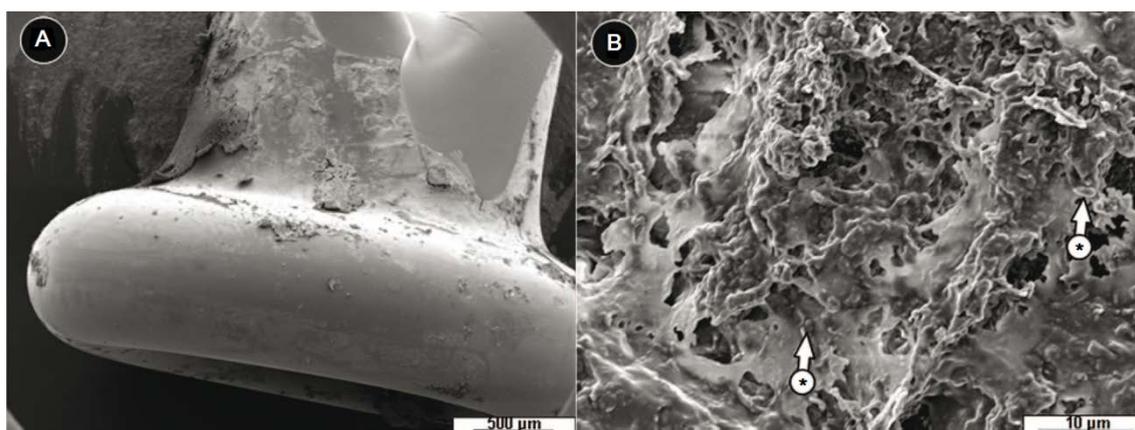


Figura 16. A. Micrografía electrónica de barrido de un tubo de Jones retirado de un paciente con signos de infección. Se observa material amorfo en la cara externa del tubo. B. Micrografía electrónica de barrido estudiando el material amorfo, en el que se pueden encontrar formas bacterianas coco-bacilares (flechas con asterisco) embebidas en una matriz extracelular polimérica. (Modificada de Parsa *et al.*, 2010).

Además, la comunicación directa de la conjuntiva con la fosa nasal a través del tubo hace que exista un flujo retrógrado de bacterias, observándose que la flora conjuntival se modifica, siendo más similar a la flora nasal (Can *et al.*, 1998).

2.3.3. Prótesis de globo ocular

Desde la antigüedad se ha considerado a los ojos como una parte del cuerpo relacionada con el alma, la magia y el destino. La pérdida de un ojo suponía y supone una alteración muy importante del rostro, con una repercusión social y psicológica muchas veces superior a la merma funcional, si se conserva una visión adecuada en el ojo contrario. Para disminuir esta alteración estética se han desarrollado múltiples tipos de ojos artificiales con diversos materiales.

Prótesis oculares: El descubrimiento arqueológico del grupo de Sajjadi en 2007 de un ojo protésico de casi 5.000 años de antigüedad, ha retrasado la datación de las prótesis oculares cientos de años respecto a los conocimientos previos (Figura 17).



Figura 17. Prótesis ocular hallada en la órbita izquierda del cráneo de una mujer en la excavación de Shahr-i-Sokhta (Irán). Es el ojo artificial más antiguo descubierto. (Modificada de Sajjadi *et al.*, 2008).

Este singular ojo artificial, fabricado con brea seca y cubierto de filamentos de oro, presenta dos perforaciones que permitían el paso de cintas para sujetarlo a la cabeza (Figura 5). La marca que estas ligaduras dejaron en los huesos de la órbita ha permitido deducir que era empleado de forma muy prolongada, seguramente a diario, por su

portadora: una mujer de gran talla (se ha calculado que medía unos 180 cm de altura) y que probablemente era una sacerdotisa o adivina. Los arqueólogos creen que la finalidad de este objeto era conseguir un aspecto sobrenatural, más que imitar a un ojo sano. Además, el estudio de las lesiones óseas ha permitido averiguar que esta mujer sufrió un absceso en el párpado, seguramente por el roce constante del ojo protésico.

Este hallazgo ha sido revolucionario por su datación y por el hecho de que fuera un ojo artificial usado en vida, ya que hasta ahora se conocían los ojos artificiales fabricados en la antigüedad por egipcios y griegos, pero a fin de decorar las momias o las estatuas. Parece que los romanos fabricaban ojos artificiales de arcilla que se fijaban a una tela para poder ajustarlos a la cabeza de la persona (Roman, 1994), aunque el empleo de prótesis oculares no está bien documentado hasta el siglo XVI de nuestra era, en la que el cirujano francés Ambroise Paré (1510-1590) diseñó varios prototipos para fijar un ojo artificial a la cavidad orbitaria, bien por encima de los párpados (prótesis denominada *Echlepharo*) (Figura 18) o bien por debajo de los párpados (*Hypoblepharo*). La prótesis *Hypoblepharo* consistía en una cascarilla de oro o plata con el dibujo de la esclerótica y el iris en esmalte (Trester, 2010).

Estas prótesis de metal esmaltado, aunque duraderas, eran mal toleradas por los tejidos de la órbita, por lo que a finales del siglo XVI se comenzó a experimentar con otros materiales. En Venecia se hicieron los primeros ojos de cristal en 1619 con una técnica propia que permaneció secreta durante más de un siglo. Estos primeros ojos de vidrio se realizaban mediante cristal moldeado y a medida del paciente, aunque resultaban toscos, poco confortables y muy frágiles (Guyton, 1948).

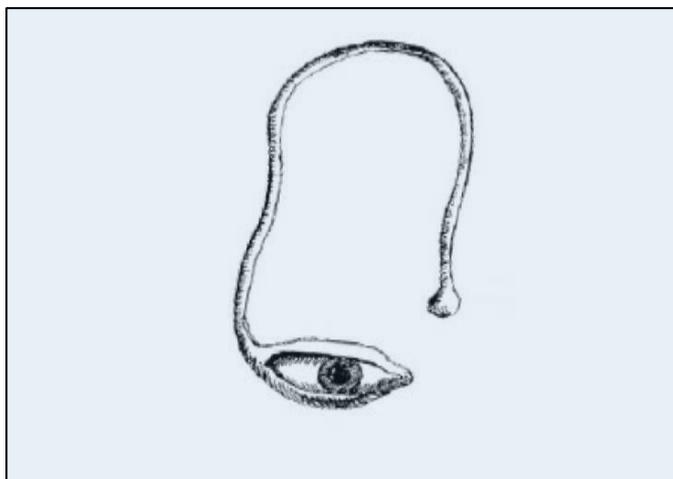


Figura 18. Diseño de prótesis ocular *Echlepharo* de Ambroise Paré. (Modificada de Trester, 2010).

A partir de 1740 se comenzaron a realizar ojos de cristal soplado en Francia. Las prótesis oculares realizadas en cristal soplado tenían una superficie mucho más suave que las de cristal moldeado y carecían de bordes afilados, lo que las hacía mucho más cómodas. Además, el vidrio es un material relativamente inerte para los tejidos, por lo que provocaban menos secreciones que las prótesis de metal esmaltado. Esto hizo que las prótesis de cristal soplado se impusieran a sus predecesoras existiendo una notable industria de producción en Francia durante los siglos XVIII y XIX. Los sopladores de vidrio especializados en realizar prótesis oculares empezaron a ser conocidos: Hazard-Mirault, Rho, M. Auzon Carré, Gaucher, Desjardin, y, sin duda, el más importante, Auguste Boissonneau (Trester, 2010).

Auguste Boissonneau (1802 - 1883) se le considera padre de la **“ocularística”** término que el mismo acuñó para referirse a la ciencia de fabricar ojos artificiales. También propuso el término **“ocularista”** para referirse al fabricante de prótesis oculares, que ha tenido una gran aceptación y se emplea con normalidad entre oftalmólogos y protésicos oculares. Boissonneau marcaba diferencias respecto a otros vidrieros: visitaba a sus pacientes, tenía conocimientos médicos, estudiaba las peculiaridades anatómicas de cada individuo, y buscaba un ajuste y manufactura individualizada (Trester, 2010).

En la segunda mitad del siglo XIX, Ludwig Muller Uri, un soplador de vidrio alemán, modificó la técnica francesa de fabricación de prótesis oculares, consiguiendo ojos artificiales más naturales y hermosos al diseñar un nuevo método para recrear el iris. Uri en principio fabricaba estas piezas para los ojos de muñecas, pero posteriormente los oftalmólogos alemanes empezaron a solicitar sus servicios para los pacientes. Su calidad, superior a los ojos protésicos franceses, hizo que el centro mundial de producción se moviera de París a Alemania (Smit *et al.*, 1991).

Los ojos de cristal tenían una forma de cascarilla fina, y los bordes, aunque redondeados, podían resultar incómodos para los pacientes. El oftalmólogo danés Hermann Snellen diseñó un nuevo concepto de prótesis ocular, el llamado **“ojo reformado”** (*Reform-auge*). Estas prótesis consistían en dos cascarillas de cristal que se soldaban, quedando un espacio hueco en su interior, y unos bordes más suaves y redondeados. La cascarilla posterior se adaptaba a la forma de la cavidad orbitaria, mientras que la cascarilla anterior imitaba el aspecto de un ojo sano (Knauer y Schlüter,

2010). Este diseño tenía dos grandes ventajas: los bordes más redondeados resultaban mucho más cómodos y la prótesis podía tener el grosor que fuera necesario para rellenar la cavidad orbitaria (Figura 19).

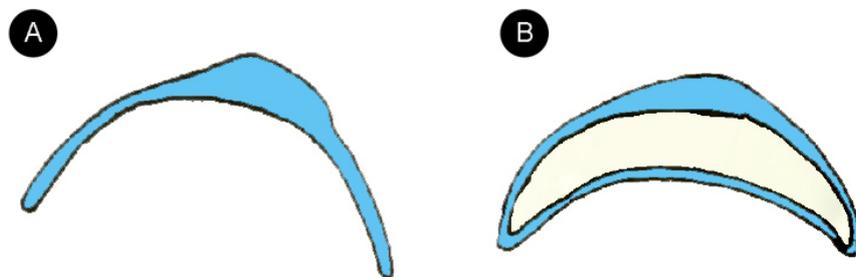


Figura 19. A. Esquema del perfil de un ojo de cristal convencional. B. Perfil de un ojo de Snellen o *reform-augen*. (Modificado de Weidler, 1917).

En 1898, bajo la dirección de Snellen, los hermanos Muller, vidrieros de Wiesbaden, comenzaron a fabricar este nuevo tipo de prótesis oculares, generalizándose su uso entre la población a partir de la I Guerra Mundial. Existían colecciones de ojos de cristal, creados por los artesanos vidrieros y se seleccionaba la pieza que mejor se adaptaba al paciente, siendo rara la manufactura personalizada (Guyton, 1948). La principal desventaja del *reform-augen* residía en su fragilidad: el vacío relativo del interior de las prótesis de cristal con dos cascarillas (aproximadamente la mitad de la presión atmosférica) hacía que pudieran implosionar de forma espontánea, habiéndose descrito varios casos (Weidler, 1917). Además, la superficie del cristal era erosionada por el efecto químico de la lágrima y las secreciones conjuntivales haciendo que la prótesis se volviera rugosa: una prótesis de cristal con plomo tenía una duración de entre 9 meses y 2 años, mientras que una prótesis de cristal con carbonato de sodio podía durar algo más, aunque este tipo de cristal era más frágil (Wardman, 1944).

Durante la II Guerra Mundial el suministro de ojos de cristal se vio bruscamente interrumpido, ya que de forma casi exclusiva se fabricaban en Alemania. Además, el incremento del número de pacientes anoftálmicos por el conflicto bélico, hacía necesario un método rápido, barato y sencillo de conseguir prótesis oculares. El desarrollo de materiales plásticos en el campo de la odontología, hizo que se comenzaran a fabricar en los Estados Unidos de América prótesis oculares con resina acrílica polimerizada (Figura 20) (Smit *et al.*, 1991).

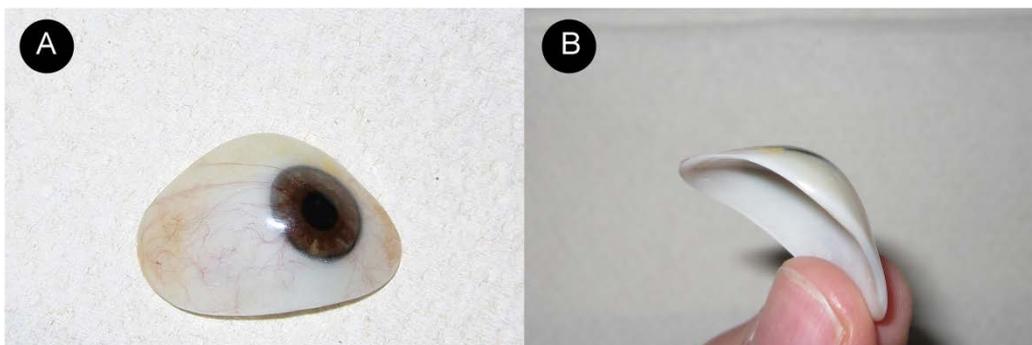


Figura 20. Prótesis ocular actual fabricada con polimetilmetacrilato (PMMA) tras la polimerización de la resina acrílica. A. Vista frontal. B. Vista de perfil. (Colección particular del autor).

Este material plástico presenta varias ventajas sobre el cristal: tiene un peso mucho menor, la fabricación personalizada resulta más económica y sencilla, ya que no es necesario un artesano vidriero, y además su duración es mucho mayor que el cristal. La resina acrílica se polimeriza en forma de PMMA, siendo prácticamente impermeable al agua, muy resistente a los golpes y muy ligera. Su resistencia a la erosión por los fluidos lagrimales es considerablemente mayor que el cristal, siendo necesario recambiarlas a los 7 u 8 años de media (Nerad, 2010). No obstante, el PMMA tiene algunas desventajas, como ser potencialmente alergénico, tener características hidrofóbicas y ser relativamente blando, respecto al cristal (Smit *et al.*, 1991). Pese a todo, sus inconvenientes son ampliamente superados por sus ventajas, por lo que hoy en día prácticamente todas las prótesis oculares se fabrican con este material acrílico.

Prótesis esclerales: Son prácticamente idénticas a las prótesis oculares, con la única diferencia de que están diseñadas para ser empleadas en pacientes que conservan su ojo, aunque sin visión y con mal aspecto estético (Figura 21). Actualmente se fabrican con el mismo material acrílico y sólo tienen como peculiaridad que su grosor debe ser lo más delgado posible.



Figura 21. A. Paciente con ojo derecho ciego y antiestético tras un traumatismo. B. Mismo paciente con su prótesis escleral sobre ojo derecho. (Colección particular del autor).

2.3.4. Prótesis de relleno orbitario

Karesh en 1998 estableció dos tipos de implantes o prótesis orbitarias: intraconales (para referirse a los implantes orbitarios propiamente) y extraconales (para referirse a los implantes colocados por debajo del periostio y dirigidos bien a aportar volumen o bien a reparar las fracturas de las paredes orbitarias) (Karesh, 1998). Consideramos que esta clasificación es confusa, ya que el espacio extraconal se halla entre el cono muscular y el periostio y, por tanto, no coincide exactamente con el espacio subperióstico. Otra clasificación propuesta diferencia entre implantes orbitarios esféricos, los empleados en las cavidades anoftálmicas, e implantes orbitarios reconstructivos, para referirse a las láminas y material de osteosíntesis empleado en la reparación de fracturas (Ainbinder *et al.*, 1998). Esta clasificación también es incompleta ya que nuevos dispositivos, como las esferas autoexpandibles, no tendrían cabida.

Así pues, preferimos clasificar las prótesis orbitarias por su función en vez de por su localización, pudiendo distinguir dos grandes grupos de prótesis orbitarias: las prótesis de relleno orbitario (implantes orbitarios, esferas autoexpandibles y cuñas subperiósticas) que permiten reponer el volumen perdido por atrofia o eliminación de tejidos orbitarios, y las prótesis para reparar o sustituir los huesos que componen las paredes orbitarias.

Implantes orbitarios: Permiten aportar volumen a una órbita en la que se ha eliminado el globo ocular de forma completa (enucleación ocular) o sólo su contenido respetando la esclerótica (evisceración ocular) (Figura 22). En ambos casos se produce una pérdida de volumen de unos 6-8 mL (Troyano y Romo, 2009), que deben ser repuestos con la finalidad de emplear una prótesis ocular delgada y ligera, evitar el aspecto de ojo hundido o enoftalmos, y en definitiva mejorar el aspecto estético del paciente.

La primera cirugía con implante orbitario fue publicada por Mules en 1885, utilizando una esfera hueca de cristal (Sami y Young, 2010). Este tipo de esferas enterradas, tenían como principal complicación la exposición (pérdida del tejido blando de recubrimiento), que al avanzar terminaba en la extrusión (expulsión del implante).

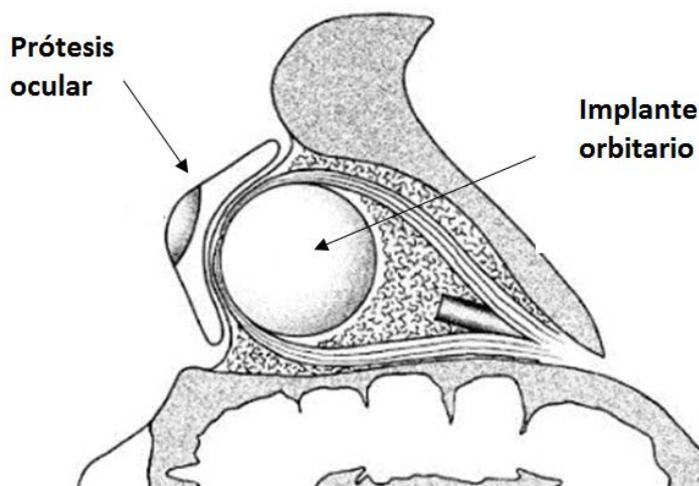


Figura 22. Dibujo que representa la posición de un implante orbitario tras enucleación ocular. Este tipo de prótesis interna sustituye el volumen ocupado por el globo ocular. (Modificado de Ainbinder *et al.*, 1998).

También podía producirse la migración o desplazamiento del implante hacia el suelo orbitario, y además al ser de vidrio, podía estallar de forma espontánea por un cambio brusco de temperatura. Fox, en 1902, creyendo que la reacción de los tejidos que rodeaban al implante era la causa de la extrusión propuso un material alternativo, la esfera hueca de oro, aparentemente menos reactiva (Prat, 2002a). Las esferas de oro, no resultaron mejores que las de cristal, por lo que a principios del siglo XX se probó con una gran variedad de materiales: orgánicos de origen animal como cartílago, grasa, fascia lata, hueso, marfil, ojos de animales, catgut o seda; de origen vegetal como algodón o agar; o de origen industrial como vaselina, goma o parafina; y también materiales inorgánicos como minerales (asbesto) o metales: plata, platino, aluminio, o vitalio (aleación con un 65% de cobalto, 25% de cromo, 6% de molibdeno y otros metales como hierro o níquel) (Moshfeghi *et al.*, 2000). La mayoría de estos materiales provocaban una gran reacción inflamatoria de los tejidos con las consiguientes complicaciones, por lo que los más empleados en torno a 1940, eran, por orden: hueso carbonizado, marfil, hueso descalcificado, cartílago y cristal (Prat, 2002a).

En 1941, se implantó por primera vez una esfera maciza de PMMA (Berens, 1941), reduciéndose la incidencia de exposiciones de forma significativa. Posteriormente, se ideó un implante orbitario de este material con unos pequeños orificios a través de los cuales se pasaban unas suturas para fijar los músculos

extraoculares al implante, consiguiendo una excelente movilidad. El PMMA comenzó a ser el material preferido y a combinarse con otros materiales para conseguir una mejor fijación de los músculos, del implante, y de la prótesis ocular. Se emplearon mallas de tantalio (Ruederman, 1945), anillos de oro (Cutler, 1949), varillas de oro (Arruga, 1954), etc. Estos implantes combinados eran prótesis parcialmente internas, es decir, la cara anterior del implante estaba expuesta, para poder fijar la prótesis ocular de manera mecánica. Al estar en contacto con las secreciones lagrimales se infectaban con frecuencia, terminando con la extrusión, por lo que se volvió a los implantes enterrados (esferas de cristal, de PMMA u ovillos de nailon), pero con algunas modificaciones.

Como ejemplos de implantes acrílicos modificados podemos citar el implante de Allen, de 1950, fabricado en PMMA pero con 4 grandes túneles para fijar los músculos extraoculares rectos; el implante Iowa, también diseñado por Allen, en el que los túneles se transforman en 4 montículos que además de fijar los músculos permitían una mejor movilización de la prótesis ocular; o los ingeniosos implantes magnéticos, de los que se hicieron diferentes versiones. En el implante magnético de Troutman, el diseño se basa en un implante acrílico enterrado pero con un imán justo debajo de la cara anterior del implante, que se une a otro imán de signo contrario, situado en la cara posterior de la prótesis ocular, a fin de mejorar la movilidad de la misma (Troutman, 1954). Sin embargo, la movilidad obtenida no era del todo satisfactoria, ya que la prótesis saltaba en las miradas extremas y el cizallamiento de la conjuntiva favorecía su necrosis y la exposición del implante (Sami y Young, 2010).

En la década de 1960 se comenzaron a utilizar esferas de silicona, con buenos resultados, siendo los implantes más utilizados en EEUU, hasta la aparición en 1989 de los implantes de hidroxiapatita, un material poroso (Hornblass *et al.*, 1995).

Los implantes porosos permiten el crecimiento fibrovascular a su través lo que supone una gran ventaja al conseguir una mayor fijación de los músculos y del propio implante, consiguiendo una disminución de la tasa de extrusiones, migraciones e infecciones (Moshfeghi *et al.*, 2000). Los implantes porosos, empleados con anterioridad a la hidroxiapatita, presentaban complicaciones: así, el hueso carbonizado resultaba en general antigénico, y los polímeros fluorocarbonados porosos (PFCP) dejaron de utilizarse por permitir una mala vascularización (Prat, 2002a).

La hidroxiapatita se obtiene de un tipo de coral, que tras un tratamiento físico-químico resulta un material biocompatible, poroso y que permite el crecimiento fibrovascular en su interior (Figura 23A). Es uno de los mejores materiales para los implantes orbitarios aunque su precio es elevado (más de 700 euros por unidad).

A pesar de que los implantes de hidroxiapatita se integraban muy bien, no se encontraron diferencias en la motilidad de la prótesis ocular respecto a los implantes de silicona (González-Candial *et al.*, 2007), por lo que nuevamente se intentaron colocar vástagos en el implante orbitario, una vez vascularizado, que conectaran con la prótesis ocular, pero, nuevamente, se observó un incremento en el número de exposiciones e infecciones, por lo que en la actualidad se emplean mayoritariamente implantes integrados (porosos) pero sin vástagos (Viswanathan *et al.*, 2007).

En 1998, la empresa francesa FCI, desarrolló una hidroxiapatita sintética, que aunque presenta algunas diferencias en la uniformidad de los poros y su dureza (es más blanda que la coralina) permite un buen crecimiento fibrovascular y su coste es algo inferior a la hidroxiapatita de origen natural.

En 1994 se comenzó a utilizar un nuevo material poroso el PPAD, que tiene como ventajas: su menor precio respecto a la hidroxiapatita (unos 400 euros por unidad), su mayor dureza (lo que facilita su introducción en la cirugía) y la diversidad de formas en las que se fabrica (esférico, ovoide, cónico o con forma de molar con 4 cúspides). Las variaciones en cuanto a la forma se han realizado con la intención de adaptarse mejor a la órbita en pacientes enucleados (ovoide o cónica) respecto a los eviscerados (esférica) o para mejorar la movilidad de la prótesis ocular (4 cúspides), aunque esta última no se ha mostrado especialmente eficaz en su objetivo (Lucci *et al.*, 2007) (Figuras 23C y 23D).

Desde el año 2000 se está utilizando alúmina porosa, que es una cerámica de óxido de aluminio, y que se emplea en odontología desde 1972 (Figura 23B). Tiene unos resultados similares a la hidroxiapatita y al PPAD, y su precio es similar a la hidroxiapatita (Prat, 2002a).

Se ha intentado desarrollar implantes porosos en otros materiales como el combinado de ePTFE con etilpropileno fluorado, el poli-hidroximetil-metacrilato que es

un implante poroso blando, al igual que el todavía experimental implante de silicona porosa (Son *et al.*, 2012).

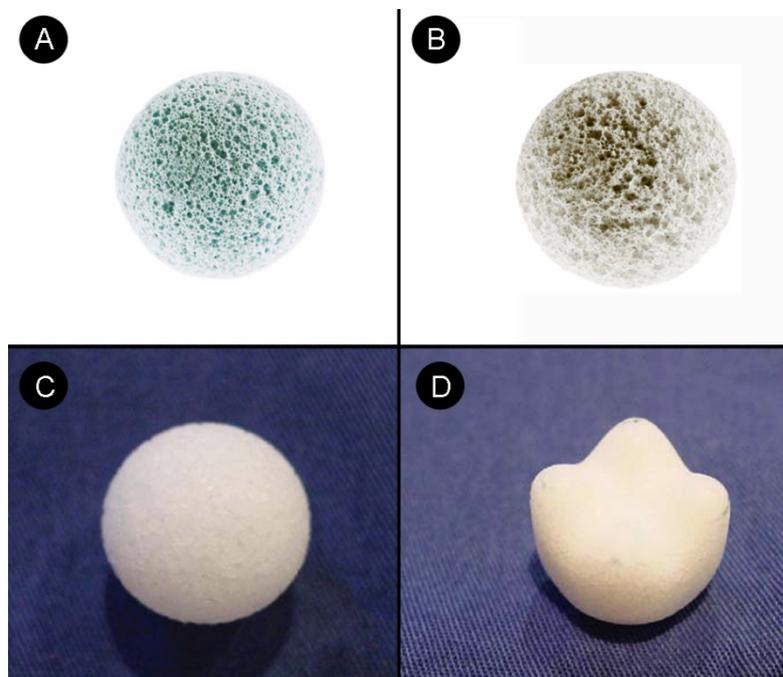


Figura 23. A. Implante orbitario esférico de hidroxiapatita. B. Implante esférico de alúmina: obsérvese la similitud de su aspecto poroso con respecto a la hidroxiapatita. C. Implante orbitario esférico de PPAD. D. Implante orbitario de PPAD de 4 cúspides (Quad®). (Modificado de Lucci *et al.*, 2007).

Además de estos nuevos materiales, hay que tener en cuenta que los implantes porosos deben ser recubiertos o enfundados para facilitar la adhesión de los músculos y evitar que erosionen el tejido supra-yacente, para lo cual se emplea la esclerótica del paciente en el caso de las evisceraciones (colgajos esclerales con al menos un músculo extraocular asociado), y en el caso de las enucleaciones: esclerótica de banco, tejidos autólogos como fascia temporal, fascia lata, dermis, pericardio, complejo muscular auricular o periostio; o mallas sintéticas de poligalactin (Vicryl®), de ePTFE (Goretex®) o de poliéster (Mersilene®) (Viswanathan *et al.*, 2007).

Pese a las grandes ventajas que aportaron los implantes integrados en su día, se piensa que las modificaciones en las técnicas quirúrgicas han sido determinantes para que en la actualidad se produzcan, independientemente del tipo de material, menos necrosis del tejido de recubrimiento del implante (exposiciones). De hecho, hoy en día se considera que se producen menos exposiciones en los pacientes enucleados con los implantes no porosos (acrílicos, silicona o cristal) que con los porosos, observándose

una tasa de exposición del 10% para implantes porosos frente al 1% en implantes no porosos (Nunery *et al.*, 1993), lo que unido al menor precio de los implantes no porosos (unos 50 euros por unidad) hace que se esté replanteando su uso (Son *et al.*, 2012).

No obstante, es cierto que la exposición de un implante poroso rara vez acaba en la extrusión o expulsión completa del mismo (Custer *et al.*, 2003), habiéndose establecido un algoritmo de tratamiento de los implantes expuestos en función del tamaño del defecto del tejido de recubrimiento (Tabla 2) (Prada *et al.*, 2002).

Tabla 2. Tipos, causas y tratamientos de la exposición del implante orbitario (Modificada de Prada *et al.*, 2002).

Exposición de implante orbitario poroso		
Tipo de exposición	Causas	Tratamiento
<p>Precoz</p> <p>De 0-4 semanas post-cirugía</p>	<ul style="list-style-type: none"> · Mala técnica quirúrgica · Radioterapia orbitaria previa · Enfermedades sistémicas (Diabetes mellitus, inmunosupresión) · Infección perioperatoria 	<p>Si no existe infección del implante:</p> <p>Actuar según tamaño de exposición:</p> <p>< 3 mm: Observación y antibiótico tópico</p> <p>3-6 mm: Recubrimiento con colgajos de Tenon, injertos de mucosa oral, esclerótica o fascia lata</p> <p>> 6 mm: Recubrimiento con injerto dermograso o pericráneo</p>
<p>Tardía</p> <p>En general, años post-cirugía</p>	<ul style="list-style-type: none"> · Isquemia del polo anterior del implante orbitario por roce o compresión con la prótesis ocular · Isquemia del polo anterior del implante por mala vascularización del mismo 	<p>Si existe infección del implante:</p> <p>Retirar implante y sustituir por:</p> <ul style="list-style-type: none"> a) Injerto dermograso b) Implante no poroso (acrílico, silicona o cristal)

Como se observa en la Tabla 2, en la evaluación de los implantes expuestos, es determinante la existencia o no de infección crónica de los mismos (formación extensa de biofilm bacteriano) que depende a su vez del tiempo de exposición y del tipo de flora conjuntival (Samimi *et al.*, 2013).

La infección crónica del implante provoca la imposibilidad de cierre del defecto tisular, bien espontánea, bien empleando un tejido como parche (Figura 24), siendo necesaria la retirada del implante (Nunery *et al.*, 1993). En implantes expuestos y extraídos se ha determinado la existencia de formación extensa de biofilm a expensas de

cocos Gram positivos, típicos de la flora conjuntival (Samimi *et al.*, 2013). Determinar las condiciones de formación del biofilm, así como la diferencia de adhesión a los distintos tipos de materiales ayudaría a prevenir y manejar de manera más eficaz las exposiciones de los implantes orbitarios.

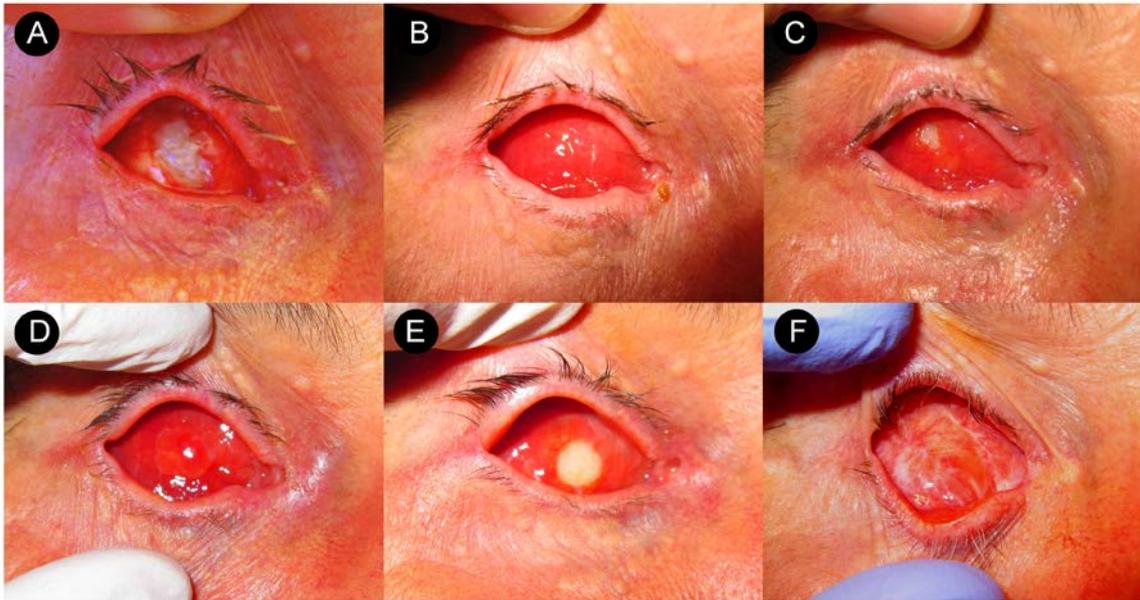


Figura 24. A. Paciente con exposición tardía (15 años después de la cirugía) de implante poroso de PPAD: aunque con abundante secreción conjuntival, sin aspecto de infección del implante. B. Aspecto al mes de realizar un recubrimiento con injerto dermograso y colgajos de Tenon. C. Nueva exposición a los 2 meses de la cirugía de recubrimiento. D. Aspecto al mes de realizar un nuevo recubrimiento con injerto dermograso. E. Nueva exposición con abundante secreción procedente del implante. F. Aspecto 4 años después de retirar el implante poroso infectado, y sustituirlo por un implante de silicona. (Colección particular del autor).

Hidrogeles autoexpandibles: Este tipo de dispositivos se colocan en el espacio intraconal de la órbita, por detrás del implante orbitario, a fin de proyectar éste anteriormente.

En los pacientes anoftálmicos se producen importantes cambios en los tejidos de la órbita, especialmente en la grasa que sufre atrofia y rotación posterior e inferior de la misma. Esto provoca el denominado síndrome post-enucleación caracterizado por: ptosis palpebral, hundimiento del surco palpebral superior, enoftalmos y laxitud del párpado inferior (Prat, 2002b) (Figura 25). Este síndrome es mucho más frecuente en aquellos pacientes que se les extirpa el globo ocular sin colocar implante, o en aquellos

que se les coloca un implante de pequeño tamaño (menor de 18 mm de diámetro), aunque también se puede producir en pacientes con implantes de gran tamaño (22 mm).



Figura 25. Paciente con síndrome post-enucleación en su ojo derecho, pese a portar un implante orbitario de 20 mm de diámetro. Se observa claramente la ptosis palpebral, hundimiento del surco palpebral superior y laxitud del párpado inferior. También presentaba enoftalmos. (Colección particular del autor).

Para corregir este síndrome se ha de reponer el volumen perdido en la órbita, colocando un implante orbitario de forma secundaria en los pacientes que no se les implantó en la cirugía de extirpación ocular, o sustituyendo un implante de pequeño tamaño por otro mayor. En los pacientes con síndrome post-enucleación que tienen un implante de tamaño adecuado (igual o superior a 18 mm), se pueden colocar diferentes materiales en el ápex orbitario, a fin de desplazar anteriormente su implante. Se ha utilizado la inyección de grasa autóloga, hidroxapatita cálcica en gel (Radiesse®) (Vagefi *et al.*, 2011), y recientemente el empleo de materiales autoexpandibles.

Aunque Soll en 1971 ya empleó silicona expandible como implante orbitario (Soll, 1971), el empleo de hidrogel acrílico hidrofílico reticulado (copolímero compuesto de metilmetacrilato y vinilpirrolidona) es más reciente (Bacskulin *et al.*, 2000). Se trata de unas pequeñas esferas, aunque también se comercializan en forma de hemiesferas o cilindros (Figura 26A), que se inyectan a través de un trocar al espacio intraconal, inmediatamente posterior al implante orbitario. Una vez insertadas, se expanden al hidratarse con el fluido de los tejidos (de 7 a 12 veces su volumen inicial), estabilizándose su volumen entre las 12-24 horas *in vitro* (Figura 26B) y entre las 24-48 horas después de la inyección *in vivo* (Schittkowski y Guthoff, 2006). Este tipo de

implantes están indicados también para el tratamiento de alteraciones congénitas como la anoftalmía y la microftalmía.

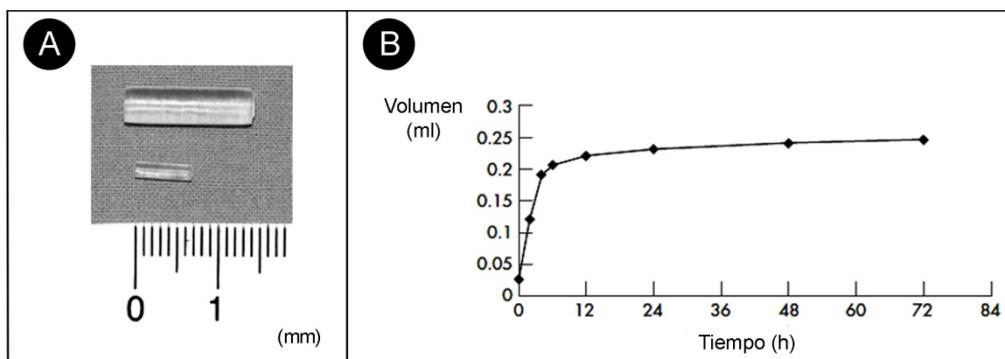


Figura 26. A. Implante autoexpandible de hidrogel hidrofílico con forma cilíndrica. Mediante un mecanismo de ósmosis captura agua, aumentando su volumen desde el tamaño de la parte inferior, al tamaño de la parte superior. Obsérvese la diferencia en la escala en mm. B. Curva de incremento de volumen *in vitro*. (Modificada de Schittkowski y Guthoff, 2006).

Cuñas subperiósticas: Estos dispositivos tienen también la finalidad de corregir el síndrome post-enucleación, aportando volumen a la órbita y desplazando superior y anteriormente el implante orbitario. Están diseñados para ser colocados por debajo del tejido fibroso que recubre los huesos que forman la órbita, denominado periostio orbitario o más comúnmente, periórbita. Además, este tipo de implantes pueden usarse también en pacientes que presentan un déficit de volumen orbitario diferente de la anoftalmía, como un globo ocular de menor tamaño, por tisis, o una atrofia de la grasa orbitaria (Rose *et al.*, 1990).

Los primeros implantes subperiósticos fueron las esferas de silicona sólida unidas con seda, empleadas por White en la década de 1970, que introducía a través de un catéter haciendo un abordaje subperióstico lateral. Posteriormente, Vistnes y Paris en 1977 emplearon silicona RTV (*Room Temperature Vulcanizing silicone*) que es un tipo de silicona líquida que al añadirle un catalizador, se vulcaniza a temperatura ambiente. A través de un abordaje lateral se colocaba un tubo por debajo de la periórbita y se inyectaban 3 mL de silicona RTV, que una vez endurecida se recortaba y enterraba suturando el periostio. Sin embargo este tipo de material dejó de emplearse por su potencial efecto citotóxico (Toledano *et al.*, 2002).

Las cuñas de silicona sólida fueron ampliamente utilizadas durante los años 80 y 90 del pasado siglo (Figura 27). Se colocaban en el suelo de la órbita a través de una

incisión inferolateral o subciliar, reponiendo el volumen orbitario de forma efectiva. No obstante, al no integrarse, era habitual la formación de granulomas, quistes, migración y extrusión, teniéndose que realizar reintervenciones en más del 40% de los pacientes (Rose *et al.*, 1990).



Figura 27. Cuña subperióstica de silicona, tallada de un bloque sólido. (Tomada de Rose *et al.*, 1990).

Para evitar la extrusión de las cuñas, se recurrió a injertos integrables, como el hueso, que se sigue utilizando, con los inconvenientes típicos de los materiales biológicos (ver apartado 1.5 de Introducción).

Desde la aparición en 1994 de implantes orbitarios fabricados con PPAD, se han empleado de diversas formas, entre ellas, cuñas o láminas que se colocan entre el suelo de la órbita y la periórbita a través de un abordaje subciliar o transconjuntival. Al ser un material poroso se vasculariza, integrándose y evitando así la migración. El cierre cuidadoso del periostio y del músculo orbicular disminuyen la posibilidad de exposición de estos implantes (Figura 28).

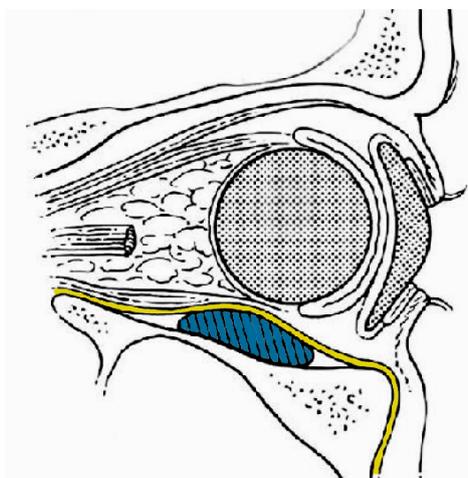


Figura 28. Dibujo que representa la posición de una cuña subperióstica (en azul) y su recubrimiento con periostio-periórbita (en amarillo). (Modificada de Prat, 2002b).

2.3.5. Prótesis de paredes orbitarias

Las prótesis de paredes orbitarias se emplean en las fracturas de los huesos que forman la órbita. Las fracturas orbitarias pueden clasificarse en puras, cuando sólo se afectan las paredes de la órbita; o impuras cuando se afecta el reborde orbitario, como en las fracturas de Le Fort, la fractura en trípode (complejo cigomático-maxilar), o del complejo naso-órbito-etmoidal.

En todos los casos se producirá un aumento de la capacidad de la órbita que provocará un cierto grado de enoftalmos, en función del tamaño de la fractura. Por otra parte una fractura pequeña (especialmente del suelo) puede atrapar un músculo extraocular provocando diplopía.

Para corregir estas situaciones se han desarrollado distintos implantes, que permiten reparar los defectos óseos y fijar los huesos, estabilizando las fracturas. Al igual que las cuñas subperiósticas, este tipo de dispositivos deben colocarse por debajo del periostio.

Las fracturas impuras suelen requerir reparación quirúrgica, ya que se trata de fracturas inestables, que requieren de materiales de osteosíntesis para fijar los distintos huesos en su posición y que cicatricen (Figura 29).

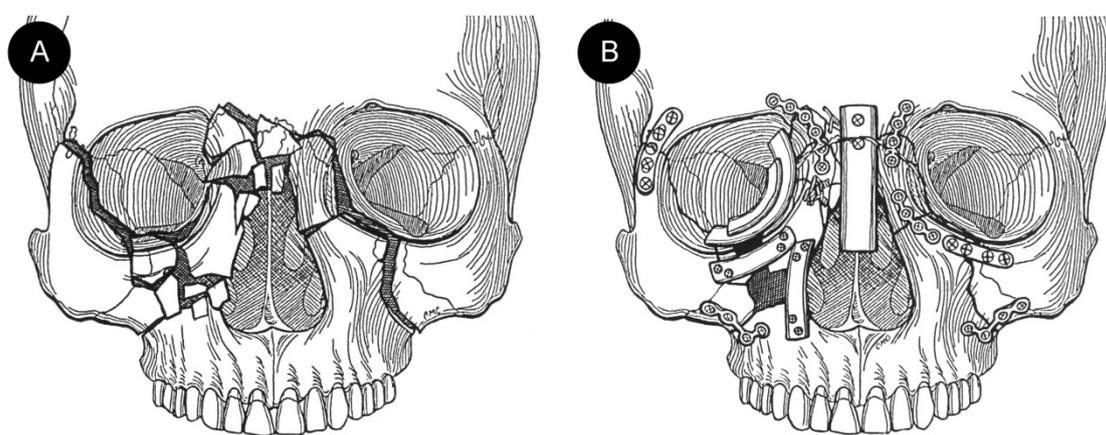


Figura 29. A. Dibujo de fractura impura compleja, Le Fort III en el lado derecho y Le Fort II en el izquierdo. B. Esquema de la reconstrucción de la imagen 29A: fijación con mini-placas y tornillos del reborde orbitario y láminas para la pared ínfero-medial del ojo derecho. Obsérvese que las placas de osteosíntesis deben seguir siempre el principio de colocar al menos dos tornillos a cada extremo de la misma para conseguir una adecuada fijación. (Tomada de Iliff, 1991).

Por el contrario, las fracturas puras sin diplopía ni enoftalmos no suelen requerir tratamiento quirúrgico, ya que al carecer de movimiento los huesos fracturados se soldarán por sí mismos sin necesidad de fijación. No obstante, una fractura de gran tamaño que provoca un cambio en la morfología de la órbita, de cónica a esférica, debe repararse de forma precoz, ya que si no, los cambios fibrosos fijaran el contenido orbitario en una posición anormal que será muy difícil de modificar posteriormente (Iloff, 1991).

Como material de osteosíntesis se emplea fundamentalmente el titanio en forma de placas y tornillos. Para reparar los defectos en las paredes se ha empleado materiales biológicos como el hueso autólogo y de banco, cartílago auricular, y fascia lata o temporal; como materiales aloplásticos reabsorbibles las láminas de polidioxanona (Kontio *et al.*, 2001) o de poli-L-lactida-co-glicólido; y como materiales no reabsorbibles, láminas de silicona, teflón, PFCP (Proplast®: teflón recubierto de una matriz de fibra de carbono), PPAD (Medpor®), mallas de titanio, y mallas de titanio recubiertas de PPAD. Los materiales biológicos presentan el inconveniente de la morbilidad del área donante y la posibilidad de transmisión de patógenos desconocidos. Los materiales reabsorbibles tienen menos opciones de infección o exposición, pero al eliminarse, pueden no corregir el enoftalmos de forma adecuada. Del mismo modo que los implantes orbitarios, las láminas no reabsorbibles pueden exponerse, infectarse y extruirse.

La silicona, como material no poroso, tiende a producir quistes, migrar, exponerse e infectarse, teniendo que ser retirados hasta un 13% de los implantes, la mitad por infección (Morrison *et al.*, 1995).

El titanio en forma de malla (Figura 30A), aunque no se considera un material poroso, sí que permite el crecimiento fibrovascular a través de sus orificios, por lo que presenta un índice de infección y extrusión considerablemente menor que las láminas de silicona. Estudios realizados en pacientes intervenidos de fractura orbitaria con implante de malla de titanio mostraron una tasa media de infección del 4,4% (Potter *et al.*, 2012). No obstante, el titanio tiene otra posible complicación, el llamado síndrome de adherencia orbitaria, que consiste en una fibrosis y adherencia excesiva de los tejidos (periórbita y contenido orbitario) al implante de titanio, provocando diplopía y/o retracción palpebral.

El PPAD es un material poroso, fácil de manejar y que se fabrica en espesores variables (de 0,85 mm en adelante). Además, a fin de evitar el síndrome de adherencia orbitaria, las láminas destinadas a corregir defectos en paredes orbitarias, suelen presentar una cara no porosa que evita la adhesión tisular, mientras que la cara porosa se coloca hacia el defecto óseo con la finalidad de facilitar su integración. En la revisión de Gunarajah y Samman (2013), se observó que de 529 pacientes tratados con láminas de PPAD, sólo 10 presentaron infección (1,9%), respondiendo a tratamiento antibiótico 8 de ellos, por lo que sólo fue necesario retirar el implante en 2 (0,4%). Este comportamiento favorable del PPAD, ha hecho que se fabriquen mallas de titanio recubiertas con PPAD (Figura 30B), siendo de elección en aquellos casos en los que se requiere una mayor estabilidad y fortaleza (Potter *et al.*, 2012).

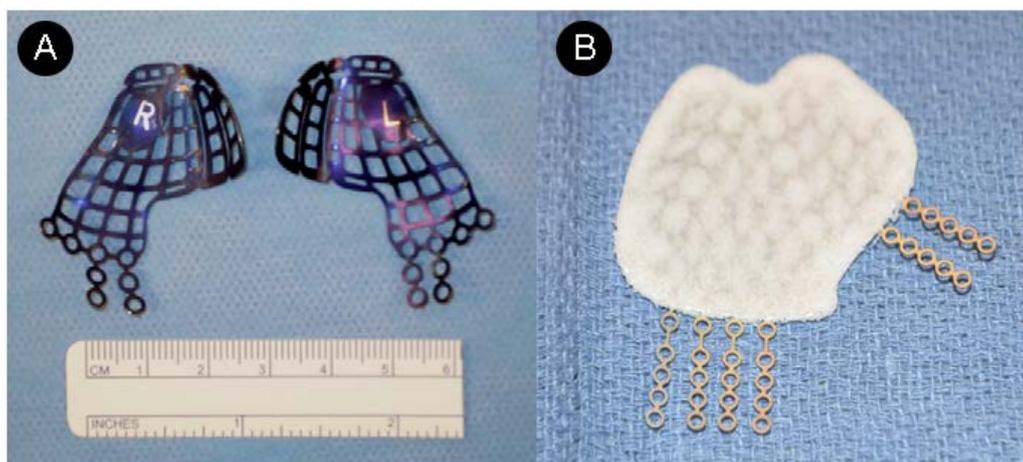


Figura 30. A. Mallas de titanio preformadas para órbita derecha (R) e izquierda (L). B. Lámina de PPAD con esqueleto de malla de titanio. (Modificada de Potter *et al.*, 2012).

En los estudios de Samimi *et al.* (2013), realizados sobre material protésico explantado por presentar signos de infección, se encontraron cultivos positivos así como formación de biofilm tanto en láminas para las paredes como en el material de osteosíntesis (Figura 31). Los gérmenes aislados diferían de los encontrados en los implantes orbitarios, que se correspondían con los propios de la flora conjuntival, observando un predominio en las láminas para las fracturas de suelo, de hongos levaduriformes, probablemente con origen en la mucosa del seno maxilar (Samimi *et al.*, 2013).

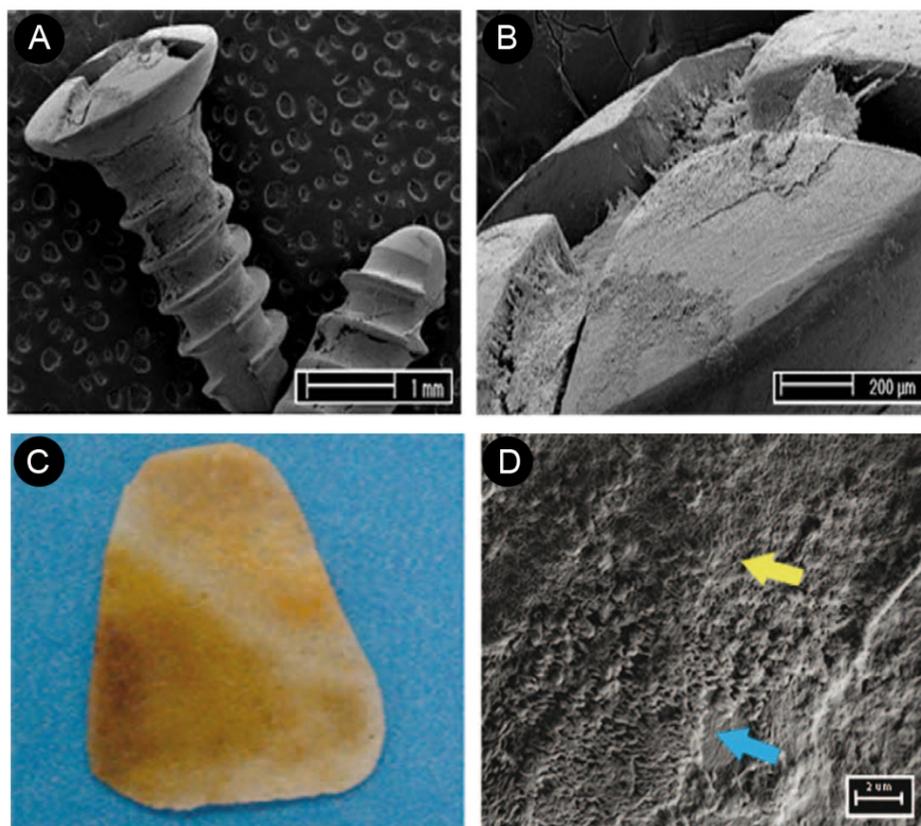


Figura 31. A. Micrografía electrónica de barrido de tornillos de titanio procedentes de una lámina orbitaria de este metal recubierta de PPAD. Fueron extraídos 6 meses después de su implante y produjeron cultivos positivos para *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida parapsilosis*. B. Micrografía de la figura 31A a mayor aumento: organismos y depósitos extracelulares concordantes en tamaño y morfología con levaduras. C. Lámina de suelo orbitario de PPAD infectada con *Mycobacterium chelonae*, *P. aeruginosa* y *Trichosporon spp.* D. Micrografía electrónica de alta resolución de la lámina de la figura 31C mostrando agrupaciones de organismos con morfología bacilar (flecha azul) y sobre estos, hifas (flecha amarilla) correspondientes en tamaño y forma con los resultados de los cultivos. (Modificada de Samimi *et al.*, 2013).

2.4. Materiales empleados en las prótesis oftalmológicas

Como se ha mostrado a lo largo de la Introducción, en oftalmología se utilizan muchas y muy variadas prótesis, en especial en el área periocular. Sin embargo, los materiales empleados en su elaboración son, con frecuencia, comunes entre ellas. Como resumen de todo lo expuesto, podemos diferenciar tres grandes grupos de materiales para fabricar las prótesis oftalmológicas aloplásticas (ver apartado 1.2.4 de Introducción): cerámicas, metales y polímeros (Tabla 3).

Introducción

Tabla 3. Principales materiales aloplásticos empleados en prótesis oftalmológicas.

Tipo	Material	Polaridad	Rigidez	Porosidad	Ejemplos de Prótesis	Uso actual
Cerámicas	Alúmina	Hidrófobo	Rígido	Poroso	Implante orbitario	Habitual
	Cristal	Hidrófobo	Rígido	Sólido	Tubos de Jones, implante orbitario, prótesis ocular	Muy elevado en tubos, en el resto escaso
	Hidroxiapatita	Hidrófobo	Rígido	Poroso	Implante orbitario	Habitual
Metales	Acero	Hidrófobo	Rígido	Sólido	Implante ExPRESS®	Habitual
	Nitino ¹	Hidrófobo	Flexible	Malla	Stent vía lagrimal	Muy escaso
	Oro	Hidrófobo	Rígido	Poroso	Implante supracoroideo	Muy escaso
				Sólido	Pesa palpebral	Muy elevado
	Platino	Hidrófobo	Rígido	Sólido	Pesa palpebral	Habitual
Titanio	Hidrófobo	Flexible	Malla	Prótesis paredes orbitarias	Muy elevado	
Polímeros	Acrílicos hidrofílicos	Hidrofílico	Flexible	Sólido	LIO, LC, cerclajes esclerales, esferas autoexpandibles, tapones y tubos lagrimales	Muy elevado en LIO, LC y esferas. Resto, limitado
				Poroso	Implante orbitario	Muy escaso
	Acrílicos hidrofóbicos ²	Hidrófobo	Flexible	Sólido	LIO, implante de Molteno	Muy elevado en ambas
	ePTFE ³	Hidrófobo	Semi-flexible	Sólido	Prótesis paredes orbitarias	Muy escaso
				Poroso	Banda de tracción palpebral	Habitual
	PMMA ⁴	Hidrófobo	Rígido	Sólido	Anillos intracorneales, queratoprótesis, prótesis oculares; LIO, Iris artificiales,	Muy habitual en todas excepto en LIO e iris.
	Poliéster	Hidrófobo	Flexible	Sólido	Sutura	Elevado
				Malla	Banda de tracción palpebral	Muy escaso
	PFCP ⁵	Hidrófobo	Rígido	Poroso	Prótesis paredes orbitarias	Muy escaso
	Polipropileno	Hidrófobo	Flexible	Sólido	Sutura	Habitual
	Poliuretano	Hidrófobo	Semi-flexible	Sólido	Stents de vía lagrimal	Muy escaso
	Polivinil-pirrolidona	Hidrófobo	Rígido	Sólido	Stents de punto lagrimal	Elevado
	PPAD ⁶	Hidrófobo	Rígido	Poroso	Implantes orbitarios, cuñas, láminas, ortesis palpebrales	Muy elevado
	PTFE ⁷	Hidrófobo	Rígido	Sólido	Láminas paredes orbitarias	Muy escaso
Silicona	Hidrófobo	Flexible	Sólida	Cerclajes esclerales, intubaciones lagrimales, válvula de Ahmed, implante orbitario, bandas de tracción palpebral; LIO, LC, ortesis palpebrales, tubos de conjuntivorrinostomía, cuñas	Muy habitual para las 5 primeras, muy escaso en las 5 siguientes.	
			Porosa	Cerclajes esclerales, implante orbitario	Muy escaso en ambas	

¹Aleación de níquel y titanio. ²Otros polímeros acrílicos hidrofóbicos distintos del PMMA.

³Politetrafluoroetileno expandido (Gore-Tex®). ⁴Polimetilmetacrilato. ⁵Polímeros fluorocarbonados

porosos (Proplast®). ⁶Polietileno poroso de Alta Densidad (Medpor®). ⁷ Politetrafluoroetileno (teflón).

Las cerámicas derivan de sales de elementos alcalinos, alcalino-térreos o metálicos, siendo las sales de silicio (silicatos) los principales componentes, y consiguiendo generalmente su aglutinación por medio del calor. Aunque su uso se remonta a la antigüedad, su empleo como material protésico es relativamente reciente. Por el contrario, los metales, especialmente los nobles, se emplearon para fabricar los primeros dispositivos protésicos debido a su excelente biocompatibilidad, aunque resultan limitados en cuanto a número y características, pese al empleo de aleaciones. Por último, los polímeros sintéticos presentan una variedad casi infinita de combinaciones moleculares y características físico-químicas.

Los polímeros son macromoléculas formadas por la unión de moléculas más simples (monómeros) durante el proceso de polimerización. Los polímeros pueden ser homopolímeros, obtenidos por unión entre sí de varias moléculas iguales (monómero) o pueden ser copolímeros, obtenidos por la unión de moléculas de dos o más monómeros distintos. La longitud de la cadena, los monómeros que la componen y los grupos funcionales libres que presenten, aportarán las características físico-químicas del polímero. Esta versatilidad en cuanto a su composición hace que estos materiales plásticos puedan tener propiedades muy diferentes, por lo que en la actualidad la mayoría de prótesis están formadas por ellos. Así, por ejemplo, los polímeros acrílicos están formados por monómeros derivados del ácido acrílico, un derivado del propileno. Existen multitud de compuestos derivados de este ácido, que se pueden clasificar en cuanto a su polaridad: algunos como el hidroxietilmetacrilato, el fenil-etil-metacrilato, o el poli-fenil-etil-acrilato presentan características hidrofílicas y se han usado ampliamente para la fabricación de LIO y de LC. Por el contrario otros como el PMMA, o el poli-fenil-etil-metacrilato (polímero de las lentes acrílicas hidrofóbicas Acrysoft®) tienen características hidrofóbicas (Belmonte, 2008). Al contrario que los polímeros acrílicos, que están formados por cadenas de enlaces carbónicos, la silicona, y los compuestos derivados de ella, están formados por cadenas poliméricas de enlaces alternantes de oxígeno y silicio, de las cuales penden radicales hidrófobos.

3. La flora microbiana

Como acabamos de ver en el apartado 2 de la Introducción, una de las complicaciones más frecuentes del empleo de prótesis oftalmológicas es su

contaminación con microorganismos que residen de forma habitual en la zona de implante quirúrgico (piel periocular o conjuntiva).

Este conjunto de microorganismos, que viven en el interior o sobre un determinado epitelio, se denomina flora microbiana o microbiota, e incluye bacterias, hongos, protozoos y artrópodos (Kong, 2011). Un epitelio es tejido que recubre la superficie o las cavidades y conductos abiertos al medio externo de un organismo. Dado que en el ser humano podemos diferenciar varios grupos de epitelios (cutáneo, conjuntival, naso-sinusal, oro-faríngeo, traqueo-pulmonar, intestinal y genito-urinario) existen diferentes microbiotas, ya que los microorganismos se adaptan a las condiciones ambientales existentes en cada epitelio. Además, el entorno varía de unas zonas a otras dentro del mismo epitelio (por ejemplo, las condiciones en la piel del cuero cabelludo, de las axilas o de la piel glabra son considerablemente distintas), lo que implica un cambio en la composición de microorganismos existentes en cada región (Martin, 2012).

La importancia de la flora microbiana reside en su enorme interacción con el organismo hospedador, en nuestro caso, el ser humano. El número de microorganismos presentes en nuestro cuerpo es unas diez veces superior al número de células humanas, y el conjunto de genes de la flora microbiana (microbioma) es 1000 veces superior a los contenidos en el genoma humano (Gordon y Klaenhammer, 2011; Martin, 2012).

El principal beneficio que se obtiene de la presencia de una microflora normal en cada epitelio es su función protectora. Los microorganismos habituales actúan como barrera, dificultando la colonización por microorganismos patógenos, y mantienen unas condiciones fisiológicas saludables para el epitelio (Yang y Pei, 2006). Además, en el aparato digestivo, la microbiota normal estimula el sistema inmune humano y aporta de nutrientes esenciales (Cunningham-Rundles *et al.*, 2002).

La microbiota habitual de cada región corporal, está formada por especies que se comportan como comensales o simbioses respecto al ser humano, pero también suelen aparecer, aunque en mucho menor porcentaje, especies consideradas patógenas. Estas especies patógenas no llegan a producir enfermedad al no conseguir una masa celular suficiente, ya que las especies no patógenas compiten con ellas (O'Hara y Shanahan, 2006).

La alteración del equilibrio entre las distintas especies (disbiosis) tiene una trascendencia clínica, al promover diversas enfermedades. Así, por ejemplo, la alteración de la flora vaginal (habitualmente constituida por diferentes especies de *Lactobacilli*) por una presencia predominante de *Gardnerella vaginalis*, se ha relacionado con un incremento de la secreción vaginal, baja tasa de embarazo, endometritis tras aborto programado, e incremento del riesgo de infección de diferentes enfermedades de transmisión sexual (Martin, 2012). También la alteración de la microbiota intestinal del colon se ha relacionado con diversas enfermedades como la obesidad, la esteatosis hepática y la ateromatosis (Goldsmith y Sartor, 2014), la enfermedad inflamatoria intestinal (O'Hara y Shanahan, 2006) y el cáncer colorrectal (Yang y Pei, 2006). Los productos metabólicos derivados de las distintas especies bacterianas favorecerían o reprimirían estas enfermedades, existiendo especies bacterianas beneficiosas, mientras que otras favorecerían la inflamación intestinal y el daño tisular (Missaghi *et al.*, 2014). De estas experiencias, podríamos concluir que la existencia o no de enfermedad en un epitelio resultaría del balance entre bacterias patógenas y beneficiosas. Sin embargo, la relación entre la fisiopatogenia de un proceso y la disbiosis local es, probablemente, más compleja. Así, existen varios casos en los que resulta difícil decidir si la disbiosis es causa o consecuencia de la enfermedad, como por ejemplo ocurre en la obesidad (Angelakis *et al.*, 2012), el acné (Kong, 2011), la rosácea (Rusiecka-Ziółkowska *et al.*, 2014) o la dermatitis atópica (Baker, 2006).

Pese a que todavía es necesario un conocimiento más profundo de las funciones de la microbiota en cada epitelio, se considera que se puede actuar sobre la microflora como diana terapéutica: disminuyendo los microorganismos patógenos o su actividad metabólica, favoreciendo el desarrollo de los microorganismos beneficiosos, o aportando éstos directamente (Gordon y Klaenhammer, 2011).

Las microbiotas más estudiadas hasta la actualidad son las presentes en los epitelios cutáneo, intestinal, y genito-urinario, siendo la microbiota conjuntival menos conocida, especialmente en cuanto a sus potenciales efectos patogénicos o beneficiosos. Debido a la gran repercusión que tiene la microbiota en otros epitelios y la íntima relación entre la flora conjuntival y el implante y uso de prótesis oftalmológicas, dedicaremos el siguiente apartado a la descripción de la flora conjuntival, así como a sus posibles factores modificadores y las repercusiones clínicas que una disbiosis conjuntival puede suponer.

4. La flora conjuntival

La flora o microbiota conjuntival es el conjunto de microorganismos que podemos encontrar sobre este epitelio, la conjuntiva, que recubre la cara interna de los párpados y la superficie anterior del globo ocular hasta el limbo esclerocorneal. Como veremos a continuación, existe una clara relación entre la flora conjuntival y la infección microbiana del material protésico implantado en oftalmología. A su vez, la presencia de material protésico en esta área puede inducir cambios de la microbiota normal. Por ello, resulta necesario conocer la flora conjuntival normal, a fin de valorar el efecto que un implante puede desencadenar sobre la misma y la repercusión clínica que una disbiosis conjuntival puede tener.

4.1. Flora conjuntival habitual

En la gestación, el feto se mantiene aislado de los microorganismos habituales presentes en las diferentes floras maternas. Durante el parto, la flora vaginal pasa a la conjuntiva del neonato para formar una flora conjuntival inicial, constituida fundamentalmente por bacterias micro-aerofílicas como *Lactobacillus spp*, o anaerobias como *Bifidobacterium spp*, típicas de la flora vaginal. En los neonatos cuyo parto se realiza por cesárea, la colonización bacteriana es mucho menor, estando constituida por escasas bacterias típicas de la flora cutánea (Isenberg *et al.*, 1988). Esta flora conjuntival inicial continúa cambiando a lo largo de la vida, observándose, con el paso del tiempo, un aumento de las bacterias aeróbicas, tanto en número de especies como en densidad bacteriana, sin mostrar diferencias cualitativas ni cuantitativas en función del sexo. (Thiel y Schumacher, 1994).

La flora conjuntival normal en adultos está constituida fundamentalmente por bacterias aeróbicas, siendo más raros los microorganismos anaeróbicos y los hongos. Estos microorganismos de la conjuntiva proceden del desplazamiento de los gérmenes de la flora cutánea, por lo que las variaciones de ésta por la edad, el medioambiente, la época estacional y las condiciones higiénicas generales, repercutirán en la flora conjuntival (Gündüz *et al.*, 2008).

La densidad bacteriana, entendiéndose como tal el número de microorganismos por mm² de piel o por ml de secreción en los epitelios mucosos, es mayor en la piel de los párpados y en la unión cutáneo-mucosa (borde palpebral) que en la conjuntiva. Aquí, la microbiota es limitada por proteínas con efecto antibacteriano (lisozima, lactoferrina, betalisisina, inmunoglobulinas,...) presentes en la lágrima (McClellan, 1997). Esta menor densidad bacteriana de la flora conjuntival hace que el aislamiento por cultivo en medios convencionales no siempre resulte positivo, pudiendo establecerse, como medida indirecta de la densidad bacteriana presente, el número de muestras con crecimiento microbiano (cultivos positivos) respecto a las muestras que tras varios días de cultivo no presentan ningún crecimiento (cultivos negativos). Del mismo modo, se puede cuantificar la relevancia de una determinada cepa en un grupo de pacientes a estudio observando la tasa de aislamiento de esa bacteria (número de muestras positivas para esa cepa dividido por el número total de muestras en las que se cultivó algún microorganismo). Estos dos conceptos, la tasa global de aislamiento (cultivos positivos respecto al total de muestras) y tasa de aislamiento por especie, serán tratados con mayor profundidad posteriormente (ver apartado 1.4.5 de Materiales y Métodos).

Además del cultivo microbiológico, las técnicas de detección de microorganismos por PCR resultan más precisas, consiguiendo elevar el número de cepas presentes en la flora conjuntival respecto a los cultivos convencionales, aunque el proceso se encarece (Graham *et al.*, 2007).

4.1.1. Flora conjuntival bacteriana aeróbica

La flora bacteriana aeróbica de la conjuntiva está constituida en más de un 90% por microorganismos Gram positivos, de los cuales los estafilococos suponen unos dos tercios (Fernández-Rubio, 2004). Las especies del género *Staphylococcus* las podemos dividir en dos grandes grupos, en función de su actividad enzimática, como estafilococos coagulasa negativos (SCN) o estafilococos coagulasa positivos (SCP):

- a) Los SCN se consideran, en general, gérmenes saprofíticos y su presencia es muy habitual en la mucosa conjuntival. Están representados fundamentalmente por la especie *S. epidermidis* que supone casi el 90% de los SCN aislados, aunque también se han encontrado en la conjuntiva otras especies como: *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. lentus*, *S.*

lugdunensis, *S. saprophyticus*, *S. schleiferi schleiferi*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. xylosum*, (Leitch *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2010).

- b) Por el contrario, los SCP se consideran en general como patógenos, habiéndose identificado siete especies bacterianas en diferentes animales: *S. aureus*, *S. intermedius*, *S. schleiferi subsp. coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae*, *S. delphini* y *S. pseudintermedius* (Sasaki *et al.*, 2010). Con diferencia, el SCP más importante como patógeno para el ser humano es *S. aureus*, cuya tasa de aislamiento en conjuntivas, en principio sanas, ronda el 5-10% (De Kaspar *et al.*, 2004; Kusbeci *et al.*, 2009).

El otro tercio de especies Gram positivas aerobias, lo constituyen las bacterias corineformes y, en menor medida, los estreptococos (Fernández-Rubio, 2004; Kusbeci *et al.*, 2009). El grupo de los microorganismos corineformes está formado por diferentes especies bacterianas pertenecientes a familias de actinomicetales saprofitos: *Corynebacteriaceae*, *Cellulomonadaceae*, *Dermabacteriaceae* y *Microbacteriaceae*, entre otras (Bernard, 2012). También se han aislado en la conjuntiva sana otras especies Gram positivas como *Micrococcus spp*, *Enterococcus spp* y *Bacillus spp* (Doyle *et al.*, 1995; De Kaspar *et al.*, 2004).

Las especies bacterianas Gram negativas constituyen el 10% restante de la flora aeróbica: cocobacilos como *Haemophilus spp* (principalmente *Haemophilus influenza*), *Proteus spp* (Patillon *et al.*, 1978; Fernández-Rubio, 2004; Kusbeci *et al.*, 2009), *Neisseria spp* o *Moraxella spp* (Gündüz *et al.*, 2008); y bacilos como *Pseudomonas spp* (principalmente *P. aeruginosa*) (Patillon *et al.*, 1978; Gritz *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2004), *Acinetobacter spp* (Patillon *et al.*, 1978; Gritz *et al.*, 1997), *Flavobacter spp* (Patillon *et al.*, 1978; Vasquez y Linberg, 1989) o *Citrobacter spp* (Martins *et al.*, 2004).

4.1.2. Flora conjuntival bacteriana anaeróbica

Las bacterias anaerobias típicas de la vagina representan la primera flora que coloniza la conjuntiva en los neonatos por parto natural (Isenberg *et al.*, 1988). Posteriormente, la especie anaerobia más frecuentemente aislada en niños mayores y

adultos es *Propionibacterium acnes*, observándose una mayor tasa de aislamiento en adultos que niños (Singer *et al.*, 1988).

P. acnes es un bacilo Gram positivo considerado anaerobio estricto aerotolerante (puede sobrevivir a exposiciones cortas al oxígeno atmosférico, pero requiere anaerobiosis para desarrollarse). También se han aislado otros bacilos Gram positivos anaerobios aerotolerantes del género *Lactobacillus spp* (Campos *et al.*, 1994) y cocos Gram positivos anaerobios: estrictos como *Peptostreptococcus spp* (McNatt *et al.*, 1978) y facultativos como *Enterococcus spp* (De Kaspar *et al.*, 2004). Dentro de las especies Gram negativas, se han aislado anaerobios estrictos como *Veillonella spp* (Campos *et al.*, 1994) y *Bacteroides spp* (Thiel y Schumacher, 1994) constituyendo el resto los bacilos Gram negativos anaerobios facultativos, fundamentalmente los pertenecientes a la familia de las enterobacterias, como: *Escherichia spp* (fundamentalmente *E. coli*) (Kusbeci *et al.*, 2009; Fernández-Rubio, 2004), *Serratia spp* (Gritz *et al.*, 1997; Fernández-Rubio, 2004), *Morganella spp* (fundamentalmente *Morganella morganii*) y *Klebsiella spp* (Fernández-Rubio, 2004).

Aunque las bacterias anaerobias constituyen la flora conjuntival principal en los neonatos, la densidad efectiva de anaerobios es difícil de estudiar en los adultos en los que predomina la flora aeróbica. Algunos estudios, centrados en el aislamiento de la flora anaerobia de la conjuntiva, revelaron tasas de aislamiento del 51,6% para anaerobios del total de muestras tomadas de personas sanas, constituyendo *P. acnes* más del 95% de los anaerobios aislados, mientras que otras bacterias como *Peptostreptococcus spp*, sólo se aislaron en un 4% (McNatt *et al.*, 1978). En el estudio de Campos, empleando como medio BHI pre-reducido y suplementado con hemina y vitamina K, se alcanzaron tasas de aislamiento de anaerobios ligeramente mayores, del 77,3%, siendo de nuevo *P. acnes* la especie más frecuentemente aislada (82%), y detectando también una elevada proporción de otras especies como *Veillonella spp* (16%) y *Lactobacillus spp* (14%) (Campos *et al.*, 1994).

4.1.3. Flora conjuntival fúngica

Los hongos rara vez están presentes en la flora conjuntival, existiendo una tasa media de aislamiento que no sobrepasa el 1-6% (Doyle *et al.*, 1995; Gündüz *et al.*, 2008). Incluso en trabajos específicamente diseñados para el aislamiento de hongos,

sólo se ha conseguido una tasa de aislamiento del 6,6% en pacientes sanos, incrementándose a un 14,7% en pacientes con conjuntivitis y a un 56% en pacientes con dacriocistitis (Ando y Takatori, 1982). Además, se ha observado que la flora fúngica en la conjuntiva varía con la región de residencia, la actividad del individuo y la estación del año, lo que dificulta aún más la posibilidad de establecer una correlación clínico-patológica. No obstante, se ha observado que, en general, la presencia de hongos en la conjuntiva en ausencia de enfermedades oculares, aumenta con la edad, con la cantidad de hongos presentes en el aire, y con los tratamientos con corticoides tópicos (Mitsui y Hanabusa, 1955).

Los géneros más frecuentemente aislados son: *Candida spp* (14% del total de los hongos aislados de la conjuntiva), *Cladosporium spp* (11%), *Aspergillus spp* (4%), *Fusarium spp* (4%), *Rhizopus spp* (4%), *Aureobasidium spp* (3%), *Penicilium spp* (3%) y *Alternaria spp* (2%), constituyendo el resto de hongos levaduriformes distintos de *Candida spp* un 32% y otros hongos filamentosos un 12% (Ando y Takatori, 1982).

4.1.4. Otros microorganismos de la flora conjuntival

La presencia de otros microorganismos en la flora conjuntival como amebas, nematodos o artrópodos debe considerarse patológica (Klotz *et al.*, 2000), si bien en el caso de *Demodex folliculorum*, ácaro que vive adherido a las pestañas, se discute su implicación como patógeno, ya que es posible encontrarlo en personas asintomáticas (Lacey *et al.*, 2009). No obstante, *D. folliculorum* ha sido ampliamente involucrado en la producción de blefaritis, aunque se desconoce si esta capacidad patogénica está en relación al número de ácaros presentes o a su posible actuación como vector para otros patógenos como bacterias u hongos (Rusiecka-Ziółkowska *et al.*, 2014).

4.1.5. Definición de flora conjuntival normal

Resulta difícil establecer unos valores normales, tanto cuantitativos como cualitativos, de la microbiota conjuntival en personas sanas, puesto que el número y composición de la misma varía en función de diferentes aspectos (edad del paciente, condiciones ambientales o área geográfica). Además, el escaso número de microorganismos existentes en la conjuntiva de cada persona, la llegada continua de microorganismos desde la piel periocular, y la eliminación de microorganismos por el

flujo lagrimal y por las sustancias contenidas en la lágrima, dificultan que se pueda definir un porcentaje de cada uno de los microorganismos que realmente se encuentran en la conjuntiva de cada individuo en un determinado momento, así como el número total de microorganismos. Por ello, la composición de la microbiota conjuntival se establece en base a estudios en grupos de individuos, teniendo en cuenta, además, que la metodología empleada es también clave para determinar unos microorganismos u otros en el cultivo.

Así, podemos definir cualitativamente la flora conjuntival normal cultivando, en medios y condiciones generales, muestras conjuntivales de una población humana sana. En estas circunstancias, los microorganismos aislados son fundamentalmente bacterias aerobias o anaerobias facultativas, que mantienen la siguiente distribución: al menos un 50% de los cultivos deben ser de *S. epidermidis* u otros estafilococos coagulasa negativos; las bacterias corineformes deben estar presentes en al menos un 20% de los cultivos; *S. aureus*, estreptococos, enterococos y otras bacterias Gram positivas no deben sumar más de un 10% de los cultivos; y tampoco deben rebasar este porcentaje las bacterias Gram negativas.

Para valorar cuantitativamente la microbiota conjuntival se puede realizar el recuento de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por peso de la muestra (Liu *et al.*, 2011) o, más frecuentemente, por hisopo obtenido de cada paciente (Barkana *et al.*, 2005; Kusbeci *et al.*, 2009; Moreno *et al.*, 2014). Sin embargo, esta forma de medir la densidad microbiana presenta una excesiva variabilidad inter-estudios, de uno a dos órdenes de magnitud, probablemente por diferencias metodológicas. Incluso empleando la misma metodología, se pueden observar diferencias notables (Isenberg *et al.*, 1988; Barkana *et al.*, 2005). Esta elevada variabilidad impide que pueda establecerse un rango útil de UFC para la flora conjuntival en personas sanas. Una manera más sencilla, aunque indirecta, de valorar cuantitativamente la flora conjuntival es, como se comentó al inicio del apartado 4.1 de la Introducción, el porcentaje de cultivos con crecimiento respecto al total de muestras tomadas (tasa global de aislamiento).

4.2. Factores modificadores de la flora conjuntival

La composición, así como la densidad microbiana, de la flora conjuntival puede verse modificada por varios factores, además de los provocados por la edad y las

condiciones higiénicas o medioambientales. Diversas enfermedades, tanto oculares como sistémicas, así como los tratamientos empleados, tanto tópicos como sistémicos, pueden alterar la población microbiana de la flora conjuntival.

4.2.1. Enfermedades sistémicas modificadoras de la flora conjuntival

Existen varios ejemplos:

- Los pacientes con enfermedad de Behçet, vasculitis autoinmune de pequeño vaso, muestran una mayor densidad microbiana en la flora conjuntival, medida como tasa de aislamiento global (92% en enfermos, frente a un 58% en sanos), habiéndose planteado la posibilidad de que la alteración de la flora no sea una consecuencia de la enfermedad, sino un factor causal de la misma al interactuar la flora conjuntival como desencadenante antigénico en un individuo genéticamente predispuesto (Gündüz *et al.*, 2008).
- Los pacientes con diabetes mellitus (DM) tienen una mayor densidad bacteriana en la flora conjuntival (tasa de aislamiento del 94% frente al 73% en controles) que se correlaciona con la mayor tasa de incidencia de endoftalmitis postoperatorias en la cirugía de catarata que presentan los pacientes diabéticos (Martins *et al.*, 2004). Otro factor que se postula como responsable de esta mayor incidencia de endoftalmitis en los pacientes diabéticos es la inmunosupresión, a la que se ven sometidos estos pacientes especialmente si están mal controlados.
- Dentro de la inmunosupresión producida por VIH, se ha observado una mayor tasa de aislamiento de anaerobios en pacientes con SIDA, fundamentalmente por aumento de *Clostridium spp* (36%) y *Actinomyces spp* (29%) (Campos *et al.*, 1994), así como de *S. aureus* (Gritz *et al.*, 1997).
- En pacientes hemodializados, otro grupo específico de pacientes sometidos a inmunosupresión, también se ha observado un aumento de la densidad bacteriana de la flora conjuntival, presentando un incremento significativo de *S. aureus* respecto a los pacientes sanos (Balbaba *et al.*, 2013).
- También cabe resaltar que algunas enfermedades sistémicas pueden provocar, colateralmente, una alteración local a nivel ocular. Los pacientes con enfermedad de Parkinson, que presentan un parpadeo disminuido, presentan

alteraciones en la superficie ocular. Se ha observado un aumento de la prevalencia de ojo seco y de blefaritis en estos pacientes, así como un aumento de la densidad de la flora bacteriana (81% en enfermos, frente a un 71% en sanos) (Kusbeci *et al.*, 2009).

Además de los cambios cuantitativos mencionados, la principal modificación cualitativa en la microbiota conjuntival provocada por estas enfermedades sistémicas es el aumento en la tasa de aislamiento de *S. aureus*, respecto a los grupos control formados por pacientes sanos (Gritz *et al.*, 1997; Gündüz *et al.*, 2008; Kusbeci *et al.*, 2009; Balbaba *et al.*, 2013).

4.2.2. Enfermedades oculares modificadoras de la flora conjuntival

Entre las enfermedades específicamente oculares con repercusión sobre la microbiota conjuntival, se encuentran la blefaritis, las conjuntivitis crónicas, la obstrucción de la vía lagrimal y su cirugía, y otros procedimientos quirúrgicos en áreas próximas a la conjuntiva como la septoplastia.

- En la blefaritis, inflamación crónica del borde palpebral, se ha observado un incremento en la tasa de aislamiento de *S. aureus*, *Corynebacterium spp*, y de las bacterias Gram negativas anaerobias facultativas, junto con un descenso de la tasa de aislado de *P. acnes* (Lee *et al.*, 2012).
- En pacientes con conjuntivitis crónicas de diversos orígenes, se ha determinado un incremento en las tasas de *S. aureus* y de bacterias Gram negativas, junto con un descenso de la población de *Micrococcus spp* (Grasbon *et al.*, 1995). Curiosamente, en una de las formas más habituales de conjuntivitis crónica, la queratoconjuntivitis *sicca* u ojo seco, no se ha encontrado diferencias significativas entre la flora conjuntival de pacientes con esta enfermedad y la de pacientes sanos, aunque se ha hallado una correlación positiva entre la tasa de colonización y la severidad del ojo seco (Chen *et al.*, 2012).
- La obstrucción de la vía lagrimal provoca un aumento de la cantidad de lágrima presente en el fondo de saco conjuntival, lo que unido a su estancamiento favorece el desarrollo bacteriano. Además, también puede aumentar la cantidad de moco con sobrecrecimiento bacteriano, procedente

del saco lagrimal por reflujo, denominándose a esta situación dacriocistitis crónica. Se ha observado en pacientes con dacriocistitis crónica, un incremento en la tasa de aislamiento de *S. aureus*, *Streptococcus spp*, y otros microorganismos anaerobios, junto con un descenso de la tasa de *S. epidermidis* (Owji y Khalili, 2009). Esta flora conjuntival alterada se normaliza entre 4 y 6 semanas después de realizar una dacriocistorrinostomía, siendo más rápida la normalización de la flora en los pacientes con sobrecrecimiento de *S. aureus*, que en aquellos con altas tasas de estreptococos, anaerobios o a los que se les realiza tutorización de la vía lagrimal con intubaciones de silicona (Owji y Khalili, 2009).

- La cirugía de corrección de la desviación del tabique nasal o septoplastia ha demostrado ser un factor modificador de la flora conjuntival, observándose un aumento en la tasa de *S. aureus* de la flora conjuntival (de un 5,5% preoperatorio a un 12,7% postoperatorio) así como de los microorganismos Gram negativos (de un 3,6% a un 12,7% postoperatorio) después de realizar este procedimiento quirúrgico (Durmaz *et al.*, 2011).

4.2.3. Tratamientos sistémicos que modifican la flora conjuntival

Se ha demostrado que el uso de antibióticos por vía oral como las tetraciclinas, está asociado con una importante disminución de la carga bacteriana del borde libre palpebral, aunque no se ha comprobado su efecto sobre la flora conjuntival (Ta *et al.*, 2003).

4.2.4. Tratamientos tópicos que modifican la flora conjuntival

- Los antibióticos tópicos, como el ciprofloxacino, provocan una drástica reducción de la carga bacteriana, medida en UFC, siendo estadísticamente significativa a los 30 minutos de realizar la instilación (Ermis *et al.*, 2004).
- Los corticoides tópicos, como la dexametasona, se han postulado como factores que pueden incrementar la tasa de colonización conjuntival por hongos (Mitsui y Hanabusa, 1955), aunque no parecen alterar la flora conjuntival, al menos en las primeras horas de la instilación (Ermis *et al.*, 2004).

- Las medicaciones antihipertensivas oculares, empleadas por los pacientes con glaucoma de forma crónica, pese a tener conservantes como el cloruro de benzalconio (Giaoruis *et al.*, 2013), no han demostrado modificar la flora conjuntival, con excepción de una disminución de la tasa de *Corynebacterium spp* que, probablemente, al tratarse de una bacteria más lábil, puede verse afectada por la medicación antiglaucomatosa o por los propios conservantes (De Kaspar *et al.*, 2004).

4.2.5. Prótesis oftalmológicas que modifican la flora conjuntival

- Las LC son una de las prótesis más estudiadas como factor modificador de la microbiota conjuntival. Actualmente las LC hidrofílicas no parecen provocar modificaciones cualitativas en la flora, aunque sí podrían inducir una alteración cuantitativa incrementando la densidad bacteriana (Callender *et al.*, 1986; Erdogan *et al.*, 2002). No obstante, en la década de 1970, se había documentado un incremento de bacilos Gram negativos en los usuarios de LC hidrofílicas (Morgan, 1979). Por otro lado, las LC de silicona parecen producir un cambio no sólo cuantitativo, sino también cualitativo, con un incremento de la tasa de aislamiento de SCN y de *Corynebacterium spp* (Iskeleli *et al.*, 2005).
- Las queratoprótesis, al tratarse de prótesis parcialmente internas se asocian con tasas de hasta el 20% de endoftalmitis (Muñoz-Gutierrez *et al.*, 2013). Por este motivo, los pacientes portadores son tratados de forma continuada con colirios antibióticos tópicos. Pese a estas medicaciones, la tasa de aislamiento de flora conjuntival en ojos portadores de queratoprótesis es mayor que en los ojos contralaterales (Lee *et al.*, 2013).
- Los tubos de Jones, como hemos comentado previamente, parecen inducir un cambio de la flora conjuntival, haciéndola más similar a la flora de la mucosa nasal. En los pacientes portadores de estos tubos de conjuntivorrinostomía se ha observado un aumento de la tasa de aislamiento de *S. aureus*, *Streptococcus spp* y bacilos Gram negativos, junto con una disminución de *S. epidermidis* (Can *et al.*, 1998).

- El uso prolongado de las intubaciones de silicona (*stents* de paso periférico), empleadas en la cirugía de dacriocistorrinostomía, se ha asociado con un incremento de la presencia de *P. aeruginosa* (Kim *et al.*, 2012).
- Las prótesis oculares de los pacientes anoftálmicos, suponen la presencia de un cuerpo extraño, de un tamaño considerable, en contacto continuo con la mucosa conjuntival. La lágrima, el moco y las células conjuntivales descamadas se acumulan en el espacio retroprotésico favoreciendo el crecimiento bacteriano (Figura 32).



Figura 32. Prótesis ocular retirada con ventosa: obsérvese el material mucoso, bacteriano y de descamación celular acumulado en el espacio retroprotésico. El material fue cultivado aislándose, además de flora habitual, *Proteus mirabilis* y *Bacteroides spp.* La paciente de 70 años, refería no haber retirado la prótesis para su limpieza en los últimos 20 años. (Colección particular del autor).

En los pacientes anoftálmicos, portadores de prótesis ocular, el 97,5% de las cavidades anoftálmicas o *socket* han mostrado cultivos positivos (Vasquez y Linberg, 1989). Además, se han encontrado diferencias significativas en el crecimiento de las bacterias Gram negativas, tanto aerobias como anaerobias facultativas, en los pacientes anoftálmicos que manipulaban la prótesis con frecuencia (lavado de al menos una vez por semana) presentando éstos una mayor densidad bacteriana respecto a los pacientes anoftálmicos con menor manipulación (Vasquez y Linberg, 1989). Respecto a la flora anaeróbica, hay que destacar que los pacientes anoftálmicos muestran modificaciones cualitativas en las cavidades anoftálmicas, existiendo un aumento de *P. acnes* y de *Peptococcus niger* y un descenso de *Lactobacillus spp* (Campos *et al.*, 1994). En los portadores de prótesis ocular con descarga mucosa habitual, se ha detectado una tasa de

aislado positivo en anaerobios del 94% en su cavidad anoftálmica. Además, se ha observado un incremento significativo de los aislados polimicrobianos en las cavidades anoftálmicas (un 27% con respecto al 4% registrado en los controles) (Campos *et al.*, 1994). Los trabajos que revelan estas modificaciones en la flora conjuntival (aumento de bacterias Gram negativas y anaerobias en las cavidades anoftálmicas), confirman los hallazgos obtenidos previamente por otros estudios donde ya se había observado un incremento de bacterias patógenas en la cavidad enucleada respecto al ojo sano contralateral (Christensen y Fahmy, 1974; Miller *et al.*, 1976; Patillon *et al.*, 1978). Sin embargo, ninguno de estos estudios se ha realizado sobre pacientes portadores de prótesis ocular e implante orbitario, por lo que se desconoce la influencia que éste puede ejercer sobre la flora conjuntival de la cavidad anoftálmica.

A modo de resumen, podemos decir que, hasta ahora, los estudios realizados sobre las alteraciones de la flora conjuntival inducidas por enfermedad ocular o por el uso de prótesis oftalmológicas revelan un incremento de *S. aureus*, de bacterias Gram negativas, anaerobias y hongos, junto con un descenso de la flora menos patógena como son los SCN, corineformes, *Micrococcus spp* y *Lactobacillus spp* (Morgan, 1979; Can *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 1994).

4.3. Repercusiones clínicas de una flora conjuntival alterada

La transformación de la microbiota conjuntival normal, con incremento de bacterias patógenas, es muy probable que provoque alteraciones a nivel ocular, al igual que ocurre con la modificación de la flora en otros epitelios, como el vaginal o el intestinal (ver apartado 3 de la Introducción).

Se ha demostrado una mayor incidencia de algunas enfermedades oculares en pacientes con alteraciones en su microbiota conjuntival, aunque el hecho de que haya personas con una clara modificación de su flora que no refieren sintomatología, como es el caso de algunos pacientes anoftálmicos portadores de prótesis ocular (Vasquez y Linberg, 1989), hace aún difícil establecer una clara correlación clínico-patológica con las alteraciones de la flora conjuntival.

No obstante, existen algunas situaciones en las que la relación, entre una microbiota conjuntival alterada y su repercusión clínica, está bien establecida:

- Se ha observado una clara asociación entre la presencia de *P. aeruginosa* en la conjuntiva y el fracaso de las dacriocistorrinostomías (Kim *et al.*, 2012).
- Existe mayor presencia en la microbiota conjuntival de *Peptostreptococcus spp* en ojos con inflamación conjuntival crónica (Perkins *et al.*, 1975).
- Algunas bacterias poco habituales en la flora conjuntival han demostrado ser capaces de producir diferentes enfermedades oculares, como es el caso de la enterobacteria *Providencia rettgeri*, germen causal de queratitis, dacriocistitis, conjuntivitis y endoftalmitis (Koreishi *et al.*, 2006).
- En pacientes con DM, con obstrucción de la vía lagrimal (Schmitz *et al.*, 1999), o con blefaritis (Mac y Soltau, 2003), situaciones que modifican la flora conjuntival, presentan una mayor incidencia de endoftalmitis postquirúrgicas. Este hecho se complementa con la comprobación de que la mayoría de las endoftalmitis tras la cirugía de catarata están causadas por la entrada de microorganismos presentes en la flora conjuntival, ya que, en el 82% de los pacientes con endoftalmitis, los microorganismos aislados a nivel intraocular son genéticamente idénticos a los gérmenes aislados en la flora conjuntival de cada paciente (Speaker *et al.*, 1991).

Como se observa, en todas estas situaciones descritas, las enfermedades oculares se favorecen por el crecimiento excesivo de determinadas especies con capacidad patógena. A este respecto, cabe destacar que los microorganismos presentan dos formas fundamentales de proliferación: planctónica y sésil.

La proliferación planctónica, en forma de células individuales flotando libremente en el medio, provoca infecciones agudas y el tratamiento se dirige a evitar directamente el crecimiento bacteriano, empleando antibióticos. Como ejemplo de crecimiento planctónico en relación con la microbiota conjuntival, tendríamos las endoftalmitis agudas, cuyo microorganismo causal más frecuente es *S. epidermidis* (Gentile *et al.*, 2014) y en las que el tratamiento con antibióticos intraoculares puede resultar curativo (Lemley y Han, 2007).

Por el contrario, el crecimiento sésil o en forma de agregados microbianos adheridos a superficies (biofilm) produce infecciones crónicas, siendo en general resistentes a los antibióticos, por lo que el tratamiento se dirige a eliminar la adhesión del biofilm, bien con fármacos o mecánicamente. Como ejemplo a nivel ocular,

tendríamos las endoftalmitis crónicas, cuyo principal germen responsable es *P. acnes* (Fox *et al.*, 1991; Gopal *et al.*, 2008) y cuyo tratamiento suele requerir la extracción de la LIO y el saco capsular cristalino (Winward *et al.*, 1993; Güler y Yilmaz, 2013). Dada la enorme trascendencia que la proliferación bacteriana en forma de biofilm tiene para la colonización del material protésico, dedicaremos el siguiente apartado a su descripción.

5. El crecimiento bacteriano en biofilm

Se denomina proliferación microbiana sésil, en comunidad o en biofilm cuando los microorganismos forman agregados unidos a una superficie sólida (Figura 33).

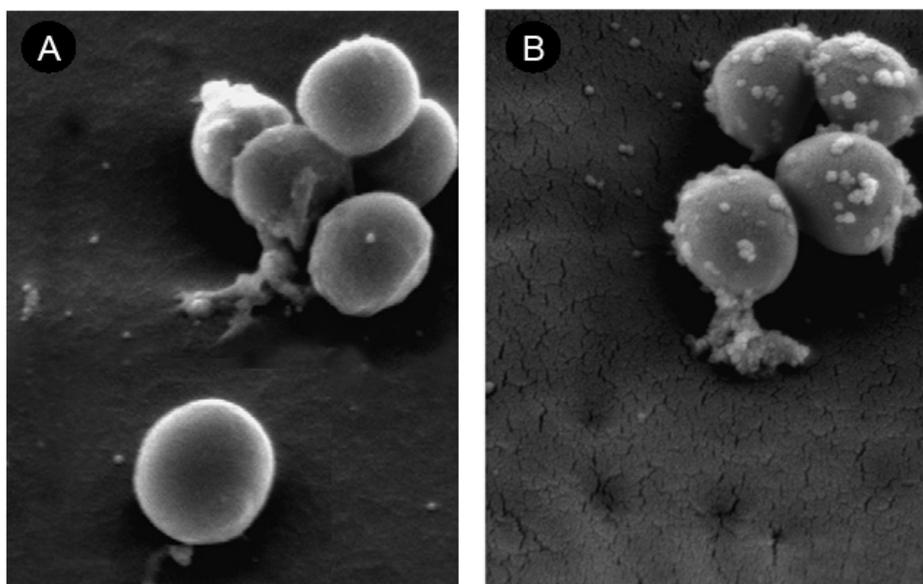


Figura 33. Microscopía electrónica de barrido mostrando adhesión y formación de una microcolonia de *S. epidermidis* después de 6 horas de incubación, sobre implantes de diferentes materiales: A. Acrílico hidrofóbico. B. PMMA. (Modificada de Baillif *et al.*, 2010).

Este agregado microbiano constituye un mecanismo natural de colonización y supervivencia para las bacterias (Costerton *et al.*, 1999; Zegans *et al.*, 2002). El biofilm presentan una resistencia inherente a los agentes antimicrobianos y está en el origen de muchas infecciones crónicas y persistentes, siendo clave en la infección del material protésico (Davey y O'toole, 2000; Teughels *et al.*, 2006; Samimi *et al.*, 2013), como ya se ha mencionado en los apartados 2.3 y 4.3 de la Introducción.

5.1. Concepto de biofilm

Un biofilm es una comunidad estructurada de células, envuelta en una matriz polimérica auto-producida, y adherida a una superficie inerte (abiótica) o viva (biótica), denominada sustrato (Costerton *et al.*, 1999). El crecimiento en biofilm constituye un modo protegido de crecimiento, respecto al crecimiento planctónico o de células libres, y facilita la supervivencia de los microorganismos en condiciones ambientales adversas. Las superficies que permiten la formación de biofilm abarcan desde las superficies abióticas (tanto hidrofóbicas como hidrofílicas) a las bióticas, como las células eucariotas (Zegans *et al.*, 2002).

Comprender el ciclo vital de un organismo planctónico unicelular y su transición a una forma más compleja de biofilm es crucial cuando nos enfrentamos a enfermedades infecciosas. La mayoría de las infecciones bacterianas agudas son producidas por microorganismos planctónicos, con un rápido crecimiento (Parsa *et al.*, 2010). Por el contrario, los biofilms son los responsables de infecciones persistentes y han sido involucrados en muchos procesos infecciosos crónicos incluyendo: caries dental, otitis media, fascitis necrotizante, osteomielitis, endocarditis, neumonía en la fibrosis quística, y también en enfermedades nosocomiales, como infecciones de suturas, tubos endocraneales, catéteres (Davey y O'toole, 2000), y en la infección de prótesis de diversos tipos, entre ellas las empleadas en la cirugía oculoplástica (Samimi *et al.*, 2013).

Comparados con las bacterias libres, los biofilms están mejor adaptados a la privación de nutrientes, cambios en el pH, radicales de oxígeno, biocidas, y agentes antimicrobianos, y representan auténticas sociedades microbianas con sus propios sistemas de defensa y comunicación (Teughels *et al.*, 2006). Las células de diferentes regiones del biofilm exhiben diferentes patrones de expresión génica, aumentando la complejidad de la estructura y del metabolismo del biofilm, lo que ha llevado a equiparar a estas formaciones con los tejidos en los organismos superiores (Davey y O'toole, 2000).

En la naturaleza, los biofilm pueden estar formados por una sola especie o por una mezcla de especies de microorganismos, que en muchas ocasiones actúan de modo

sinérgico para sobrevivir a unas condiciones medioambientales adversas (Costerton *et al.*, 1999; Davey y O'toole, 2000; Wang *et al.*, 2013).

5.2. Formación de biofilm

El proceso de formación de estas comunidades no es al azar, sino que requiere de una modificación en la expresión de genes que condicionan los cambios fenotípicos observables (Toutain *et al.*, 2005). Se ha estimado que el cambio de crecimiento planctónico a crecimiento en biofilm implica la modificación de más del 50% del proteoma de una bacteria (Sauer *et al.*, 2002). Esto hace que no todas las especies microbianas tengan la capacidad de crecer formando biofilms. Así, hay cepas y especies más propensas a este tipo de crecimiento, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *S. aureus* o *S. epidermidis* (Izano *et al.*, 2008; Petrova y Sauer, 2012). En todos los casos el crecimiento en forma de biofilm es consecuencia de la respuesta al acúmulo, en su entorno, de moléculas concretas que actúan como autoinductores promoviendo la agregación celular (Teughels *et al.*, 2006). Esta capacidad bacteriana de percibir señales autoproducidas, en función de la densidad celular, se denomina percepción de *quorum*, o en inglés, *quorum sensing*, y constituye un mecanismo de comunicación intercelular bacteriano para regular de forma coordinada la expresión de genes (Miller y Bassler, 2001).

El proceso de formación y crecimiento en biofilm podemos dividirlo en 5 fases: adhesión reversible, adhesión irreversible, microcolonia, biofilm maduro, y propagación del biofilm (Sauer *et al.*, 2002).

5.2.1. Adhesión reversible

El desarrollo de un biofilm se inicia con la adhesión de células planctónicas, microorganismos libres suspendidos en un fluido, a una superficie. Inicialmente, los microorganismos son transportados o nadan por sí mismos (como en el caso de algunas bacterias), lo suficientemente cerca del sustrato. En ese momento se produce un primer contacto reversible (Figura 34), establecido por fuerzas de Van der Waals, electrostáticas y/o hidrofóbicas (Teughels *et al.*, 2006; Palmer *et al.*, 2007). A través de unos sistemas proteicos que actúan como sensores de superficie (como el MotAB/CD de *P. aeruginosa*), se induce la expresión de genes que fabricarán

exopolisacáridos, la formación de vesículas membranosas que liberaran proteínas, lípidos y ácidos nucleicos (Mashburn-Warren y Whiteley, 2006) y se disminuye la actividad flagelar en aquellas bacterias que la presentan, iniciando la fase de adhesión irreversible (Sauer *et al.*, 2002; Toutain *et al.*, 2005; Martínez-Granero *et al.*, 2014).

En las bacterias más estudiadas, *P. aeruginosa*, *Listeria monocytogenes* y *Vibrio parahaemolyticus*, todas ellas flageladas, se ha observado que los propios flagelos actúan como mecanosensores, detectando la existencia de una superficie sólida e iniciando el cambio en la expresión génica (Petrova y Sauer, 2012). En las bacterias no flageladas, se considera que son los *pili* las estructuras encargadas de esta función sensorial de superficie (Tomaras *et al.*, 2003).

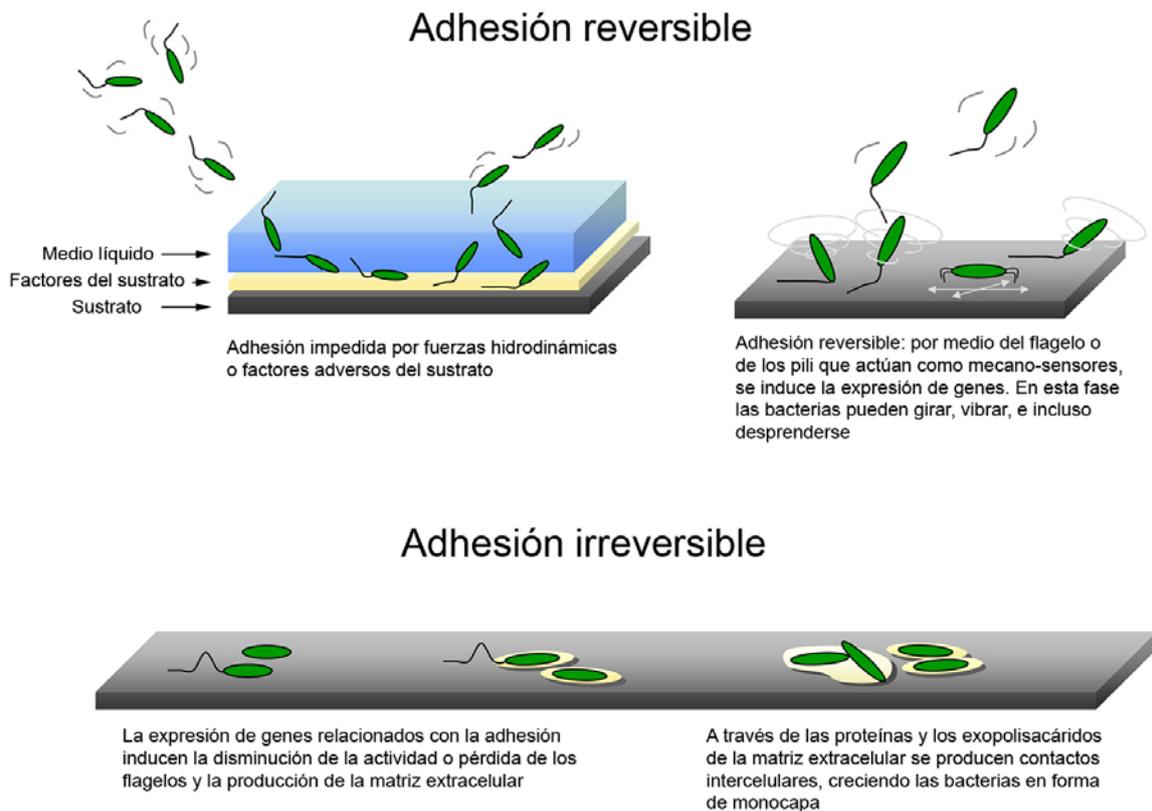


Figura 34. Esquema de los acontecimientos en la fase de adhesión reversible e irreversible, como pasos críticos en la formación de biofilm. (Modificada de Petrova y Sauer, 2012).

5.2.2. Adhesión irreversible

La producción de una sustancia polimérica extracelular permite la adhesión firme de los microorganismos al sustrato al actuar otras fuerzas, como enlaces por puente de hidrógeno y enlaces covalentes (Chao y Zhang, 2011). Esta sustancia denominada matriz extracelular está compuesta por polisacáridos, DNA extracelular (DNAe), lípidos y proteínas (Flemming y Wingender, 2010). Los lípidos y las proteínas, excretados a través de vesículas membranosas, podrían incrementar la hidrofobicidad de la superficie, favoreciendo la adhesión (Baumgarten *et al.*, 2012), aunque su papel es menos conocido. Por el contrario, sí se ha demostrado una especial relevancia de los exopolisacáridos y del DNAe en la adhesión irreversible (Davey y O'toole, 2000; Petrova y Sauer, 2012).

Los exopolisacáridos producidos varían no sólo según la especie microbiana, sino también según las diferentes cepas de una misma especie. Así *P. aeruginosa* produce al menos tres polisacáridos distintos relacionados con la adhesión irreversible: Alginato, Psl (del inglés, *polysaccharide synthesis locus*, es un exopolisacárido rico en manosa, regulado en dicho *locus* y formado por 11 genes) y Pel (del inglés, *Pellicle*, película, es un exopolisacárido rico en glucosa y regulado en el *locus* Pel, formado por 7 genes) (Friedman y Kolter, 2004). El Psl y el Pel se descubrieron al estudiar cepas formadoras de biofilm defectivas para alginato (Wozniak *et al.*, 2003), y también se ha observado como cepas defectivas para Psl, pueden inducir una regulación positiva de Pel, aumentando su síntesis y permitiendo así la formación de biofilm (Colvin *et al.*, 2012). Esta redundancia en los genes necesarios para formar la matriz extracelular da buena muestra de la importancia que tiene la capacidad de formación de biofilms para algunas especies bacterianas.

La producción de estos polisacáridos ocurre de forma precoz tras la adhesión reversible, por ejemplo, se ha observado que la expresión del gen *algC* de *P. aeruginosa*, que se requiere para la producción de alginato y lipopolisacárido, se activa a los 15 minutos de producirse el contacto reversible entre la bacteria y una superficie de teflón o de cristal (Davies y Geesey, 1995).

Otras bacterias como *E. coli* producen otros tipos de exopolisacáridos como el poli- β -1,6-N-acetil-D-glucosamina (PNAG) y el ácido colánico. El PNAG se requiere

para la adhesión permanente y las interacciones intercelulares de *E. coli*, mientras que el ácido colánico no se requiere en la adhesión a superficies, pero en cambio resulta crítico para la formación de las estructuras celulares tridimensionales como los biofilms (Petrova y Sauer, 2012).

No obstante, la función de un mismo polisacárido puede variar entre las distintas especies o cepas, como por ejemplo ocurre con el PNAG producido por *S. aureus* y *S. epidermidis*. Estudios realizados empleando dispersina B (enzima que degrada el PNAG) han demostrado que este polisacárido no tiene efecto en la formación del biofilm de *S. aureus* cepa SARM252 y es en cambio esencial para *S. aureus* cepa SH1000 y *S. epidermidis* (Izano *et al.*, 2008).

La implicación del DNAe sobre la adhesión ha sido menos estudiada, pero se ha observado una significativa reducción en la formación de biofilm en presencia de desoxirribonucleasas (DNAsa I) en distintas especies bacterianas como *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* y *S. aureus* (tanto cepa SH1000 como cepa SARM252) (Izano *et al.*, 2008).

5.2.3. Microcolonia

Una vez adheridas de forma irreversible, las bacterias se dividen formando primero una monocapa, para progresar después a un pequeño grupo de células multicapa, denominado microcolonia (Figura 35). Alcanzar esta formación celular tridimensional también requiere cambios en la expresión génica: por ejemplo, en el caso de *P. aeruginosa*, se requiere la activación de los genes que regulan la formación de los *pili* tipo IV, sin los cuales no consigue formar microcolonias (Lu *et al.*, 1997; Costerton *et al.*, 1999).

5.2.4. Biofilm maduro

Cuando existe una densidad celular crítica, las señales químicas producidas por las bacterias individuales de la microcolonia se acumulan, desencadenando la expresión de grupos específicos de genes (*quorum sensing*), que harán que las células crezcan con formaciones con aspecto de pilar u hongo, entremezcladas con canales rellenos de

fluido (Davey y O'toole, 2000; Petrova y Sauer, 2012). A esta forma de crecimiento bien estructurado se la denomina biofilm maduro.

En *P. aeruginosa* la señal química que induce este cambio en la microcolonia es la lactona-ácil-homoserina, una molécula que también actúa como autoinductor o activador del *quorum sensing* en muchas otras bacterias (Fuqua *et al.*, 1994; Puskas *et al.*, 1997; Miller y Bassler, 2001). Se han caracterizado dos sistemas sensitivos que detectan esta molécula en exceso: el LasR-LasI, que controla la expresión de una batería de factores virulentos extracelulares al dirigir LasI la síntesis de 3-oxododecanoil-homoserina; y el sistema RhlR-RhlI, que controla la producción de metabolitos secundarios al catalizar RhlI la síntesis de butiril-homoserina (Pesci *et al.*, 1997). Las cepas mutantes lasI permanecen indiferenciadas en una microcolonia fina y tendente a la dispersión con un detergente débil. Sin embargo, añadiendo la señal perdida, el 3-oxododecanoil-homoserina, el biofilm se desarrolla (Davies *et al.*, 1998).

Por lo tanto, hay componentes de superficie celular específicos, necesarios para la adhesión a superficies y componentes adicionales necesarios para la agregación de las células en microcolonias indiferenciadas. A su vez, la generación de biofilms maduros requiere, en el caso de *P. aeruginosa*, de señales extracelulares que pueden ser comparadas con una hormona (Costerton *et al.*, 1999) (Figura 35).

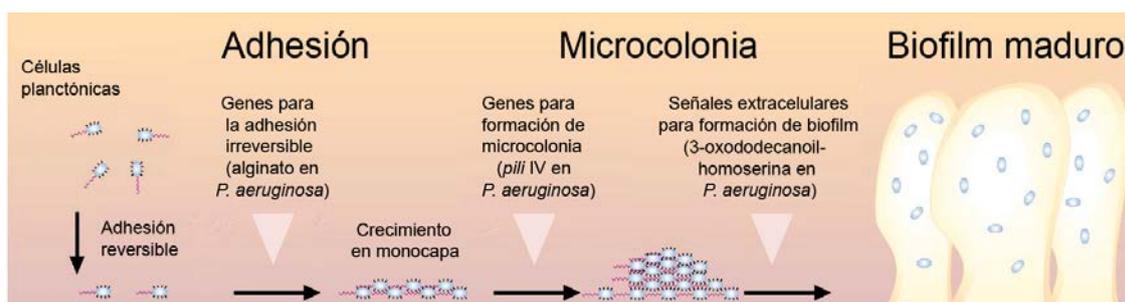


Figura 35. Esquema del crecimiento desde células planctónicas a biofilm maduro. Obsérvese que se requieren genes que codifiquen moléculas de superficie específicas para la adhesión irreversible, para la formación de microcolonia y genes que codifiquen y detecten señales para la organización en biofilm maduro. (Modificada de Costerton *et al.*, 1999).

5.2.5. Propagación del biofilm

Los biofilms maduros tienen mecanismos para liberar células microbianas y colonizar nuevas áreas (Figura 36). Este proceso de propagación puede realizarse de dos modos: a) pasivo: en el que fuerzas de cizalla del medio líquido provocan el desprendimiento mecánico de fragmentos de biofilm, que son arrastrados y pueden colonizar nuevas superficies; o b) activo: a través de una liberación programada de microorganismos, denominada dispersión celular (Costerton *et al.*, 1999; Sauer *et al.*, 2004; Thormann *et al.*, 2006). En el caso de las bacterias expulsadas mediante dispersión presentan inicialmente un fenotipo intermedio entre el de célula de biofilm y el de célula planctónica, aunque posteriormente modifican sus genes activos a los de crecimiento planctónico (Sauer *et al.*, 2002). En este proceso de dispersión celular intervienen señales químicas y sistemas de *quorum sensing*, que producen enzimas que degradan la matriz extracelular y cambian el programa genético de las células liberadas (Puskas *et al.*, 1997; Costerton *et al.*, 1999). La disminución de los niveles de oxígeno (Applegate y Bryers, 1991), el aumento de los niveles de óxido nítrico (Barraud *et al.*, 2006), o el aumento brusco en las fuentes de carbono disponibles, como el succinato y el glutamato (Sauer *et al.*, 2004) actuarían como señales químicas que promueven la dispersión celular del biofilm en algunas bacterias.



Figura 36. Esquema de las modalidades de propagación del biofilm, bien de forma mecánica por desprendimiento físico por turbulencias en el medio líquido, o bien en forma de dispersión celular, mediante una degradación enzimática programada de la matriz extracelular, que libera bacterias en forma planctónica (con presencia de flagelos y activación de genes propios del crecimiento planctónico). (Modificada de Costerton *et al.*, 1999).

En el caso de *P. aeruginosa*, se ha encontrado un sistema de *quorum sensing* denominado *bdIA* (del inglés *biofilm dispersión locus*) imprescindible en la dispersión celular relacionada con el óxido nítrico (Morgan *et al.*, 2006) y se ha demostrado el incremento de la enzima alginato liasa, que digiere el alginato de la matriz extracelular, en la fase de degradación del biofilm (Boyd y Chakrabarty, 1994).

5.3. Factores modificadores de la adhesión del biofilm

La formación de biofilm depende en gran medida de la cepa microbiana existente y de sus características genéticas. No obstante, existen ciertas condiciones dependientes del medio y del sustrato que promueven el crecimiento en forma de biofilm.

5.3.1. Factores microbiológicos

Como hemos visto, existen especies bacterianas con mayor facilidad para el crecimiento en biofilm, como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. aureus* o *S. epidermidis* (Izano *et al.*, 2008; Petrova y Sauer, 2012; Wang *et al.*, 2013). También hemos mencionado que dentro de cada especie existen cepas con diferencias génicas que pueden modificar la capacidad de adhesión o de maduración (Wozniak *et al.*, 2003; Colvin *et al.*, 2012; Wiens *et al.*, 2014). Esta gran variedad de genes involucrados, diferentes entre las distintas especies, no permite establecer un patrón genético común responsable del proceso de formación de biofilm, más allá de las características de cada especie.

Por otro lado, la presencia de microorganismos, ya adheridos a una superficie, puede favorecer o dificultar la formación de biofilm para otra especie.

Algunas bacterias, ante situaciones de estrés, producen sustancias que favorecen su supervivencia, como factores hidrofóbicos adhesivos (Baumgarten *et al.*, 2012). Al ser excretadas mediante vesículas membranosas, confieren un halo de hidrofobicidad a la superficie, que puede favorecer la adhesión de otras especies más delicadas (Zhu *et al.*, 2013). Otro caso de convivencia microbiana es el intercambio de nutrientes entre distintas especies, como las bacterias fermentadoras, cuyo subproducto principal, el ácido láctico, es empleado como sustrato por bacterias acetogénicas, y finalmente el

acetato es transformado en metano por microorganismos metanógenos (Davey y O'toole, 2000).

En el ser humano es habitual la presencia de comunidades microbianas constituidas por varias especies que actúan de modo sinérgico, como en la flora oral (Kolenbrander *et al.*, 2010), donde se han observado biofilms mixtos (Figura 37) constituidos por *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* y *Treponema forsythia* (Zhu *et al.*, 2013).

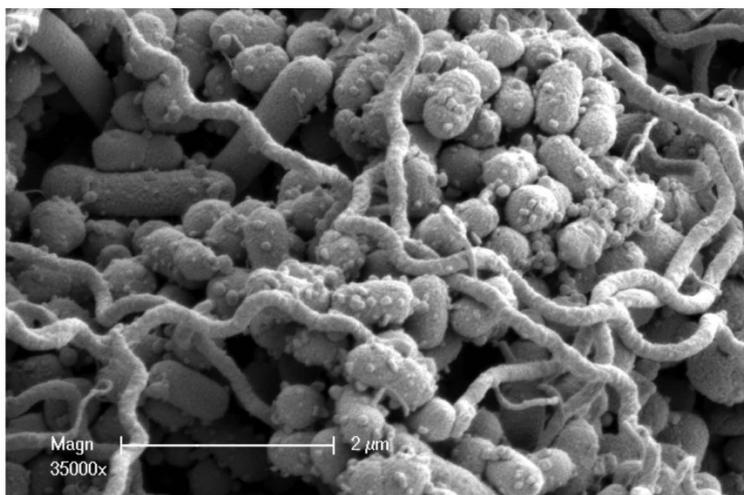


Figura 37. Microscopía electrónica de barrido de biofilm de la flora oral. Se observa un biofilm mixto formado por *T. denticola* (espiroqueta alargada), *T. forsythia* (bacilos) y *P. gingivalis* (pequeños cocobacilos con vesículas membranosas). (Tomada de Zhu *et al.*, 2013).

Por el contrario, otras sustancias producidas por un biofilm ya establecido, pueden actuar como toxinas para otros microorganismos, impidiendo el desarrollo de los mismos (Kolling y Matthews, 1999). Los ejemplos más conocidos son los de hongos que producen antibióticos, como los betalactámicos generados por varias especies del género *Penicillium* (Gailey *et al.*, 1946), o citostáticos como la rapamicina aislada del hongo *Streptomyces hygroscopicus* y capaz de inhibir el crecimiento de otros hongos como *Candida albicans*, *Microsporium gypseum* y *Trichophyton mentagrophytes*; bacterias Gram positivas como *S. aureus*; y células eucariotas, especialmente linfocitos T y fibroblastos (Vézina *et al.*, 1975; Migita *et al.*, 1996). También las bacterias adheridas a superficies, impiden la colonización de dicha superficie por hongos, como por ejemplo *Streptococcus thermophilus* B que inhibe el crecimiento de *C. albicans* gracias al surfactante de su matriz extracelular (Busscher *et al.*, 1997).

Además de esta inhibición humoral, existen sistemas de inhibición celular, mediante el contacto entre células. El más estudiado es el sistema Cdi (del inglés *Contact dependent inhibitor*) de *E. coli* que consta de tres proteínas de membrana (Figura 38): CdiA que actúa como receptor de contacto; CdiB que es la proteína de membrana que fija CdiA a la bacteria con sistema Cdi; y CdiI que inhibe el efecto de CdiA, impidiendo que resulte tóxico para la bacteria con sistema Cdi (Aoki *et al.*, 2005; Low y Hayes, 2012). El extremo C-terminal de la proteína CdiA resulta tóxico para las bacterias carentes del sistema Cdi, al insertarse en su pared y provocar la entrada de protones modificando el canal de flujo *acrB* (del inglés *acriflavine*), que es una bomba transmembrana que permite a las bacterias expulsar acridina y sales biliares (Nakamura *et al.*, 1978; Aoki *et al.*, 2008).

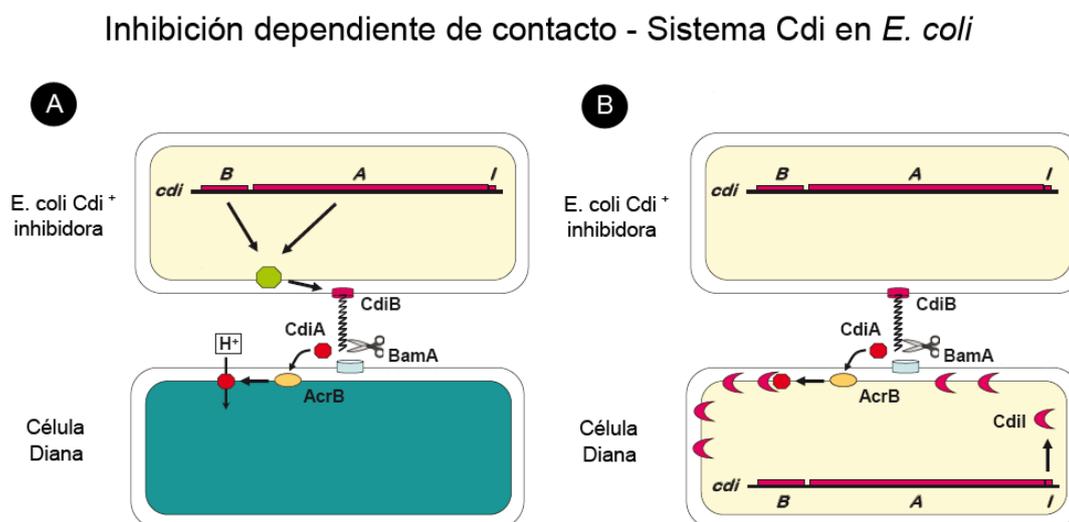


Figura 38. Sistema inhibidor dependiente de contacto (Cdi) de *E. coli*. A. Al contactar con una bacteria que presenta el ligando BamA, susceptible de ser atacada, se libera el extremo C-terminal de CdiA, que provoca la entrada de protones que dañan a la bacteria diana. B. Si la célula adyacente presenta el sistema Cdi, no es atacada, al neutralizar el efecto tóxico la proteína CdiI. (Modificado de Low y Hayes, 2012).

De esta forma, la inhibición entre distintos microorganismos puede emplearse como arma terapéutica, modificando la flora habitual de forma intencionada para evitar la colonización de los implantes médicos por microorganismos virulentos (Busscher *et al.*, 1997).

5.3.2. Factores medioambientales

Las bacterias tienden a formar biofilms ante condiciones adversas del entorno, especialmente en situaciones de escasez de nutrientes (Davey y O'toole, 2000). La limitación en la fuente de carbono especialmente, pero también, la limitación de nitrógeno o de fósforo, se asocian con un incremento en la formación de biofilm (Bowden y Li, 1997; Allan *et al.*, 2002). Otros factores medioambientales adicionales como la osmolaridad, el pH, la presencia o escasez de iones divalentes (como el calcio, magnesio o hierro) o algunas proteínas séricas, promueven la adhesión y el crecimiento bacteriano sésil (Petrova y Sauer, 2012).

El pH y la fuerza iónica influyen en la hidrofobicidad de la superficie, tanto de la bacteria como del sustrato. La mayor adhesión a superficies hidrofóbicas se encuentra a valores de pH entre 2,2 y 4, en el rango del punto isoeléctrico de las bacterias (Bunt *et al.*, 1993).

Algunas proteínas séricas o tisulares como la fibronectina, el fibrinógeno o la trombina tienen un efecto potenciador de la adhesión bacteriana, mientras que otras como la albúmina, dificultan la adhesión si el material se encuentra recubierto por esta proteína (Dickinson *et al.*, 1997; An y Friedman, 1998).

Además de estos factores químicos, existen otros factores físicos del medio, como la temperatura, el tiempo de exposición y las condiciones de flujo hidrodinámico, que afectan a la formación del biofilm (Katsikogianni y Missirlis, 2004). El flujo hidrodinámico se considera un factor clave, afectando al número de células adheridas, así como a la estructura del biofilm y su desarrollo: la presencia de altos flujos genera fuerzas de cizalla que provocan un mayor desprendimiento celular, disminuyendo el número de bacterias adheridas y formándose un biofilm más denso y fino (Chang *et al.*, 1991).

5.3.3. Factores dependientes del sustrato

La superficie del biomaterial, sobre la que se va a fijar el microorganismo, influye de forma notable en la capacidad de formación de biofilm (McAllister *et al.*, 1993; An y Friedman, 1998). Podemos diferenciar los factores dependientes del sustrato

en dos grupos, los relacionados con el tipo de material y los relacionados con la forma de su superficie.

5.3.3.1. Tipo de material

La composición química del biomaterial, su polaridad, o su grado de humectabilidad determina en gran medida la capacidad de adhesión y formación del biofilm de los microorganismos (Baillif *et al.*, 2010).

La superficie de las bacterias generalmente presenta carga negativa, y así se ha demostrado que la adhesión bacteriana se reduce en el PMMA/AA (ácido acrílico) cargado negativamente, mientras que se incrementa en el PMMA/DMAEMA (di-metil-amino-etil-metacrilato) cargado positivamente (Kiremitci-Gumusderelioglu y Pesmen, 1996).

La humectabilidad, medida como el ángulo de contacto de una gota agua sobre una superficie, nos indica la capacidad de un material para formar puentes de hidrógeno con moléculas de agua (Baillif *et al.*, 2010; Shida *et al.*, 2013). No existe una regla general respecto al papel que juega esta propiedad, ya que en algunos estudios se ha observado una mayor adhesión a superficies hidrófobas (Tegoulia y Cooper, 2002), mientras que otros encuentran mayor adhesión a superficies hidrofílicas (Busscher y van der Mei; 1997; Braem *et al.*, 2014; Shida *et al.*, 2013). Esto sugiere que la humectabilidad sería un factor más, pero no definitivo, a la hora de producirse el complicado proceso de adhesión bacteriana a un material. Además, hay que tener en cuenta que la humectabilidad de las bacterias también es diferente entre ellas, por lo que las bacterias hidrofílicas suelen unirse a superficies hidrofílicas, mientras las bacterias hidrófobas prefieren unirse a superficies hidrófobas. (Baillif *et al.*, 2010).

Por último, hay que tener en cuenta que las propiedades químicas de las superficies pueden ser cambiadas o modificadas, recubriéndolas con otras sustancias como la plata, que tiene una acción antibacteriana (Woodyard *et al.*, 1996), o el plasma, la heparina o la mucina que hacen la superficie más hidrofílica e inestable dificultando, de esta manera, la adhesión bacteriana a estas superficies (An y Friedman, 1998; Shi *et al.*, 2000).

5.3.3.2. Topografía de la superficie de contacto

Con independencia de la composición química del material, la forma de la superficie de contacto influye en la facilidad para formar biofilms (Ono *et al.*, 2007; Braem *et al.*, 2014). La rugosidad de la superficie favorece la adhesión y colonización bacteriana, ya que los materiales con surcos y relieves presentan un incremento de la superficie en comparación con los lisos (An y Friedman, 1998; Teughels *et al.*, 2006). Sin embargo, las bacterias se adhieren preferentemente a irregularidades que encajan con su tamaño, ya que esto maximiza el área de contacto bacteria-superficie. Las estrías en los materiales que son del orden del tamaño bacteriano incrementan el área de contacto y favorecen la unión, mientras que surcos mucho más grandes o profundos que el tamaño bacteriano, aproximan la capacidad de adhesión bacteriana a la de una superficie plana. Por el contrario, los surcos demasiado pequeños respecto a las bacterias, reducen el área de contacto entre la bacteria y la superficie, disminuyendo la unión (Edwards y Rutenberg, 2001). Esta falta de relación lineal entre el aumento de la rugosidad y la adherencia bacteriana se ha comprobado estudiando la adhesión de *S. epidermidis* y *P. aeruginosa* sobre PMMA liso o con diferentes grados de rugosidad: un pequeño incremento de la rugosidad (0,04-1,24 μm) provocó un significativo aumento de la adhesión, mientras que incrementos mayores en la rugosidad (1,86-7,89 μm) provocaron un descenso de la adhesión, aunque todavía era mayor que sobre la superficie lisa. (Taylor *et al.*, 1998).

Aplicado a los implantes médicos, se ha observado que la posibilidad de colonización de los mismos es diferente entre los materiales porosos y lisos, teniendo los materiales porosos una tasa de infección mayor (Li *et al.*, 2001), probablemente por el incremento total de superficie del implante, más que por el tamaño específico de los surcos (Braem *et al.*, 2014).

5.4. Mecanismos de defensa y agresión del biofilm

El crecimiento en forma de biofilm es el protagonista en las infecciones crónicas ya que, como hemos comentado, supone una forma de crecimiento microbiano protegido. La mayor supervivencia de las bacterias cuando crecen formando un biofilm les confiere también una mayor capacidad lesiva, al intervenir no sólo los mecanismos nocivos de las bacterias sino también los del propio huésped (Costerton *et al.*, 1999).

Respecto a su capacidad de agresión, los biofilms provocan un daño lento pero constante en los tejidos, ya que actúan a través de varios mecanismos (Figura 39): (I) sirven de reservorio de bacterias, provocando infecciones crónicas con reagudizaciones cuando se libera un número suficiente de células planctónicas; (II) gracias a la matriz extracelular que generan, resisten, con mayor eficacia, los efectos del sistema inmunológico del huésped provocando una inflamación crónica y lesión tisular mediada más por la respuesta inmune del huésped al biofilm que por factores citotóxicos elaborados por las propias bacterias (Parsa *et al.*, 2010); además, (III) los catabolitos procedentes del metabolismo del biofilm, pueden favorecer la adhesión y crecimiento de otras especies microbianas, perpetuando el daño (Zhu *et al.*, 2013).

Respecto a su capacidad de defensa bacteriana, los biofilms resultan especialmente resistentes a los antibióticos, antisépticos y desinfectantes (Costerton *et al.*, 1999), también por medio de varios mecanismos (Figura 39).

Un primer mecanismo de resistencia a los agentes antimicrobianos es la dificultad de éstos para atravesar el espesor completo del biofilm. Las sustancias poliméricas que forman la matriz extracelular retardan la difusión de los antibióticos y solutos en general, dificultando la acción de los mismos (Stewart y Raquepas, 1995). Los modelos matemáticos predicen que se forma una importante barrera superficial y que el agente antimicrobiano puede ser desactivado rápidamente en las capas externas del biofilm (Stewart, 1996). Esto se ha demostrado para los agentes oxidantes tales como el hipoclorito y el peróxido de hidrógeno (De Beer *et al.*, 1994), que son productos de las sustancias oxidativas de las células fagocíticas. La escasa penetración de las especies reactivas de oxígeno puede explicar en parte la incapacidad de las células fagocíticas para destruir los microorganismos del biofilm (Costerton *et al.*, 1999).

Un segundo mecanismo surge como consecuencia de la heterogeneidad en el fenotipo y la expresión génica de las distintas células que conforman el biofilm, en función de su localización espacial. Las células más próximas a la superficie del biofilm tienen mayor exposición a los nutrientes y son las más activas metabólicamente. Las células profundas tienen escaso acceso a los nutrientes (Toutain *et al.*, 2005), sólo a través de la intrincada red de canales, y están relativamente inactivas, en una situación de crecimiento lento o latencia (Samimi *et al.*, 2013). Estas células, en situación de

inanición, que no se dividen o lo hacen de forma lenta, no son demasiado susceptibles a la mayoría de los agentes antimicrobianos (Davey y O'toole, 2000; Anderl *et al.*, 2003). Así pues, la heterogeneidad celular del biofilm también constituye una importante estrategia de supervivencia, porque al encontrarse las células en diferentes estados metabólicos, es probable que por lo menos algunas de ellas sobrevivan. (Costerton *et al.*, 1999).

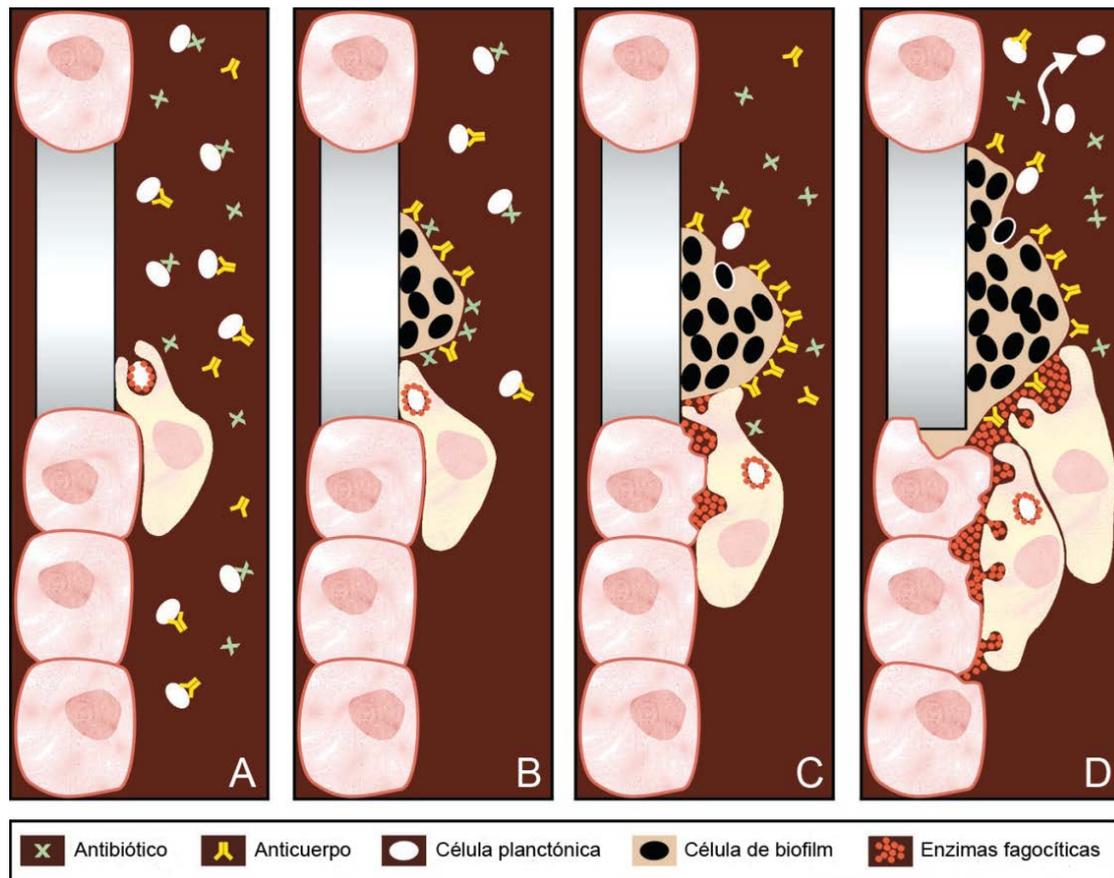


Figura 39. Esquema de los mecanismos de defensa y agresión de un biofilm formado sobre un implante médico. A. Las células planctónicas pueden ser fácilmente eliminadas por los anticuerpos, fagocitos y antibióticos. B. Las bacterias con crecimiento en biofilm sobre superficies inertes, son resistentes a los antibióticos, anticuerpos y fagocitos. C. Las moléculas de la matriz extracelular y los anticuerpos sobre ella, actúan como opsoninas, provocando la quimiotaxis de los fagocitos, que liberan sus enzimas. D. Aunque la fagocitosis es frustrada, las enzimas fagocíticas dañan el tejido circundante al biofilm. Por último, la liberación de células planctónicas desde el biofilm favorece la diseminación e infección del tejido cercano. (Modificado de Costerton *et al.*, 1999).

Un tercer mecanismo, aunque más especulativo, de susceptibilidad reducida del biofilm, es el que considera que algunas células del biofilm pueden adoptar un fenotipo distinto, no como una respuesta a la limitación en los nutrientes, sino como una respuesta biológicamente programada para crecer de forma protegida sobre una superficie (Costerton *et al.*, 1999).

5.5. Trascendencia clínica de los biofilm

5.5.1. En medicina general

Los microorganismos asociados a formación de biofilm son capaces de colonizar una amplia variedad de tejidos y dispositivos médicos, y se han implicado en más del 80% de las inflamaciones e infecciones crónicas de tejidos blandos (Archibald y Gaynes, 1997). Su implicación en algunos casos ha sido difícil de establecer, por ejemplo, durante años la otitis media serosa crónica fue considerada como un derrame aséptico porque no se encontraba crecimiento bacteriano en los medios de cultivo habitual, sin embargo la microscopía electrónica permitió la visualización directa de biofilm en la efusión (Post, 2001).

Además, actualmente carecemos de medios de estudio que valoren la eficacia a nivel clínico de los antibióticos para eliminar las bacterias con crecimiento en biofilm. Los términos Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) valoran el efecto de los antibióticos contra los organismos planctónicos en su fase exponencial de crecimiento, y por lo tanto pueden predecir correctamente la eficacia del antibiótico contra bacterias en rápido proceso de división, en infecciones agudas como una septicemia (Fux *et al.*, 2005). Sin embargo, cuando tratamos con infecciones relacionadas con la formación de biofilms, estos términos, no pueden predecir el comportamiento *in vivo* de los antibióticos (Parsa *et al.*, 2010). Un claro ejemplo de esto, es la neumonía en los pacientes con fibrosis quística, donde los antibióticos consiguen mejorar los síntomas de las reagudizaciones pero fracasan en eliminar el biofilm bacteriano sobre el epitelio pulmonar, perpetuándose la lesión (Smith *et al.*, 1996; Costerton *et al.*, 1999).

En conclusión, aunque cada vez se consideran más relevantes este tipo de comunidades bacterianas como agentes patógenos, la carencia de herramientas

adecuadas en la práctica clínica, tanto para su diagnóstico como para su tratamiento, dificulta que se alcance un mayor éxito en el control de estas formaciones infecciosas (Fux *et al.*, 2005).

5.5.2. En oftalmología

El aumento de la disponibilidad de los biomateriales implantables ha permitido incrementar el uso de materiales sintéticos, en particular, en la cirugía oculofacial. Estos elementos artificiales también proporcionan a los microorganismos nuevas superficies abióticas donde poder adherirse y crecer. La presencia de biofilms bacterianos se ha demostrado en la infección de diversos tipos de prótesis oftalmológicas: LC, LIO, cerclajes esclerales, implantes orbitarios, intubaciones de vía lagrimal, etc. Incluso se ha documentado la existencia de biofilms en algunos tipos de infección ocular en ausencia de materiales artificiales, como en la queratopatía infecciosa cristalina (Zegans *et al.*, 2002).

La propia superficie ocular, bañada por la lágrima, constituye *per se* un medioambiente húmedo favorable para el desarrollo de biofilms sobre una superficie biótica, la conjuntiva, que mantiene controlada la población bacteriana por medio de proteínas con efectos antibacterianos como la lisozima, betalisisina, lactoferrina e IgA, presentes en la lágrima (McClellan, 1997). Esta flora bacteriana, aunque escasa, puede transferirse a las prótesis oftalmológicas en el momento de su implante, pudiendo formar biofilms sobre la superficie del material abiótico (Parsa *et al.*, 2010).

Los biofilm mejor estudiados en el ámbito de la oftalmología, han sido los relacionados con las LIO, responsables de las endoftalmitis tras la cirugía de la catarata (Shimizu *et al.*, 2006; Baillif *et al.*, 2010). Los principales gérmenes responsables de las endoftalmitis son *S. epidermidis* en las endoftalmitis agudas, y *Propionibacterium acnes* en las crónicas, ambas bacterias habituales de la flora conjuntival (Zegans *et al.*, 2002). Estudios previos han demostrado, tomando muestras del fluido de la cámara anterior ocular al final de la cirugía de catarata, la presencia de bacterias en el 13,7% de los 700 pacientes estudiados (Ciulla *et al.*, 2002). Sin embargo, ninguno de estos pacientes desarrolló endoftalmitis, lo que permite suponer que la entrada de bacterias procedentes de la flora conjuntival durante la cirugía de cataratas es habitual, y que los sistemas de defensa del ojo pueden eliminar un pequeño inóculo de bacterias (Ciulla *et al.*, 2002).

En este sentido, el estudio realizado por la Sociedad Europea de Catarata y Cirugía Refractiva (ESCRS) sobre más de 16.000 pacientes operados de cataratas ha concluido que el uso de 0,1 ml de cefuroxima (10 mg/ml) colocado en la cámara anterior ocular al final de la cirugía de catarata, disminuye, en casi 5 veces, la posibilidad de desarrollar una endoftalmitis. Este antibiótico, al eliminar las bacterias en fase de crecimiento planctónico introducidas durante la cirugía, evita la endoftalmitis aguda y que se llegue a formar un biofilm, que produciría una endoftalmitis crónica. Otra conclusión del mismo estudio ha sido que la posibilidad de infección postoperatoria es 3 veces mayor si se utilizan lentes fabricadas en silicona (ESCRS, 2007).

Este último hallazgo clínico ha venido a confirmar los estudios *in vitro* previamente publicados, sobre la influencia del material de la LIO en la adhesión bacteriana, en donde trabajando con la cepa ATCC 35984 de *S. epidermidis* se estableció un orden de adhesión en función del material (de mayor a menor): acrílico, PMMA recubierta de heparina, silicona, PMMA con hápticos de polipropileno, hidrogel, PMMA monobloque y PMMA recubierto de flúor (García-Sáenz *et al.*, 2000). Llama la atención que las lentes de PMMA recubiertas de heparina, precisamente, en un intento de reducir la bioadhesión, resulten más favorables a la colonización de *S. epidermidis*, probablemente en relación con la presencia un receptor de superficie específico de esta cepa a la heparina.

Las prótesis empleadas en cirugía oculoplástica han sido mucho menos estudiadas. No obstante, Samimi *et al.* (2013) han encontrado diferencias en cuanto a las bacterias colonizadoras de los materiales entre los implantes orbitarios, habitualmente infectados por bacterias típicas de la flora conjuntival, y las láminas para reparar fracturas orbitarias, infectadas con más frecuencia por hongos levaduriformes, típicos de la flora de los senos paranasales. Estas diferencias entre los distintos tipos de implantes y los gérmenes detectados en las prótesis infectadas (Figura 40), les ha permitido concluir que son principalmente los gérmenes de la flora habitual próxima los que inician la colonización de las prótesis (Samimi *et al.*, 2013), alcanzando éstas, bien por el simple arrastre en el momento del implante, o bien por el crecimiento sobre una prótesis expuesta tras la pérdida del tejido de recubrimiento.

En la actualidad, una vez que ocurre la infección sobre el implante generalmente se debe eliminar éste, y usar antibióticos para destruir las células planctónicas que puedan haberse liberado a los tejidos (Parsa *et al.*, 2010).

El objetivo para el futuro pasa por desarrollar materiales de superficie ultralisa, electrostáticamente desfavorables para la adhesión bacteriana, o recubiertos de sustancias que la dificulten (Braem *et al.*, 2014), así como desarrollar agentes terapéuticos que ataquen el fenotipo de célula en biofilm y el sistema de comunicaciones del mismo (Costerton *et al.*, 1999; Bispo *et al.*, 2015), consiguiendo agentes que prevengan la formación y/o promuevan el desprendimiento y eliminación del biofilm.

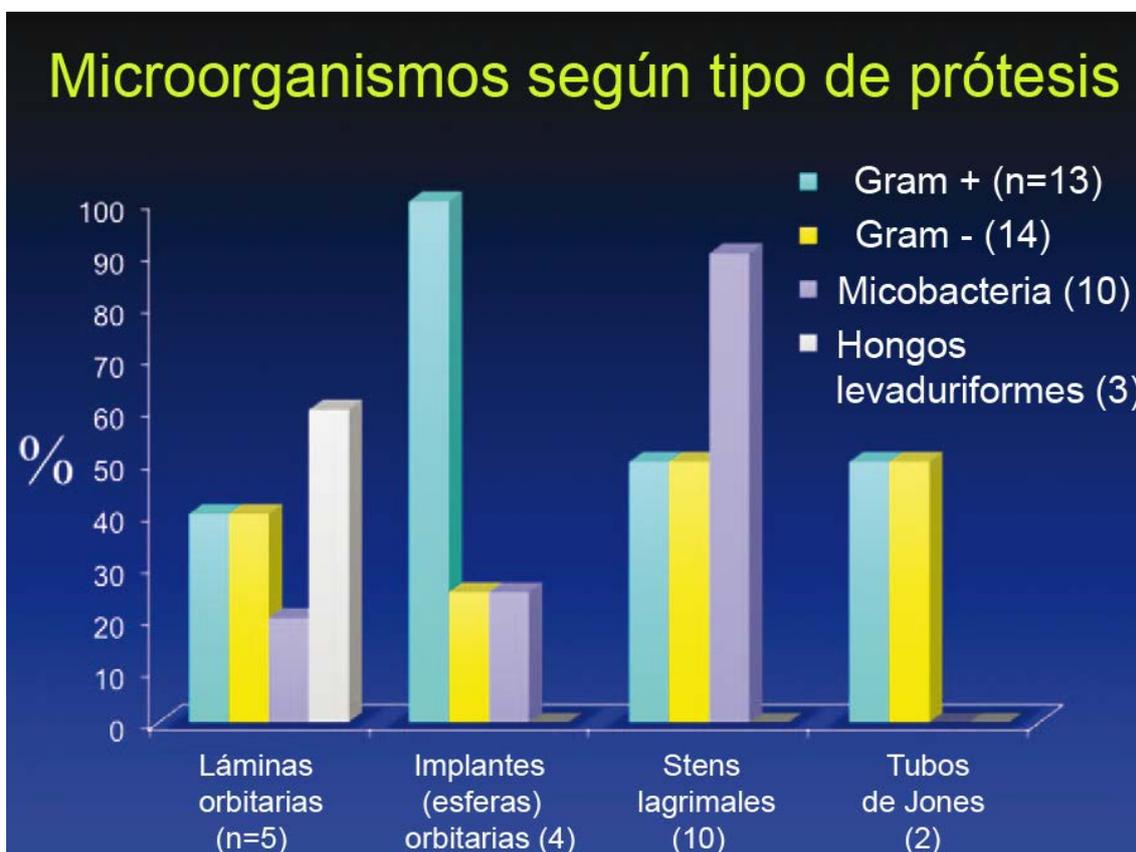


Figura 40. Microorganismos aislados del cultivo de implantes infectados, según el tipo de prótesis. La suma para cada tipo es mayor del 100%, dado que se aislaron múltiples gérmenes en cada tipo de prótesis. Destaca la presencia de levaduras en las láminas orbitarias, bacterias Gram positivas en los implantes orbitarios y micobacterias en los stents lagrimales. (Modificado de Samimi *et al.*, 2013).

5.6. Sistemas de diagnóstico y estudio de los biofilms en implantes

En muchas ocasiones, el cultivo microbiológico de un material protésico mal tolerado, con aspecto clínico de haber sido colonizado por microorganismos, resulta negativo. Esto se debe a que los medios de cultivo y de identificación habituales están diseñados para la detección de células en fase de crecimiento planctónico, con una alta tasa de replicación, y no para muestras de células en estado de latencia, que son las presentes en un biofilm (Parsa *et al.*, 2010). Su baja actividad biológica hace que los sistemas convencionales no detecten la presencia de biofilms bacterianos y generen falsos negativos. Así pues, desde un punto de vista clínico, la técnica de referencia para el diagnóstico de biofilm sobre un implante es la microscopía electrónica (Post, 2001), aunque para ello el biofilm ha de ser deshidratado. Aunque menos accesible, la microscopía con láser confocal sí permite estudiar los biofilms sin modificarlos, apreciando mejor su complicada estructura tridimensional (Davey y O'toole, 2000).

Existen otros métodos que se utilizan en el estudio de la adhesión y formación de biofilms bacterianos. No obstante, hay que tener en cuenta que, en general, estos sistemas *in vitro* son simplificados y no siempre pueden ser equiparados a la realidad clínica, ya que el sistema huésped-prótesis-biofilm es, en conjunto, complejo y dinámico (An y Friedman, 1998). Estas técnicas para el estudio de los biofilm se pueden clasificar en dos grandes grupos: sistemas estáticos y sistemas dinámicos.

Los sistemas estáticos se basan en contar las células adheridas a una superficie, después de haber sido sembradas durante un periodo de tiempo determinado y sin alteraciones hidrodinámicas. Posteriormente, las células no adheridas son eliminadas por lavado o por centrifugado, y las restantes (adheridas) son contadas. En general son técnicas sencillas, baratas y adecuadas para estudiar la adhesión bacteriana sobre diferentes superficies (An y Friedman, 1997). Tanto las células adheridas como la formación de biofilms, pueden ser estudiadas a su vez por varios métodos (Tabla 4). Además, si se emplea la centrifugación como método para recolectar las células no adheridas o adheridas débilmente, se puede calcular una estimación global de la fuerza de adhesión. La principal desventaja de los ensayos estáticos es que son pruebas cualitativas o como mucho semicuantitativas, donde se registra el número global de bacterias adheridas, y es conocido que entre ellas presentan diferentes grados de adhesión (Katsikogianni y Missirlis, 2004).

Tabla 4. Diferentes métodos de evaluación de células adheridas a superficies (Tomado de Katsikogianni y Missirlis, 2004).

A. Microscopía para recuento y observación morfológica de las bacterias adheridas	
a.	Microscopía óptica
b.	Microscopía de análisis de imagen por epifluorescencia
c.	Microscopía electrónica de escaneado
d.	Microscopía de láser confocal
B. Métodos de recuento de bacterias viables	
a.	Recuento en placas de unidades formadoras de colonias (UFC)
b.	Radiomarcado
c.	Tinción con Clorotetraciclina
C. Otros métodos directos e indirectos	
a.	Espectrofotometría
b.	Contador Coulter
c.	Marcadores bioquímicos (Adenosin-trifosfato)
D. Métodos para evaluar la matriz o el biofilm	
a.	Reconocimiento de biofilm
b.	Medida de la densidad y grosor por microscopia electrónica o confocal
c.	Observaciones morfológicas
d.	Medida del contenido del biofilm

El otro gran grupo de técnicas para valorar la adhesión, son los estudios dinámicos. Estos se basan en cuantificar la adhesión sometiendo las células a una fuerza de desplazamiento. Existen cuatro modalidades principales: cámaras de flujo de platos paralelos, cámaras de flujo radial, discos de rotación y estudio de las fuerzas de interacción mediante el microscopio de fuerza atómica (AFM) (An y Friedman, 1997; Potthoff *et al.*, 2015). Los tres primeros estudian la adhesión bacteriana bajo unas condiciones de flujo hidrodinámico conocidas y modificables. El AFM manipula cada célula de forma independiente, pudiendo establecer un valor de la fuerza de adhesión de dicha célula a la superficie. No obstante, la deformación de la bacteria debido a la punta del AFM es una posible fuente de error y quizás explica la variabilidad observada en los resultados (Katsikogianni y Missirlis, 2004).

En resumen, podemos concluir que para mejorar nuestro conocimiento sobre la adhesión de las bacterias, en nuestro caso de la flora conjuntival, es fundamental

Introducción

estudiar en condiciones controladas la formación de biofilms microbianos sobre implantes médicos. Establecer los factores que intervienen en este proceso de colonización es esencial para conocer las pautas de adhesión y determinar los materiales más adecuados para cada prótesis oftalmológica.

OBJETIVOS

De los múltiples dispositivos empleados en oftalmología, las prótesis oculares, también denominadas “ojos artificiales”, continúan teniendo una gran vigencia, siendo un elemento indispensable para el bienestar psicosocial de las personas que han sufrido la pérdida de un globo ocular.

Durante siglos se ha intentado mejorar el aspecto que aporta este tipo de prótesis, tratando de semejarse a un ojo sano, al perfeccionar sus colores, matices y volumen. El empleo de nuevos materiales y de nuevos dispositivos y técnicas quirúrgicas, han permitido que en los últimos años se haya alcanzado un grado aceptable, aunque variable, de tolerancia, satisfacción y confort para los pacientes anoftálmicos. Es precisamente en la optimización del uso y tolerancia de los ojos artificiales donde hemos decidido centrar nuestra atención, teniendo en cuenta dos factores principales:

- a. Por un lado, la prótesis ocular, como cuerpo extraño de tamaño considerable, en contacto permanente con la mucosa conjuntival puede provocar alteraciones inflamatorias de la misma, induciendo, previsiblemente, cambios en la microbiota local. A su vez, la alteración de la flora conjuntival con la presencia de bacterias no habituales, puede favorecer la inflamación de la conjuntiva y la sintomatología adversa para el paciente.
- b. Por otro lado, los implantes orbitarios son unos dispositivos clave para alcanzar un beneficio estético y, además, parecen mejorar la tolerancia de las prótesis oculares. Estos elementos reponen el volumen perdido tras la extirpación del globo ocular, mejorando la motilidad del ojo artificial y disminuyendo la incidencia del síndrome post-enucleación. Además, al permitir una disminución del tamaño de la prótesis ocular, previsiblemente favorece que se produzcan menos cambios tanto en la mucosa como en la flora conjuntival. No obstante, los implantes orbitarios pueden ser a su vez fuente de complicaciones, como son la exposición de los mismos o su posible contaminación y consiguiente infección. Los microorganismos de la flora conjuntival pueden ser capaces de adherirse a los materiales artificiales provocando la colonización de los implantes durante su introducción o tras quedar expuestos. De este modo, se hace necesario controlar la capacidad de adhesión y formación de biofilms de la flora conjuntival en los materiales utilizados en estas prótesis. En caso contrario, el cirujano puede verse

abocado a la retirada quirúrgica del dispositivo y al debate de si realizar o no un nuevo implante y de qué material. En una situación de exposición del implante orbitario, la actitud terapéutica que adoptemos puede suponer la diferencia entre poder conservar el implante que el paciente porta o tener que realizar una cirugía para retirarlo, lo que supondrá un mayor daño a los tejidos orbitarios y un resultado estético final menos favorable.

Estos interrogantes, planteados en el caso específico de los pacientes anoftálmicos, pueden verse resueltos si establecemos la capacidad de adhesión y formación de biofilms de las bacterias de la flora conjuntival a los diferentes materiales protésicos utilizados. Además, los conocimientos obtenidos del estudio de la flora conjuntival y su capacidad de adhesión a diferentes superficies no sólo serán aplicables a los pacientes con anoftalmía, sino a una variedad ingente prótesis oftalmológicas, tanto de los anexos oculares como de otros tipos.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, nos hemos propuesto en este trabajo los siguientes objetivos:

1. Identificar a nivel microbiológico la flora conjuntival en pacientes portadores de prótesis ocular, tanto de su cavidad anoftálmica como de su ojo sano, y describir las posibles diferencias y relaciones de la flora conjuntival obtenida de los distintos espacios (pre-prótesis, retro-prótesis y ojo sano).
2. Cuantificar la densidad microbiana presente en la conjuntiva de la cavidad anoftálmica y del ojo sano, estudiando las posibles diferencias y correlaciones entre ellas.
3. Evaluar posibles factores modificadores de la flora conjuntival, tanto del ojo sano como de la cavidad anoftálmica, en función de las características de los pacientes (edad, sexo y enfermedades sistémicas de los pacientes), de la cavidad anoftálmica (lateralidad, causa y tiempo de anoftalmía, tipo de intervención quirúrgica, presencia o no de implante orbitario, valorando además la presencia de epífora o de obstrucción de la vía lagrimal de la cavidad, la presencia de moco o hiperemia de la conjuntiva y los tratamientos tópicos empleados), y características de la prótesis (antigüedad de la prótesis ocular actual, frecuencia de extracción para lavado y medios de limpieza empleados).

Objetivos

4. Valorar la posible influencia de los factores anteriores en la tolerancia subjetiva de la prótesis ocular.
5. Evaluar la posible asociación entre los distintos tipos de flora conjuntival y la tolerancia subjetiva de la prótesis ocular.
6. Determinar mediante antibiograma el mejor tratamiento antibiótico empírico en caso de infección del material protésico en los pacientes anoftálmicos.
7. Evaluar la capacidad de adhesión y formación de biofilm de las principales cepas de la flora conjuntival bacteriana a distintos materiales protésicos, así como estudiar las características de los biofilm bacterianos mediante microscopía electrónica de barrido, tanto *in vitro* como *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El desarrollo de este trabajo, dados los objetivos, se ha realizado en dos ámbitos: uno a nivel clínico, estudiando las características semiológicas y microbiológicas de pacientes anoftálmicos portadores de prótesis ocular; y otro, a nivel experimental, valorando la adhesión y formación de biofilms de distintas cepas bacterianas de la flora conjuntival sobre diferentes materiales con utilidad protésica.

1. Materiales y métodos clínicos

1.1. Diseño y tipo de estudio clínico

El estudio clínico propuesto para este trabajo, así como la hoja de recogida de datos y el consentimiento informado para participar en el estudio, fueron aprobados por la Comisión Ética de Investigación Clínica del Hospital Universitario de León. Todos los pacientes incluidos fueron informados verbalmente y por escrito de la finalidad del estudio, de las posibles molestias derivadas del mismo y del hecho de que los datos clínicos obtenidos podrían emplearse para la divulgación científica, siempre respetando los principios de la Declaración de Helsinki. Se registró la conformidad de todos los pacientes mediante la firma del documento de consentimiento informado.

Se diseñó un estudio transversal con dos fases:

1. Descriptiva, en la que se pretendía identificar la microbiota conjuntival en el ojo sano y en la cavidad anoftálmica de pacientes con prótesis ocular, diferenciando a su vez, entre flora pre-prótesis y retro-prótesis.
2. Analítica, en la que se valoró como posible como factor de riesgo para la alteración de la flora conjuntival la presencia de anoftalmía con prótesis ocular; y también considerando otras variables, como edad, tiempo de uso de la prótesis, o la presencia de una flora conjuntival anómala, como factores de riesgo para sufrir una mala tolerancia a la prótesis ocular.

1.2. Selección de los pacientes

1.2.1. Criterios de selección

Se reclutaron un total de 60 pacientes anoftálmicos, portadores de prótesis ocular durante un periodo mínimo de un mes y con sintomatología estable, incluyendo a los

que empleaban colirios antibióticos y/o corticoideos de forma continuada durante el mes previo a la toma de la muestra.

Se excluyeron a los pacientes anoftálmicos que no utilizaban prótesis ocular o que presentaban prótesis oculares deterioradas, exposición del implante orbitario, quistes conjuntivales o de cápsula de Tenon (Figura 41C), resolviendo estas patologías antes de la realización del frotis conjuntival. También se excluyó a los pacientes portadores de prótesis esclerales, ya que éstos no son anoftálmicos, y a los pacientes anoftálmicos bilaterales, dado que al no presentar un ojo sano éste no podía tomarse como control.

Como ojo control, se tomó el ojo sano contralateral de los 60 pacientes portadores de prótesis ocular.

1.2.2. Características epidemiológicas

Los datos epidemiológicos de cada uno de los pacientes estudiados incluyeron características demográficas (edad y sexo), lateralidad de la cavidad anoftálmica, y enfermedades sistémicas.

1.2.3. Retirada del estudio y uso de tratamientos concomitantes

Dado el carácter transversal del estudio, no se produjo ninguna pérdida de pacientes, ya que se realizó una única toma de muestras y el resto de exploraciones se practicaron en la misma consulta.

Respecto a los pacientes excluidos por presentar patologías concomitantes (véase punto 1.2.1 de Materiales y Métodos), estos se incorporaron al estudio tras realizar el tratamiento médico y/o quirúrgico correspondiente y cuando la situación clínica del paciente se mantuvo estable durante, al menos, un mes.

1.3. Evaluación oftalmológica. Variables a estudio

1.3.1. Anamnesis

Además de los datos epidemiológicos descritos en el punto 1.2.2 de Materiales y Métodos, se realizó una anamnesis interrogando a los pacientes y revisando su historia

clínica para conocer las siguientes variables: tiempo de anoftalmía y de uso de prótesis ocular, motivo de extracción ocular, tipo de procedimiento (evisceración o enucleación), presencia de implante orbitario y, en caso afirmativo, material, forma y tamaño, número de prótesis ocular actual y antigüedad de la misma, frecuencia de lavado y medios utilizados (agua y jabón de manos, suero fisiológico, jabón neutro, etc.), tratamientos tópicos oculares, tanto para el ojo sano como en la cavidad anoftálmica y tolerancia subjetiva (véase apartado siguiente).

1.3.2. Evaluación de la tolerancia de la prótesis ocular

La valoración del grado de confort de los pacientes anoftálmicos con su prótesis ocular resultaba muy importante para nuestro trabajo, al ser uno de los objetivos de nuestro estudio la valoración de los factores que pudieran influir en la tolerancia. Sin embargo, esta variable resultaba difícil de evaluar de forma objetiva, tanto para el paciente como para el observador.

Por ello, se les proporcionó a los pacientes una encuesta (Tabla 5), que debían completar antes de la anamnesis. El cuestionario constaba de cuatro preguntas con cinco posibles respuestas, y hacía referencia a la tolerancia subjetiva de su prótesis en el último mes. Para cada posible respuesta se le asignó un valor de 0 a 4 puntos (0 puntos si la respuesta era la opción “a”, 1 punto si era la opción “b”, y así sucesivamente), lo que hacía que el rango posible de puntuación fuera de 0 a 16 puntos. La puntuación total obtenida se tomó como dato del confort subjetivo del paciente con su prótesis ocular.

Para aquellos pacientes que, tras la exploración, se comprobaba que existía obstrucción de la vía lagrimal se anuló la segunda pregunta, que hacía referencia a la epífora en el ojo protésico, y se calculó la puntuación proporcional a cuatro preguntas, basándose en los puntos obtenidos con las otras tres preguntas.

Así, se definieron tres grados de tolerancia de la prótesis ocular: buena (puntuación de 0 a 5), regular (puntuación de 6 a 10) y mala (puntuación de 11 a 16).

Aunque la existencia de una puntuación podría hacer factible el estudio estadístico de la tolerancia como una variable cuantitativa, dado el carácter subjetivo de la misma, se decidió considerar siempre la tolerancia como una variable cualitativa que podía presentar las tres opciones (buena, regular o mala) antes mencionadas.

Tabla 5. Cuestionario de evaluación de la tolerancia de la prótesis ocular.

En su ojo con prótesis, durante EL ÚLTIMO MES...

1. ¿Se ha levantado con legaña abundante (ojo pegado)?

- a) Nunca
- b) Algún día
- c) La mitad de los días
- d) La mayoría de los días
- e) Todos los días

2. ¿Ha tenido lagrimeo? (lágrima limpia, sin moco espeso)

- a) Nunca
- b) Algún día
- c) La mitad de los días
- d) La mayoría de los días
- e) Todos los días

3. ¿Ha tenido secreción mucosa que le haya obligado a limpiarse durante el día?

- a) Nunca
- b) Algún día
- c) La mitad de los días
- d) La mayoría de los días
- e) Todos los días

4. ¿Ha presentado molestias como: picor, escozor, sensación de arenillas o cuerpo extraño?

- a) Nunca
- b) Algún día
- c) La mitad de los días
- d) La mayoría de los días
- e) Todos los días

Puntuación: a) 0 puntos; b) 1 punto; c) 2 puntos; d) 3 puntos; e) 4 puntos. Rango de puntuación de 0 a 16 puntos. Tolerancia: buena (de 0 a 5 puntos), regular (de 6 a 10 puntos) y mala (de 11 a 16 puntos).

1.3.3. Exploración biomicroscópica

Después de la recogida de la muestra conjuntival se valoró, mediante biomicroscopía por lámpara de hendidura (Topcon, SL-D7), el estado de la conjuntiva, estableciendo cuatro categorías de conjuntiva: sana, hiperémica, quística (presencia de quiste conjuntival o de cápsula de Tenon) o erosionada con exposición de implante orbitario. En el caso de conjuntivas con quistes o de exposición del implante orbitario, los pacientes fueron excluidos del estudio hasta resolver quirúrgicamente estas

patologías (Figura 41), por lo que la conjuntiva de los pacientes participantes en el estudio sólo se clasificó como sana o hiperémica (inflamada). También se registró la presencia de moco en la cavidad anoftálmica en el momento de la recogida.

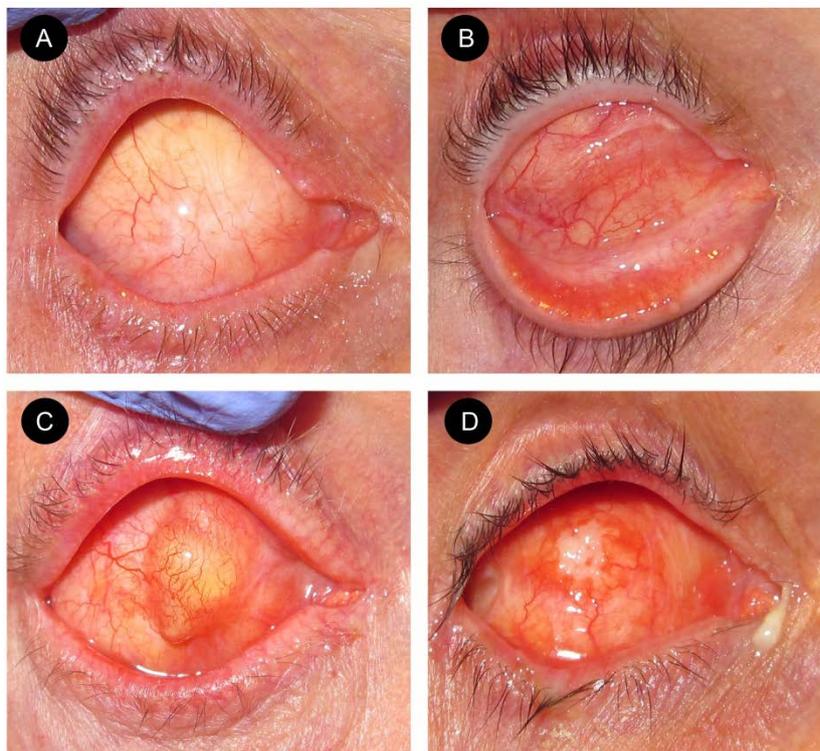


Figura 41. Diferentes tipos de conjuntiva en cavidades anoftálmicas. A. Conjuntiva sana. B. Conjuntiva hiperémica. C. Conjuntiva con quiste de cápsula de Tenon. D. Conjuntiva erosionada con disolución escleral y exposición del implante orbitario. (Colección particular del autor).

1.4. Evaluación microbiológica

A todos los pacientes incluidos en el estudio, tras realizar la anamnesis y antes de la evaluación biomicroscópica, se les tomó una muestra de la flora conjuntival, tanto del ojo sano como de la cavidad anoftálmica, y se estudió microbiológicamente.

1.4.1. Obtención de las muestras

Las muestras se obtuvieron mediante frotis conjuntival bilateral (del ojo sano y de la cavidad anoftálmica). En todos los casos se utilizaron guantes de látex estériles para disminuir la posibilidad de contaminación de la muestra. No se empleó medicación

tópica alguna, y se obvió el uso de anestésico, para evitar dañar los microorganismos de la flora conjuntival.

Para la realización del frotis, se empleó un hisopo estéril de rayón (Copan Diagnostics Inc, Murrieta, CA, USA) de 0,25 cm de grosor por 13 cm de largo (Figura 42), que fue humedecido en medio BHI (*Brain heart infusion*) introduciéndolo durante 2 segundos en un tubo roscado de 1,6 cm por 10,3 cm (Becton, Dickinson & Company, Franklin Lakes, NJ, USA) con 4 ml de medio BHI (Figura 43). El hisopo se pasó dos veces por el fondo de saco conjuntival inferior, desde la parte nasal a la lateral, evertiendo el párpado inferior y evitando el contacto con el borde libre palpebral. Una vez realizado el frotis, el hisopo se introdujo de nuevo en el mismo tubo con medio BHI, cortando con tijeras la varilla del hisopo con una longitud de aproximadamente 8 cm y dejando el tubo cerrado.



Figura 42. A. Tubo roscado con 4 ml de medio BHI (*Brain heart infusión*) previo a la toma de muestra de flora conjuntival. B. Hisopo estéril empleado para el frotis conjuntival.

Se tomaron tres muestras de cada paciente:

1. De la conjuntiva del ojo sano, siendo ésta la muestra de flora conjuntival control.
2. De la cavidad anoftálmica, sin retirar la prótesis ocular, considerando esta muestra como flora pre-prótesis.
3. Por último, se retiró la prótesis ocular empleando una ventosa (Figura 32) de protector ocular (FCI, Paris, Francia), para minimizar la manipulación en la cavidad, y se tomó una muestra mediante frotis de la mucosa conjuntival retro-protésica.

En total se recogieron 180 tubos. Cada tubo fue identificado con la etiqueta de historia clínica del paciente y se le rotuló un número, de 1 a 3, correspondiente a la muestra tomada: control, pre-protésica o retro-protésica. Posteriormente, se realizó la exploración biomicroscópica, descrita en el punto 1.3.3 de Materiales y Métodos.

1.4.2. Procesamiento de las muestras

Los tres tubos obtenidos de cada paciente fueron llevados al laboratorio de microbiología del Hospital Universitario de León, donde fueron cultivados en atmósfera aerobia a 37 °C, manteniéndose en estufa hasta 10 días. Se realizó una inspección de los mismos cada 24 h, tomándose directamente una alícuota para resembrar en caso de mostrar turbidez. Se realizó siembra en cada uno de los medios descritos en el punto 2.3.2 de Materiales y Métodos. Los tubos que durante 10 días no mostraban crecimiento microbiano se desecharon, informando el resultado del aislado como negativo, por lo que se consideraron estas muestras como cultivos negativos.

1.4.3. Identificación de los microorganismos

Los microorganismos obtenidos fueron identificados fenotípicamente en el servicio de Microbiología del Hospital Universitario de León empleando paneles MicroScan (Siemens, Munich, Alemania) o galerías API (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia).

1.4.4. Determinación de actividad antimicrobiana

La actividad antimicrobiana se determinó mediante la realización de un antibiograma, empleando paneles MicroScan (Siemens, Munich, Alemania) en aquellos microorganismos adecuados para su uso (estafilococos, enterococos y bacterias Gram negativas), y mediante discos de difusión en placa (Oxoid, Basingstoke, UK), en los casos restantes (ver apartado 6 de Resultados). Las CMI y los halos de inhibición se establecieron según los procedimientos establecidos por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) nº 17 y del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de 2010 y 2011.

Para la realización del antibiograma mediante discos de difusión en placa, se tomó una muestra con asa de cultivo de la cepa a estudio y se realizó un sembrado por extensión en superficie, en tres direcciones, sobre una placa de Petri con medio de cultivo adecuado para cada cepa. A continuación y siguiendo las pautas marcadas por el CLSI, se colocaron los discos de celulosa que contenían los antibióticos a evaluar, empleando un dispensador de presión y en condiciones de esterilidad. Se cultivaron durante 24 horas a 37°C y se analizaron los halos de inhibición obtenidos.

En el caso de los estafilococos, los enterococos y las bacterias Gram negativas, se emplearon paneles MicroScan (número 31 para estafilococos, número 32 para enterococos, número 53 para bacterias Gram negativas fermentadoras y número 54 para bacterias Gram negativas no fermentadoras). Tras tomar una muestra de la cepa con el inoculador del equipo del MicroScan, se introdujo en el frasco dilutor. Se mezcló suavemente por inversión 5 veces y se dejó reposar 1 minuto. Posteriormente se vertió el contenido del dilutor en la cubeta del inóculo, y se cubrió con su tapa. Esta permite, que al colocar el dispensador, se aspire la cantidad necesaria de inóculo. Posteriormente, se colocó el dispensador sobre la placa microtiter con los antibióticos y reactivos específicos de cada panel, y se sembraron los 96 pocillos. La placa microtiter se cubrió con su tapa, para evitar la evaporación y/o contaminación de los pocillos, y se incubó durante 24 horas a 37°C. Tras la incubación, fue medida por el lector automatizado, realizándose la interpretación del antibiograma por el sistema experto del equipo MicroScan.

1.4.5. Cálculo de la tasa de aislamiento global y por especie

Consideramos como tasa de aislamiento global (TAG) el porcentaje de individuos con al menos un cultivo positivo (ver apartado 4.1 de Introducción), respecto al número total de individuos de la muestra poblacional.

Para el cálculo de la tasa de aislamiento de cada especie (TAE) dividimos el número de cultivos positivos para una misma especie entre el número total de cultivos positivos para diferentes especies (Patillon *et al.*, 1978; Suto *et al.*, 2012). De esta manera los porcentajes de aislamiento de las distintas especies suman el 100 por 100, y consideramos que se distorsiona menos las frecuencias de aislamiento en estudios con una baja TAG.

1.4.6. Cuantificación de la densidad microbiana conjuntival

De forma aleatoria, se seleccionaron las muestras de 29 pacientes participantes para su análisis espectrofotométrico. A las 48 h de la recogida e incubación de la muestra, se tomó una alícuota de 200 μ l de cada uno de los tres tubos de cada paciente, se diluyó con 400 μ l de agua destilada y se midió la absorbancia a 540 nm empleando un espectrofotómetro Thermo Helios Delta VIS, disponible en el servicio de Inmunología del Hospital Universitario de León.

2. Materiales empleados en los estudios de adhesión y formación de biofilm.

2.1. Material biológico

Los estudios de adhesión bacteriana y formación de biofilms se realizaron utilizando ocho cepas bacterianas (Tabla 6): siete bacterias aeróbicas típicas de la flora conjuntival, y una octava, *Lactobacillus rhamnosus*, bacteria ácido-láctica intestinal que se utilizó como control, ya que su capacidad de adhesión y formación de biofilms ha sido ampliamente estudiada (Monteagudo, 2010).

Tabla 6. Origen y características de las cepas bacterianas estudiadas en este trabajo.

Cepa	Origen	Características clínicas	Referencias
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CECT	CECT 231	Microorganismos saprofíticos de la flora cutánea. Primer microorganismo causante de endoftalmitis postquirúrgicas. Responsable habitual de blefarconjuntivitis, infección de materiales protésicos y de sepsis en pacientes inmunocomprometidos y con catéteres.	Winslow y Winslow, 1908; Hugh y Ellis, 1968; Valenton y Okumoto, 1973; Moloney y Park, 2014; Namvar <i>et al.</i> , 2014
<i>Staphylococcus epidermidis</i> HL	Flora conjuntival de paciente del Hospital de León		
<i>Staphylococcus hominis</i>	Flora conjuntival de paciente	Microorganismo saprofítico de la flora cutánea. Existen casos aislados de endoftalmitis, endocarditis y sepsis en inmunodeprimidos.	Kloos y Musselwhite, 1975; Bowman y Buck, 1984; Iyer <i>et al.</i> , 2005
<i>Staphylococcus aureus</i>	Flora conjuntival de paciente del Hospital de León	Patógeno oportunista responsable de queratoconjuntivitis, endoftalmitis, abscesos, etc. Elevada resistencia a antibióticos.	Noble <i>et al.</i> , 1967; Blomquist, 2006
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CECT 4163	Microorganismo saprofítico de la flora cutánea. Se han descrito casos aislados de sepsis en inmunodeprimidos.	Collins <i>et al.</i> , 1988; Berner <i>et al.</i> , 1997
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	CECT 441	Microorganismo saprofítico de la flora cutánea y respiratoria. Germen nosocomial multi-resistente. Se asocia a queratitis, neumonitis, meningitis, etc. en pacientes hospitalizados.	Baumann <i>et al.</i> , 1968; Marcovich y Levartovsky, 1994; Murray y Hospenthal, 2005
<i>Serratia marcescens</i>	Flora conjuntival de paciente del Hospital de León	Patógeno oportunista causante de queratoconjuntivitis, neumonía, meningitis y sepsis. Elevada resistencia a antibióticos.	Atlee <i>et al.</i> , 1970; Duggan <i>et al.</i> , 1984
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 53103	Microorganismo probiótico. Inhibe desórdenes en el colon. Excepcionalmente puede ser patógeno respiratorio en inmunodeprimidos.	Knox, 1963; Isolauri <i>et al.</i> , 1991; Namnyak <i>et al.</i> , 1992

Las cuatro cepas procedentes de la flora conjuntival fueron obtenidas del frotis de pacientes sanos que acudieron a consulta de oftalmología y quisieron participar en un estudio previo para determinar el mejor método de recogida de flora conjuntival. Estas cepas fueron identificadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de León. Las otras cuatro cepas se tomaron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), y de la Colección Americana del Cultivos Tipo (ATCC). El origen y las características de las distintas cepas aparecen reflejados en la Tabla 6.

2.2. Reactivos

- Cristal violeta
- Galerías API (bioMérieux, Marcy l’Etoile, Francia)

- Discos antibióticos para antibiograma mediante difusión en placa (Oxoid, Basingstoke, UK)
- Dodecilsulfato sódico (SDS)
- Solución salina balanceada (BSS)
- Otros reactivos utilizados fueron de calidad analítica

2.3. Medios de cultivo

Se emplearon medios de cultivo elaborados en el laboratorio del Área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de León, según fórmula magistral, mientras que en el ámbito hospitalario se utilizaron medios de cultivo comerciales, obtenidos de distintos fabricantes.

2.3.1. Medios de cultivo elaborados

- Medio LB (*Luria Bertani*) empleado como medio líquido para la suspensión de las cepas liofilizadas obtenidas de la CECT.
 - o Composición del medio:
 - Triptona 10 g
 - Extracto de levadura 5 g
 - NaCl 10 g
 - Agua destilada 1 l
 - o Se ajustó el pH a 7,2.
- Medio NB (*Nutrient Broth*) empleado como medio sólido para el crecimiento inicial de *S. epidermidis* y *A. calcoaceticus*.
 - o Composición del medio:
 - Extracto de ternera 5 g
 - Peptona 10 g
 - NaCl 5 g
 - Agar 15 g
 - Agua destilada 1 l
 - o Se ajustó el pH a 7,2.

- Medio TSB (*Tryptic Soy Broth*): Empleado como medio de cultivo general en fase líquida.
 - o Composición del medio:
 - Peptona de caseína 17 g
 - Peptona de soja 3 g
 - NaCL 5 g
 - K₂HPO₄ 2,5 g
 - Glucosa 2,5 g
 - Agua destilada hasta 1 l
 - o Se ajustó el pH a 7,3.

- Medio TSA (*Tryptone Soy Agar*) como medio para el crecimiento general en fase sólida.
 - o Composición del medio:
 - Peptona de caseína 17 g
 - Peptona de soja 3 g
 - NaCL 5 g
 - K₂HPO₄ 2,5 g
 - Glucosa 2,5 g
 - Agar 15 g
 - Agua destilada hasta 1 l
 - o Se ajustó el pH a 7,3.

- Medio MRSA (*Man Rogosa Sharpe Agar*) como medio para el crecimiento en fase sólida de bacterias ácido-lácticas.
 - o Composición del medio:
 - Peptona de caseína 10 g
 - Lab-Lemco en polvo 8 g
 - Extracto de levadura 4 g
 - K₂HPO₄ 2 g
 - Glucosa 20 g
 - Tween 80 1 ml
 - Acetato sódico 5 g
 - Citrato triamónico 2 g

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g
 - $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,05 g
 - Agar 15 g
 - Agua destilada hasta 1 l
- Se ajustó el pH a 6,2.

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 121° durante 15 minutos.

2.3.2. Medios de cultivo comerciales

- Medio BHI (*Brain Heart Infusion*): Empleado como medio líquido inicial tras el frotis conjuntival. Fue adquirido a Becton, Dickinson & Company (Franklin Lakes, NJ, USA).
- Medio Agar sangre (Francisco Soria Melguizo S.A., Madrid, España): medio general de cultivo aerobio de microorganismos.
- Medio Agar chocolate (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia): medio enriquecido para cultivo de bacterias aerobias exigentes.
- Medio Agar manitol (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia): Medio selectivo para los cocos de las familias *Staphylococcaceae* y *Micrococcaceae*.
- Medio Agar MacConkey (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia): medio selectivo de enterobacterias (las sales biliares que contiene dificultan el desarrollo de bacterias Gram positivas y otras Gram negativas) y diferencial (distingue entre bacterias fermentadoras o no de lactosa).
- Medio Agar Schaedler (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia): medio de cultivo general para anaerobios.
- Medio Agar kanamicina-vancomicina (Francisco Soria Melguizo S.A., Madrid, España): medio selectivo para Gram negativos anaerobios.
- Medio Agar feniletanol-alcohol (Oxoid, Basingstoke, UK): medio selectivo para anaerobios, inhibiendo anaerobios entéricos y permitiendo el crecimiento del género *Bacteroides*.
- Medio Agar feniletil-alcohol (Oxoid, Basingstoke, UK): medio selectivo que inhibe a Gram negativos anaerobios facultativos y permite el desarrollo de anaerobios estrictos.

- Medio Agar bacteroides-bilis-esculina-amikacina (Reactivos para diagnóstico S.L., Sentmenat, España): medio selectivo para bacteroides del grupo *fragilis*.
- Agar Saboreaud (Francisco Soria Melguizo S.A., Madrid, España): medio general de cultivo para hongos.
- Agar Saboreaud-cloranfenicol (Francisco Soria Melguizo S.A., Madrid, España): medio selectivo para crecimiento de hongos (el cloranfenicol inhibe el crecimiento de bacterias y algunas especies de hongos del género *Candida*).

2.4. Materiales de bioadhesión

Como soporte para estudiar la adhesión y formación de biofilms se emplearon los siguientes materiales:

- PPAD (Porex Surgical Inc, Newman, GA, USA): facilitado por el laboratorio AJL (Miñano, España), en dos formatos:
 - o Poroso
 - o Semi-liso (una superficie porosa y la otra lisa)
- Silicona, de dos tipos:
 - o Capuchones: adquiridos a Saint-Gorain Verneret.
 - o Silicona de implante orbitario esférico (FCI, Paris, Francia).
- Resina acrílica polimerizada en forma de placas de 10 x 10 mm, del mismo tipo que la empleada en la fabricación de ojos artificiales, facilitada por la ocularista Dña. Mónica Pinotti (Valladolid).
- Cristal: en forma de placas de 10 x 10 mm mediante fabricación artesanal, empleando para ello portaobjetos de microscopio óptico.
- Acero inoxidable: en forma de láminas de 10 x 10 mm (Alfa Aesar, Heysham, UK) facilitado por el área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de León.
- Teflón: en forma de láminas de 10 x 10 mm (Alfa Aesar, Heysham, UK), facilitado por el área de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de León.

También se contempló utilizar otros materiales (conformadores oculares, láminas de poliestireno, metales nobles), posteriormente descartados por diversos motivos (tamaño, dificultad de la elaboración de placas, problemas de distribución,...).

3. Métodos empleados en los estudios de adhesión y formación de biofilm.

3.1. Inoculación inicial y condiciones generales de crecimiento

Las cepas obtenidas de la CECT y la ATCC, que se presentaban en forma liofilizada, fueron rehidratadas en medio LB y sembradas en placas de Petri con los medios y a las temperaturas recomendadas por la CECT y la ATCC (Tabla 7). Posteriormente, se comprobó que estas cepas crecían adecuadamente en medio TSA a 37°C, por lo que para el resto de experimentos se empleó este medio y temperatura.

Las cepas obtenidas de pacientes de la consulta de oftalmología mediante frotis conjuntival, se sembraron directamente en placas de Petri con TSA y se cultivaron a 37°C.

Tabla 7. Medios de cultivo y temperaturas recomendadas para las cepas obtenidas de la CECT y ATCC.

Cepa	Código	Medio recomendado	Temperatura recomendada
<i>Staphylococcus epidermidis</i> CECT	CECT 231	<i>Nutrient Broth</i>	37 °C
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	CECT 441	<i>Nutrient Broth</i>	30°C
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	CECT 4163	TSA	30°C
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 53103	MRSA	30°C

3.2. Mantenimiento de las cepas

Las cepas descritas en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos fueron almacenadas con el fin de mantenerlas genéticamente estables y para conservar su viabilidad durante periodos prolongados de tiempo. Para ello, las cepas, una vez crecidas en placas de Petri, se sembraron en medio TSB a 37° en agitación, durante 24 horas. Posteriormente, se guardaron en viales de congelación de 1 ml tomando alícuotas de 500 µl de cultivo a las que se les añadió 500 µl de glicerol puro, manteniéndose estos viales a -80°C.

3.3. Determinación del crecimiento bacteriano

Para determinar las curvas de crecimiento bacteriano, se tomó una alícuota de cada una de las cepas guardadas a -80°C con glicerol y se incubaron en medio TSA

durante 24 horas. Posteriormente, se realizó un pase a tubos inclinados con TSA y, después de su incubación a 37°C durante 24 horas, las células se resuspendieron en 5 ml de agua destilada estéril. Se ajustó la dilución hasta obtener una concentración celular con densidad óptica (D.O.) a 540 nm de 1. De este preinóculo se tomó 1 ml y se depositó en un matraz de 250 ml con 50 ml de medio TSB que fue cultivado a 37°C en agitación. Cada 2 horas se extrajo una alícuota para determinar el crecimiento bacteriano, midiendo por triplicado la absorbancia a 540 nm hasta las 40 horas de incubación, empleando un espectrofotómetro Beckman, modelo DU640.

3.4. Valoración de la capacidad de adhesión y de formación de biofilm

3.4.1. Cinética de adhesión bacteriana

Para cuantificar en las cepas a estudio la formación de biofilm se tomaron 100 µl de cada una de las cepas guardadas en glicerol a -80°C, se sembraron en tubos Falcon de 50 ml con 5 ml de medio TSB y se incubaron en agitación a 37°C hasta alcanzar el final de la fase exponencial, establecida mediante la determinación previa de la curva de crecimiento de cada cepa.

A continuación, se realizaron diluciones con agua destilada y mediciones en el espectrofotómetro a 540 nm hasta obtener una suspensión bacteriana D.O. 1. De esta suspensión, se inocularon 20 µl en cada pocillo de una placa de poliestireno de 96 pocillos con 180 µl de medio TSB. La placa sembrada se mantuvo a 37°C sin agitación durante 4, 6, 8, 12, 24, 36 y 48 horas, para establecer una curva de formación de biofilm, para cada cepa. Cada experimento se repitió 6 veces con cada cepa.

La cuantificación del biofilm se realizó mediante el método de tinción con cristal violeta (Danese *et al.*, 2000) con algunas modificaciones (Torres *et al.*, 2002; Kubota *et al.*, 2008; Navasa, 2009). En primer lugar se eliminó el sobrenadante de los pocillos y se lavaron tres veces cada uno de ellos con 200 µl de tampón fosfato salino (PBS) realizado según fórmula magistral (NaCl: 8 g; KCl: 0,2 g; Na₂HPO₄: 1,44 g; KH₂PO₄: 0,24 g en 1 l de H₂O; ajustando el pH a 7,4 y esterilizado en autoclave a 121°C durante 15 minutos). Posteriormente, se dejó secar la placa, colocándola invertida sobre papel secante durante 10 minutos. A continuación se depositaron 125 µl de solución de cristal violeta al 0,1% en cada pocillo y se mantuvo la placa en reposo durante 30 minutos a

temperatura ambiente. Después de eliminar el colorante, se lavó cada uno de los pocillos con 200 μ l de PBS dos veces y se dejó secar la placa, invertida sobre papel secante, durante otros 10 minutos. Por último, se añadieron 200 μ l de etanol puro para disolver el colorante y se cuantificó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas *microtiter* Anthos 2020.

3.4.2. Cuantificación de la adhesión bacteriana sobre diferentes materiales

Para valorar la resistencia de diferentes compuestos a la formación biofilm por las bacterias de la flora conjuntival, se emplearon plaquitas de 10 x 10 mm de productos empleados en la fabricación de prótesis oculoplásticas: PPAD poroso, PPAD semi-poroso, silicona de implante orbitario y resina acrílica de prótesis ocular; y otros materiales disponibles y con características de adhesión ya estudiadas previamente (Navasa, 2009): acero, teflón, cristal y silicona de capuchones. Cada uno de estos 8 materiales se evaluó por triplicado para una misma cepa, manipulando 24 plaquitas en total en cada experimento. La obtención de estos materiales aparece descrita en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos.

De forma previa a cada experimento, se limpió todo el material siguiendo las indicaciones descritas por Merritt *et al.* (1998) con algunas modificaciones. El material fue sonicado durante 30 minutos en agua destilada. A continuación, se dejó secar y se esterilizó mediante inmersión en etanol al 70% durante 10 minutos. Dado que varios materiales se degradaban por el calor, se comprobó mediante un experimento previo en aquellos materiales esterilizables en autoclave (acero y cristal) que no existían diferencias en cuanto a la adhesión bacteriana en función de si la esterilización del material se realizaba con etanol al 70% o mediante autoclave.

Tras sumergir los materiales en etanol, se lavaron con agua destilada estéril y se colocaron en una placa de poliestireno de 24 pocillos, tapada y dejándola secar durante 12 horas a 37°C. Posteriormente, se añadió 1,9 ml de TSB y 100 μ l de la suspensión bacteriana a estudiar con D.O. a 540 nm igual a la unidad, y se dejó incubar 12 horas a 37°C sin agitación.

Los materiales porosos (PPAD poroso y semi-poroso) tendían a flotar en el TSB, por lo que fueron fijados al pocillo utilizando una lámina de 10 x 10 mm de parafina, también esterilizada con etanol al 70%. Se comprobó, mediante un experimento previo con los otros materiales que no flotaban, que la fijación con parafina no producía diferencias en la adhesión bacteriana. La parafina se adhiere con firmeza al poliestireno y también a la plaquita de material, al aplicar una ligera presión.

Después del periodo de incubación, se recogió 1 ml del sobrenadante para cuantificar el crecimiento bacteriano midiendo su D.O. a 540 nm. Posteriormente, se procedió a extraer el resto del TSB de cada pocillo, evitando tocar la plaquita de material, y por último, se extrajo cada material con pinzas estériles. Se lavaron las células no adheridas, pero situadas en la superficie del material, con 2 ml de agua destilada estéril y, depositando cada material en un tubo de 50 ml con 1 ml de PBS (ver apartado 3.4.1 de Materiales y Métodos), se resuspendieron las células adheridas agitando durante 10 segundos en un vórtex a potencia suave.

A continuación, se tomó una alícuota de 100 μ l del PBS de la suspensión celular y se realizaron diluciones seriadas incubando en placas de Petri con medio TSA a 37°C durante 12 horas. Posteriormente se hizo el recuento de UFC (Monteagudo, 2010).

El número de células adheridas se calculó refiriéndolo a la unidad de superficie del material utilizado.

3.5. Estudio microscópico

El Microscopio Electrónico de Barrido (MEB) proporciona imágenes de las superficies con alta plasticidad tridimensional. Para ello, es necesario preservar la superficie de la muestra, pues la desecación, la presencia de artefactos o la pérdida de orientación nos impedirán obtener un estudio correcto.

En la preparación de las muestras se siguió el siguiente procedimiento:

1. Selección y recogida de la muestra: se exploraron muestras abióticas (los materiales a estudio, descritos en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos) y biológicas (el biofilm formado por diferentes cepas bacterianas cultivadas

sobre plaquitas de teflón, y las muestras obtenidas de los implantes orbitarios expuestos de tres pacientes anoftálmicos).

2. Limpieza de la muestra: Se realizó un lavado con PBS de las plaquitas de teflón con biofilm y con BSS en el caso de los implante orbitarios expuestos. En los materiales de bioadhesión no se realizó lavado de su superficie, ya que fueron esterilizados.
3. Fijación de la muestra: El protocolo convencional es la fijación química. Las muestras biológicas (bacterias sobre placas de teflón y prótesis) se fijaron, en primer lugar, con glutaraldehído al 2,5% en PBS durante 2 horas a 4°C. Este producto se obtuvo a partir de una solución comercial al 25% de glutaraldehído grado microscopía electrónica de TAAB Laboratories (England, UK) en solución salina tamponada con fosfatos a un pH 7,4 de SIGMA (St. Louis, USA). Se lavaron tres veces con el mismo tampón durante 30 minutos cada lavado. A continuación, se postfijaron en oscuridad y a temperatura ambiente con tetróxido de osmio al 2% de TAAB Laboratories en PBS durante dos horas. Para finalizar, se realizaron tres lavados de 30 minutos con el mismo PBS.
4. Deshidratación de la muestra: Las muestras se deshidrataron en cadena de etanol acuoso de Panreac Química (Barcelona, España) a concentraciones crecientes durante 30 minutos cada paso (30%, 50%, 70%, 90%, 3 x 96% y 3 x 100%).
5. Secado de la muestra: Se realizó siguiendo el “método del punto crítico”, mediante el cual se sometió a la muestra a valores de presión y temperatura a partir de los cuales la densidad del gas es la misma que la del líquido, para pasar directamente de fase líquida a gaseosa sin límites visibles y sin fuerzas de distorsión. En nuestro caso, se precisaba intercambiar el etanol absoluto por un líquido en el que se alcanzara fácilmente el punto crítico, siendo el CO₂ (31 °C y 73,8 bares) el fluido empleado. De este modo, se realizó el secado de las muestras utilizando un desecador de punto crítico modelo CPD 030 de BAL-TEC Inc. (Principado de Liechtenstein). Dado que las muestras desecadas son muy higroscópicas, se procedió a su recubrimiento metálico inmediatamente.
6. Recubrimiento metálico: la superficie de las muestras a observar en el MEB deben ser conductoras eléctricas, a fin de evitar la formación de cargas que

perturben la imagen y para obtener una mejor emisión de electrones secundarios, fundamentales en la formación de las características imágenes con aspecto tridimensional. Para ello, las piezas se montaron previamente con una cola conductora sobre soportes cilíndricos metálicos, adecuados para introducir en el MEB y se creó una superficie conductora utilizando un aparato de pulverización catódica de átomos de oro modelo SCD 004 de BALZERS Union Limited (Principado de Liechtenstein).

7. Obtención de las imágenes: las muestras así preparadas se introdujeron en el MEB. Las imágenes digitales se obtuvieron a distintos aumentos utilizando un MEB modelo JSM-6480 LV de JEOL (Tokio, Japón), perteneciente al servicio de Microscopía de la Universidad de León.

4. Análisis estadístico

Las variables a estudio fueron analizadas con el programa SPSS 15.0 para Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) y los gráficos realizados con el programa GraphPad Prism 5 para Windows (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA, USA).

La estadística descriptiva de las variables cuantitativas con distribución normal se realizó mediante la media de las observaciones y su desviación estándar (SD). En el caso de no existir una distribución normal, las variables cuantitativas se transformaron en cualitativas, agrupando los datos en tres grupos en base a su percentil 33 y 66.

Las variables cualitativas se analizaron, en general, con el test de Chi-cuadrado (χ^2). Se empleó la corrección por continuidad de Yates en aquellas tablas de contingencia de 2 x 2 en las que χ^2 no resultaba aplicable (al existir en la tabla de frecuencias esperadas alguna celda con valor inferior a 1 o más de un 20% de las celdas con frecuencias esperadas inferiores a 5). En el caso de no cumplirse las condiciones para aplicar el test de χ^2 y tratarse de tablas mayores de 2 x 2, se comprobó la significación estadística analizando la corrección por razón de verosimilitud. Se realizó un análisis de las causas de la significación en aquellas tablas de contingencia que, después de aplicar el test de χ^2 , presentaron diferencias estadísticamente significativas.

Para el análisis de variables cuantitativas distribuidas en dos grupos se empleó el estadístico t de Student para muestras independientes, si las varianzas se estimaban iguales (cuando el test de Levene mostraba un valor de p del 5% o mayor). En el caso de presentar diferencias significativas en sus varianzas se aplicó el test de Welch. Para comparar variables cuantitativas obtenidas del mismo ojo (en el caso de las cavidades anoftálmicas con ojo protésico) se empleó el test t de Student para muestras apareadas.

El estudio de variables cuantitativas distribuidas en tres o más grupos, se realizó empleando un test de análisis de la varianza (ANOVA) de una vía (Fisher, 1925; Norton y Strube, 1985), constatando previamente que existía homogeneidad en las varianzas (homocedasticidad) mediante el estadístico de Levene (O'Neill y Mathews, 2002) y realizando, posteriormente, un estudio de comparaciones múltiples con el test de Bonferroni (Keselman y Leventhal, 1974). En el caso de existir diferencias significativas en las varianzas (heterocedasticidad), se empleó el test de Kruskal-Wallis, con el análisis de comparaciones múltiples T3 de Dunnett (Kajla *et al.*, 2014). Para analizar la posible correlación entre variables cuantitativas, se calculó el coeficiente de Pearson.

Todos los análisis estadísticos fueron bilaterales y el nivel de significación se estableció en el 5%.

RESULTADOS

1. Identificación microbiológica de la flora conjuntival en pacientes portadores de prótesis ocular

1.1. Características epidemiológicas de los pacientes incluidos

La valoración de las características epidemiológicas de los pacientes y su repercusión en la flora conjuntival, era uno de los objetivos de nuestro estudio. Los datos recogidos en cuanto a edad, sexo y lado de anoftalmía de los 60 pacientes estudiados se muestran en la Tabla 8. La edad media fue de 61,9 años (SD: 16,4; rango: 25-89), 36 pacientes eran varones (60,0%) y 24 eran mujeres (40,0%). Respecto a la lateralidad de la anoftalmía, 24 pacientes tenían su cavidad anoftálmica en el lado derecho (40,0%) y 36 en el lado izquierdo (60,0%).

Tabla 8. Características epidemiológicas de los pacientes incluidos en el estudio.

Características epidemiológicas	
	Años \pm SD (rango)
Edad	61,9 \pm 16,4 (25-89)
	n (%)
Sexo	
Varones	36 (60)
Mujeres	24 (40)
Lado anoftalmía	
Derecho	24 (40)
Izquierdo	36 (60)

En cuanto a las enfermedades sistémicas y su correspondiente tratamiento, encontramos a 16 pacientes (26,7%) que no tomaban medicación alguna, mientras que los 44 restantes (73,3%) tomaban al menos un fármaco sistémico de forma habitual. Las enfermedades más habituales de este subgrupo fueron (por orden de frecuencia): hipertensión arterial, hipercolesterolemia, diabetes mellitus y depresión, quedando recogidas el resto de enfermedades registradas en la Tabla 9.

De los 60 pacientes sólo 4 (6,7%) presentaban alguna alergia a medicamentos: antibióticos (quinolonas y amoxicilina) y AINE (metamizol y ácido acetilsalicílico).

Tabla 9. Enfermedades sistémicas registradas en los pacientes incluidos en el estudio.

Enfermedades sistémicas	n (%)
Hipertensión arterial	30 (50,0)
Hipercolesterolemia	14 (23,3)
Diabetes mellitus	8 (13,3)
Depresión psíquica	8 (13,3)
Hernia de hiato	6 (10,0)
Isquemia cardíaca	4 (6,7)
Artrosis	4 (6,7)
Osteoporosis	3 (5,0)
Hiperuricemia	3 (5,0)
Hipotiroidismo	3 (5,0)
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica	3 (5,0)
Fibrilación auricular	2 (3,3)
Isquemia cerebral	2 (3,3)
Asma bronquial	2 (3,3)
Síndrome de apnea obstructiva del sueño	1 (1,7)
Hepatitis B	1 (1,7)
Hiperplasia benigna de próstata	1 (1,7)
Rosácea	1 (1,7)
Temblor esencial	1 (1,7)
Artritis reumatoide	1 (1,7)
Sin tratamiento sistémico ni patología conocida	16 (26,7)

1.2. Flora conjuntival en los ojos sanos

La obtención de material conjuntival de las cavidades anoftálmicas, su cultivo e identificación de los microorganismos, se realizaron siguiendo la metodología descrita previamente (ver apartado 1.4 de Materiales y Métodos). Las muestras se cultivaron con el fin de aislar todos los posibles microorganismos presentes en el material conjuntival. De ellas, se consiguió al menos un cultivo positivo (ver apartado 4.1 de Introducción) de su ojo sano en 51 pacientes (TAG: 85%), alcanzando un total de 62 cultivos positivos, e identificando 14 especies microbianas diferentes (Tabla 10). El tiempo medio de incubación que se necesitó para conseguir turbidez en el medio BHI, en los cultivos positivos, fue de 47,5 horas (SD: 35,1). Todos los microorganismos obtenidos de los cultivos fueron bacterias aerobias o anaerobias facultativas, no aislándose hongos ni bacterias anaerobias estrictas.

Tabla 10. Microorganismos aislados del ojo sano.

Microorganismos	n (TAE %)
SCN	
<i>Staphylococcus capitis</i>	2 (3,2)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	40 (64,5)
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	2 (3,2)
<i>Staphylococcus warneri</i>	4 (6,5)
SCP	
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 (8,1)
CORINEFORMES	
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1 (1,6)
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	1 (1,6)
<i>Corynebacterium striatum</i>	1 (1,6)
MICROCOCOS	
<i>Micrococcus luteus</i>	1 (1,6)
ESTREPTOCOCOS	
<i>Streptococcus oralis</i>	1 (1,6)
<i>Streptococcus parasanguis</i>	1 (1,6)
ENTEROCOCOS	
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (1,6)
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS	
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (1,6)
<i>Moraxella spp</i>	1 (1,6)

n: Número de cultivos aislados. TAE: Tasa de aislamiento por especie.

1.3. Flora conjuntival en las cavidades anoftálmicas

Los cultivos de los microorganismos presentes en los hisopos obtenidos de las cavidades anoftálmicas y la posterior identificación de los mismos se realizaron del mismo modo que para las muestras de los ojos sanos contralaterales (ver apartado 1.4 de Materiales y Métodos). De las cavidades anoftálmicas se tomaron dos muestras, una sin retirar la prótesis ocular, para estudiar la flora pre-prótesis, y otra después de retirar cuidadosamente la prótesis ocular, empleando una ventosa, para valorar la flora retro-prótesis.

De los 60 hisopos de frotis conjuntival obtenidos sin retirar la prótesis ocular, solamente hubo 3 cultivos negativos (ver apartado 4.1 de Introducción), obteniéndose 93 cultivos positivos e identificando 29 especies microbianas diferentes (Tabla 11).

Resultados

Tabla 11. Microorganismos aislados de la cavidad anoftálmica.

Microorganismos	Flora pre-prótesis n (TAE %)	Flora retro- prótesis n (TAE %)
SCN		
<i>Staphylococcus capitis</i>	1 (1,1)	1 (1,0)
<i>Staphylococcus capitis ureolyticus</i>	1 (1,1)	3 (3,1)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	44 (47,3)	42 (43,8)
<i>Staphylococcus hominis</i>	0	1 (1,0)
<i>Staphylococcus lentus</i>	1 (1,1)	0
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	1 (1,1)	2 (2,1)
<i>Staphylococcus schleiferi schleiferi</i>	1 (1,1)	0
<i>Staphylococcus simulans</i>	1 (1,1)	1 (1,0)
<i>Staphylococcus warneri</i>	2 (2,2)	5 (5,2)
SCP		
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 (11,8)	11 (11,5)
<i>Staphylococcus intermedius</i>	0	1 (1,0)
CORINEFORMES		
<i>Corynebacterium macginleyi</i>	1 (1,1)	0
<i>Corynebacterium pseudodiphtheriticum</i>	0	1 (1,0)
<i>Cellulomonas spp</i>	1 (1,1)	0
<i>Dermobacter hominis</i>	0	1 (1,0)
MICROCOCOS		
<i>Micrococcus spp</i>	1 (1,1)	0
ESTREPTOCOCOS		
<i>Streptococcus acidominimus</i>	1 (1,1)	0
<i>Streptococcus mitis</i>	3 (3,2)	3 (3,1)
<i>Streptococcus oralis</i>	6 (6,5)	5 (5,2)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (1,1)	1 (1,0)
Otros <i>Streptococcus</i> grupo <i>viridans</i>	3 (3,2)	4 (4,2)
ENTEROCOCOS		
<i>Enterococcus faecalis</i>	1 (1,1)	1 (1,0)
<i>Enterococcus faecium</i>	1 (1,1)	0
BACTERIAS GRAM NEGATIVAS		
<i>Alcaligenes spp</i>	1 (1,1)	1 (1,0)
<i>Cellulomonas spp</i>	0	0
<i>Enterobacter intermedium</i>	0	1 (1,0)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1 (1,1)	2 (2,1)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (1,1)	1 (1,0)
<i>Moraxella spp</i>	0	1 (1,0)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (2,2)	2 (2,1)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1 (1,1)	0
<i>Serratia liquefaciens</i>	1 (1,1)	1 (1,0)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2 (2,2)	2 (2,1)
<i>Veillonella parvula</i>	1 (1,1)	0
HONGOS		
<i>Candida parapsilosis</i>	1 (1,1)	1 (1,0)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0	1 (1,0)

n: Número de cultivos aislados. TAE: Tasa de aislamiento por especie.

Los hisopos obtenidos de la flora retro-prótesis fueron todos ellos positivos, alcanzando los 96 cultivos e identificando 25 especies diferentes. En total se obtuvieron, de las cavidades anoftálmicas, un total de 35 especies microbianas diferentes (Tabla 11).

La TAG fue del 95,0% para la flora pre-prótesis y del 100% para la flora retro-prótesis. El tiempo medio necesario para conseguir turbidez en los tubos de BHI fue de 29,9 horas (SD: 13,1) para las muestras pre-prótesis y de 27,2 (SD: 9,3) para las muestras retro-prótesis.

Como puede observarse en la Tabla 11, el grupo de microorganismos más abundante en la cavidad anoftálmica fue el del género estafilococo, siendo la especie más comúnmente aislada *S. epidermidis*, seguida de *S. aureus*. Los estreptococos y las bacterias Gram negativas, tanto aerobias como anaerobias facultativas, aparecieron también ampliamente representadas, en detrimento de las bacterias corineformes cuyo aislamiento resultó escaso (menos de un 3% del total de cultivos). Sólo se pudo cultivar una especie bacteriana anaerobia estricta (*Veillonella parvula*), y dos especies de hongos (*Candida parapsilosis* y *Saccharomyces cerevisiae*).

1.4. Comparación de la flora conjuntival pre-prótesis, retro-prótesis y del ojo sano contralateral

Una vez descritas las características cualitativas de la microbiota identificada en los ojos sanos y en las cavidades anoftálmicas, se procedió a la comparación de la microflora de los diferentes espacios conjuntivales, valorando tres parámetros: tiempo medio requerido para alcanzar turbidez en el medio BHI, composición por grupos de microorganismos y capacidad patogénica de estos.

1.4.1. Comparación de la flora conjuntival en función del tiempo requerido para el crecimiento microbiano

En cada paciente se registró el tiempo transcurrido desde la siembra hasta la observación de turbidez en el medio BHI, signo de crecimiento microbiano, para cada una de las tres muestras (ojo sano, flora pre-prótesis y flora retro-prótesis). Para evitar distorsionar las medias de tiempo de crecimiento, los cultivos que a los 10 días no

Resultados

mostraron turbidez, considerados cultivos negativos, se excluyeron de este análisis (Tabla 12).

Tras comparar los datos de los distintos espacios conjuntivales mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, al no existir homocedasticidad (ver apartado 4 de Materiales y Métodos), se encontró una diferencia significativa en el tiempo de crecimiento de los microorganismos de las distintas muestras ($p < 0,001$). La comparación por pares se realizó con el test T3 de Dunnett, siendo significativamente más lento el crecimiento de los microorganismos procedentes del ojo sano (47,5 horas) respecto a los que se obtuvieron de la cavidad anoftálmica, tanto pre-prótesis (29,9 horas), como retro-prótesis (27,2 horas); no encontrando diferencias en el tiempo de crecimiento de los dos espacios de la cavidad anoftálmica ($p = 0,493$).

Tabla 12. Tiempo medio requerido para observar turbidez en el medio BHI, según origen de la muestra.

Tiempo hasta conseguir crecimiento en pacientes con cultivo positivo	OJO SANO	CAVIDAD ANOFTÁLMICA		^a p
		Pre - prótesis	Retro - prótesis	
n	51	57	60	
Tiempo en horas \pm SD	47,5 \pm 35,1	29,9 \pm 13,1	27,2 \pm 9,3	< 0,001**

n: Número de cultivos aislados. ^a p-valor calculado con el test de Kruskal-Wallis. **Diferencia estadísticamente muy significativa.

Dado que la distribución del tiempo requerido para observar crecimiento microbiano, en las muestras de los distintos espacios conjuntivales, estaba muy alejada de la normalidad (Figura 43), se decidió reclasificar esta variable como cualitativa, distinguiendo dos posibilidades: crecimiento precoz, para aquellas muestras que presentaron turbidez en las primeras 24 horas, y crecimiento tardío para los tiempos restantes.

Así, se realizó una comparación entre variables cualitativas (Tabla 13), empleando como estadístico Chi-cuadrado (χ^2), con lo que se simplificaba la posterior comparación con otras variables. Al igual que en el análisis de la Tabla 12, se obviaron las muestras que no presentaron crecimiento.



Figura 43. Distribución, fuertemente asimétrica, del tiempo requerido para observar crecimiento en el medio BHI. Las muestras que no presentaron crecimiento fueron excluidas.

Posteriormente, se efectuó un análisis de las causas de la significación de la Tabla 13, que corroboró los datos obtenidos en la Tabla 12, al no encontrarse diferencias entre las muestras de la cavidad anoftálmica ($p = 0,169$), y siendo altamente significativa la mayor proporción de muestras de crecimiento tardío en el grupo de los ojos sanos ($p < 0,001$).

Tabla 13. Comparación de cultivos precoces y tardíos según origen de la muestra.

Tiempo hasta conseguir crecimiento en pacientes con cultivo positivo	OJO SANO	CAVIDAD ANOFTÁLMICA		^a p
		Pre - prótesis	Retro - prótesis	
n	51	57	60	< 0,001**
Muestras con cultivo precoz	26	45	53	
Muestras con cultivo tardío	25	12	7	

n: Número de cultivos aislados. ^a p-valor calculado con el test de Chi-cuadrado (χ^2). **Diferencia estadísticamente muy significativa.

1.4.2. Comparación de la flora conjuntival por grupos de microorganismos

La comparación de las microbiotas obtenidas de los diferentes espacios conjuntivales, requirió de la agrupación de los microorganismos, debido a las bajas tasas de aislamiento de algunas especies (Tablas 10 y 11). La estratificación de las especies

en diferentes grupos siguió criterios fisiológicos, fenotípicos y patogénicos, a fin de mantener la representatividad de la flora obtenida. Se establecieron 9 grupos del siguiente modo:

- 1) Dada la elevada TAE de diferentes tipos de estafilococos, se decidió crear varias divisiones dentro de este género. En primer lugar, se estableció un grupo constituido únicamente por *S. epidermidis* ya que fue la especie más frecuentemente aislada. Un segundo conjunto lo constituyeron los otros SCN (ver apartado 3.1.1 de Introducción) y un tercero los SCP.
- 2) El cuarto grupo se definió como bacterias corineformes. Bajo este término se incluyeron diversos géneros de actinomicetales saprofitos como *Corynebacterium spp*, *Cellulomonas spp* y *Dermabacter spp*, de acuerdo con la clasificación establecida por otros autores (Winn *et al.*, 2008; Bernard, 2012).
- 3) Los micrococos, dada su escasa presencia y sus características fisiológicas, se estableció en un grupo independiente.
- 4) El sexto conjunto agrupó a las bacterias del género *Streptococcus*.
- 5) El séptimo grupo incluyó a los cocos del género *Enterococcus*.
- 6) Los últimos tipos de microorganismos los formaron las bacterias Gram negativas y los hongos.

Según esta división de microorganismos se determinó, en cada uno de los espacios conjuntivales estudiados (pre-prótesis, retro-prótesis y ojo sano), el número de pacientes con cultivo positivo en cada grupo (Tabla 14). De esta forma se pudo realizar un análisis estadístico al crear una tabla de contingencia en la que se valora, para cada tipo de microorganismos, el número de pacientes con presencia de los mismos, en función del lugar de obtención de la muestra.

Dado que, en algunos casos, de una sola muestra de un paciente se cultivaron diferentes cepas pertenecientes a un mismo grupo de microorganismos, los datos de las Tablas 10 y 11 (número de cepas identificadas en los diferentes espacios conjuntivales) no se corresponden exactamente con los registrados en la Tabla 14 (número de pacientes con presencia de microorganismos de un grupo, según el área conjuntival estudiada). Así, por ejemplo, de una única muestra pre-prótesis se cultivaron dos cepas distintas de *S. epidermidis*, que diferían entre sí en el antibiograma. También se aislaron

Resultados

dos especies de SCP (*S. aureus* y *S. intermedius*) de la muestra retro-prótesis de un paciente, dos especies Gram negativas (*Alcaligenes spp* y *Enterobacter intermedium*) en el espacio retro-prótesis de otro sujeto y dos especies de hongos (*Candida parapsilosis* y *Saccharomyces cerevisiae*) en la muestra retro-prótesis de un tercer paciente.

Como se puede observar en la Tabla 14, se encontraron diferencias significativas en el número de pacientes con presencia de estreptococos, bacterias Gram negativas y negatividad del cultivo entre las diferentes muestras.

Tabla 14. Número de pacientes con cultivo positivo en los diferentes grupos de microorganismos, en ojos sanos y cavidades anoftálmicas.

FLORA	OJO SANO	CAVIDAD ANOFTÁLMICA		^a p
		Pre - prótesis	Retro - prótesis	
Nº pacientes con cultivo positivo por grupos de microorganismos				
<i>S. epidermidis</i>	40	43	42	0,833
Otros SCN	8	8	13	0,358
SCP	5	11	11	0,208
Corineformes	3	2	2	0,867
Micrococos	1	1	0	0,442
Estreptococos	2	14	13	0,004**
Enterococos	1	2	1	0,786
Bacterias Gram negativas	2	10	10	0,036*
Hongos	0	1	1	0,442
Nº de pacientes con cultivo negativo				
	9	3	0	0,004**

^a p-valor calculado con estadístico Chi-cuadrado (χ^2), aplicando la corrección por continuidad de Yates cuando era pertinente (ver apartado 4 de Materiales y Métodos). *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). **Diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0,01$). La suma de los valores de cada columna es superior al número de pacientes del estudio, dado que algunos pacientes resultaron con cultivos positivos para varias especies de diferentes grupos. De un modo similar, el número de pacientes con presencia de determinados grupos de microorganismos difiere del número de cepas aisladas (Tabla 11), ya que en algunos pacientes se obtuvieron varias especies pertenecientes al mismo grupo.

Al realizar un análisis de las causas de la significación, se observó que no existían diferencias significativas cualitativas entre la flora obtenida del espacio pre-prótesis y retro-prótesis (Tabla 15), y que la diferencia estadística recaía en la flora de los ojos sanos contralaterales, respecto a la cavidad anoftálmica.

Tabla 15. Pacientes con cultivo positivo en los diferentes grupos de microorganismos, obtenidos de las muestras de la cavidad anoftálmica.

FLORA	CAVIDAD ANOFTÁLMICA		^a p
	Pre - prótesis	Retro - prótesis	
Nº pacientes con cultivo positivo por grupos de microorganismos			
<i>S. epidermidis</i>	43	42	0,841
Otros SCN	8	13	0,230
SCP	11	11	1,000
Corineformes	2	2	1,000
Micrococos	1	0	1,000
Estreptococos	14	13	0,827
Enterococos	2	1	1,000
Bacterias Gram negativas	10	10	1,000
Hongos	1	1	1,000
Nº de pacientes con cultivo negativo	3	0	0,242

^a p-valor calculado con estadístico Chi-cuadrado (χ^2), aplicando la corrección por continuidad de Yates cuando era pertinente (ver apartado 4 de Materiales y Métodos).

Estas diferencias, entre ambas conjuntivas, fueron especialmente significativas en el caso de los estreptococos, en donde se pasó de sólo 2 pacientes con cultivo positivo en su ojo sano, a 14 y 13 pacientes en las muestras pre-prótesis y retro-prótesis de su cavidad anoftálmica, respectivamente. Las bacterias Gram negativas también variaron significativamente de 2 pacientes con cultivo positivo en su ojo sano, a 10 pacientes con presencia de estos microorganismos en su cavidad anoftálmica; así como el número de pacientes con cultivos sin crecimiento, siendo 9 en las muestras de ojos sanos y sólo 3 pacientes en las muestras pre-prótesis y ninguno en las retro-prótesis.

1.4.3. Comparación de la flora conjuntival por patogenicidad

Basándonos en los datos publicados por otros autores y en su posterior análisis (ver apartado 1.2 de Discusión), se establecieron como especies con baja patogenicidad los SCN, las bacterias corineformes y los micrococos, mientras que los SCP, los estreptococos, los enterococos, las bacterias Gram negativas y los hongos se definieron como especies de alta patogenicidad. De esta manera, se compararon, entre las diferentes muestras, el número de pacientes con al menos un cultivo positivo de especies consideradas patógenas (Tabla 16). Se comprobó una presencia mucho menor

de especies patógenas en los ojos sanos respecto a las cavidades anoftálmicas, siendo sólo 10 los pacientes con presencia de microorganismos patógenos en su ojo sano frente a 30 pacientes con patógenos en su muestra pre-prótesis y 31 en la muestra retro-prótesis, con un valor de p menor de 0,001.

Tabla 16. Flora aislada, según grupos de patogenicidad, en ojos sanos y cavidades anoftálmicas.

Nº pacientes con cultivo positivo para microorganismos según patogenicidad	OJO SANO	CAVIDAD ANOFTÁLMICA		^a p
		Pre - prótesis	Retro - prótesis	
Alta patogenicidad	10	30	31	< 0,001**
Baja patogenicidad	41	27	29	

^a p-valor calculado con estadístico Chi-cuadrado (χ^2). **Diferencia estadísticamente muy significativa.

2. Cuantificación de la densidad microbiana conjuntival

Siguiendo el método descrito en el apartado 1.4.6 de Materiales y Métodos se seleccionaron de forma aleatoria las muestras de 29 pacientes, en las que se midió la absorbancia espectrofotométrica, a 540 nm, del caldo BHI a las 48 horas de la recogida y cultivo de la muestra. De esta manera, se obtuvo una medida cuantitativa de la densidad microbiana de la flora de las cavidades anoftálmicas, tanto de la flora pre-prótesis ($0,402 \pm 0,323$) como retro-prótesis ($0,438 \pm 0,268$), y de los ojos sanos ($0,213 \pm 0,201$).

Los datos obtenidos se analizaron en primer lugar mediante un test de ANOVA de una vía (Figura 44), comprobando previamente que no existían diferencias significativas entre las varianzas mediante el test de Levene ($p = 0,276$). Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos ($p = 0,004$). Analizando los grupos entre sí con el test de comparación múltiple de Bonferroni, se constató una menor densidad óptica significativa entre las muestras obtenidas de los ojos sanos y las muestras tomadas de las cavidades anoftálmicas, tanto de las muestras del espacio pre-protésico ($p = 0,027$) como del espacio retro-protésico ($p = 0,006$). Estos resultados nos indican el mayor crecimiento microbiano en las muestras procedentes de la cavidad anoftálmica, respecto a las muestras obtenidas del ojo sano.

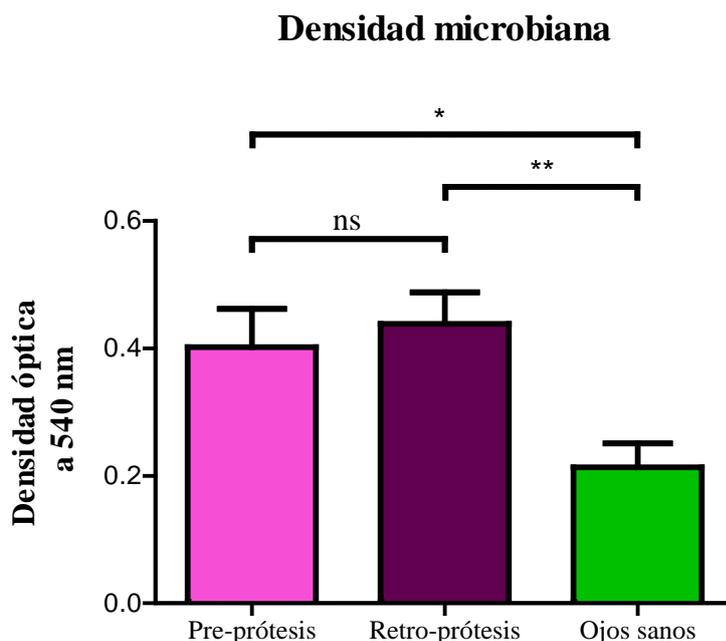


Figura 44. Resultados de la medida de la absorbancia de las muestras obtenidas de 29 pacientes. ns: no significativo. * Diferencia estadísticamente significativa ($p = 0,027$). ** Diferencia altamente significativa ($p = 0,006$).

Posteriormente, las medidas de las D.O. de los diferentes cultivos fueron analizadas estudiando las posibles relaciones entre ellas, empleando el test de correlación de Pearson. Se observó una correlación significativa entre la D.O. determinada en el espacio pre-prótesis y retro-prótesis ($p = 0,034$), con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,394 (Figura 45A). Además, se constató una dependencia muy significativa entre la D.O. procedente de las muestras pre-prótesis y la obtenida de los cultivos de los ojos sanos ($p = 0,008$), presentando un coeficiente de correlación de 0,482 (Figura 45B). Entre la D.O. retro-prótesis y la D.O. de los ojos sanos no se observó dependencia ($p = 0,836$).

Por último, se estudió el crecimiento alcanzado (valorado como D.O. $_{540\text{ nm}}$) en función de los grupos bacterianos presentes en las muestras (ver apartado 1.4.2 de Resultados), y en función de la patogenicidad de los mismos (ver apartado 1.4.3 de Resultados). En las 87 muestras de los 29 pacientes en los que se midió la D.O. del medio BHI a las 48 horas, se pudo comprobar que la existencia de microorganismos considerados patógenos se asoció con una mayor D.O. ($p = 0,007$), aunque al analizar cada grupo por separado esta diferencia no resultó siempre significativa (Tabla 17).

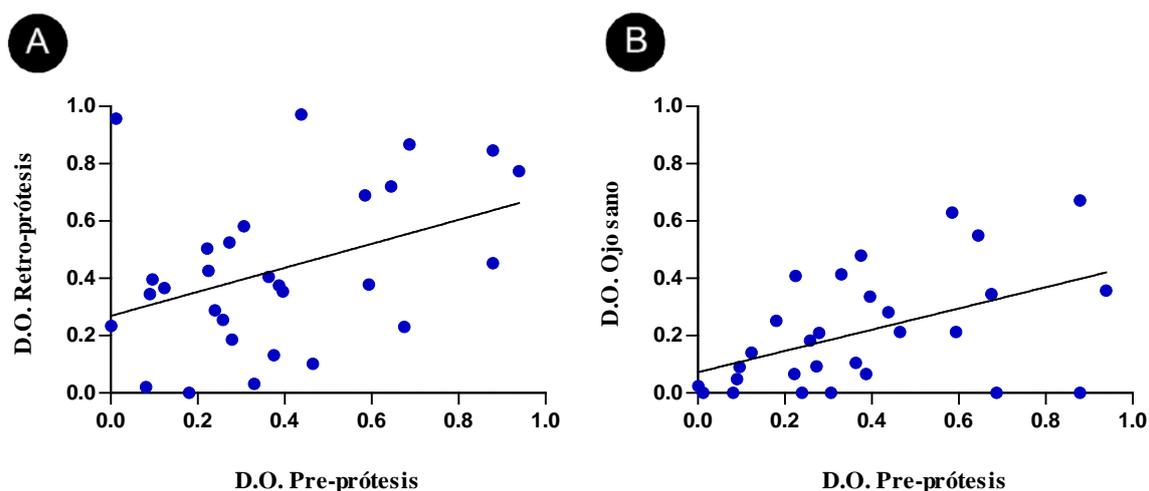


Figura 45. A. Gráfica que expone la correlación entre la absorbancia espectrofotométrica a 540 nm de los cultivos pre-prótesis y retro-prótesis a las 48 horas, donde se observó una correlación significativa ($p = 0,034$), con un coeficiente de correlación de Pearson de 0,394. B. Correlación entre la D.O. de los cultivos pre-prótesis y de las muestras de los ojos sanos. La relación entre ambas variables resultó estadísticamente muy significativa ($p = 0,008$), presentado un coeficiente de correlación R de 0,482.

Tabla 17. Absorbancia espectrofotométrica (D.O. $_{540\text{ nm}}$) de las muestras según grupo de microorganismos presentes y patogenicidad de los mismos.

D.O. en función de la presencia de los grupos de microorganismos	Muestras con crecimiento del grupo de microorganismos		Muestras sin crecimiento del grupo de microorganismos		^a p
	Grupo de microorganismos	n	D.O. Media \pm SD	n	
<i>S. epidermidis</i>	64	0,393 \pm 0,294	23	0,235 \pm 0,217	0,021*
Otros SCN	12	0,254 \pm 0,156	75	0,367 \pm 0,297	0,204
SCP	14	0,475 \pm 0,326	73	0,327 \pm 0,271	0,075
Corineformes	3	0,158 \pm 0,196	84	0,358 \pm 0,285	0,233
Micrococos	1	0,096 \pm -	86	0,354 \pm 0,284	-
Estreptococos	17	0,419 \pm 0,225	70	0,335 \pm 0,295	0,276
Enterococos	4	0,547 \pm 0,667	83	0,342 \pm 0,257	0,582
Bacterias Gram negativas	10	0,458 \pm 0,282	77	0,337 \pm 0,283	0,207
Hongos	2	0,777 \pm 0,127	85	0,341 \pm 0,279	0,031*
Microorganismos patógenos	37	0,444 \pm 0,326	50	0,281 \pm 0,227	0,007**

n: Número de muestras. ^a p-valor calculado con estadístico t de Student, cuando resultaba pertinente (ver apartado 4 de Introducción). *Diferencia estadísticamente significativa. **Diferencia estadísticamente muy significativa. La suma de las muestras de los grupos de microorganismos patógenos es superior a las muestras con microorganismos patógenos, al existir, en algunos casos, varias especies patógenas de distintos grupos en una misma muestra.

Así, aunque las muestras con crecimiento de otros SCN diferentes de *S. epidermidis*, al igual que las muestras con presencia de bacterias corineformes o con micrococos, presentaron una menor D.O. que las muestras en ausencia de estos microorganismos de baja patogenicidad, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Además, se observó que la presencia de *S. epidermidis* se asoció con un incremento significativo de la D.O. ($p = 0,021$), al contrario que los otros grupos considerados de baja patogenicidad.

Estas discordancias también se encontraron en los grupos de microorganismos definidos como patógenos, donde el crecimiento de hongos sí se relacionó con una D.O. significativamente mayor ($p = 0,031$), mientras que en el caso de los SCP, estreptococos, enterococos y bacterias Gram negativas, aunque presentaron una mayor D.O., ésta no fue significativa estadísticamente.

3. Factores modificadores de la flora conjuntival

Uno de los objetivos de nuestro estudio fue determinar posibles factores modificadores de la flora conjuntival. Para ello se contrastaron diferentes variables (características de los pacientes, de su cavidad anoftálmica y de su prótesis ocular) con los datos cualitativos y cuantitativos de la flora conjuntival (Tabla 18), tanto de la cavidad anoftálmica como del ojo sano contralateral.

Los datos cualitativos de la microbiota estudiados fueron: la precocidad en la turbidez de los cultivos (ver apartado 1.4.1 de Resultados), la falta de crecimiento en las muestras (ver apartado 4.1 de Introducción), y las especies aisladas, distribuidas en grupos de microorganismos (ver apartado 1.4.2 de Resultados) y en grupos de patogenicidad (ver apartado 1.4.3 de Resultados).

El análisis cuantitativo de la flora se realizó con los datos del crecimiento celular de las muestras de los 29 pacientes, seleccionados de forma aleatoria, en los que se analizó la D.O. $_{540\text{ nm}}$ del medio BHI a las 48 horas de incubación (ver apartado 2 de Resultados).

Resultados

Tabla 18. Variables evaluadas, tanto de los pacientes como de las muestras de flora conjuntival, para estudiar los factores modificadores de la flora conjuntival.

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES		VARIABLES EVALUADAS	
Características epidemiológicas		^a Edad	
		Sexo	
		Enf. Sistémicas	Ausencia de enfermedad sistémica
			Hipertensión arterial
			Hipercolesterolemia
			Diabetes mellitus
			Depresión
			Alergias conocidas a medicamentos
Características de la cavidad anoftálmica	Antecedentes personales de pérdida ocular	Lado de anoftalmía	
		Causa de anoftalmía	Traumatismo
			Endoftalmitis
			Otra causa
	Implante orbitario	^b Tiempo de anoftalmía	
		Tipo de procedimiento quirúrgico	
		Presencia de implante	
Estado actual de la cavidad anoftálmica	Estado del sistema lagrimal	^b Tamaño	
		Material	
	Inflamación de la cavidad anoftálmica	Epífora	
		Obstrucción de la vía lagrimal	
Tratamientos tópicos de la cavidad anoftálmica	Presencia de moco		
	Hiperemia conjuntival		
Características de la prótesis ocular		Ausencia de tratamiento tópico	
		Suero salino fisiológico	
		Lubricantes oculares	
		Colirios antibióticos	
		^b Antigüedad de la prótesis ocular	
		Primera prótesis empleada	
		Grado de manipulación de la prótesis	
		Método de lavado de la prótesis	
CARACTERÍSTICAS DE LA FLORA		VARIABLES EVALUADAS	
Crecimiento cualitativo		Crecimiento precoz en caldo BHI	
		Crecimiento de microorganismos	
		Grupos de microorganismos	<i>S. epidermidis</i>
			Otros SCN
SCP			
Corineformes			
Micrococos			
Estreptococos			
Enterococos			
Bacterias Gram negativas			
Hongos			
			Presencia de flora patógena
Crecimiento cuantitativo		^a Absorbancia espectrofotométrica	

^a Variables cuantitativas. ^b Variables cuantitativas reconvertidas a cualitativas por presentar una distribución alejada de la normalidad (ver apartado 3.2.3 de Resultados). El resto de las variables evaluadas fueron cualitativas dicotómicas.

3.1. Características epidemiológicas de los pacientes

3.1.1. Edad

Cuando se analizó la posible influencia de la edad del paciente sobre la flora conjuntival, se observó que los sujetos con presencia de microorganismos en el ojo sano eran significativamente mayores ($p = 0,044$) respecto a los pacientes con cultivo negativo (63,7 años $\pm 16,4$ frente a 51,9 años $\pm 12,8$), aunque en las muestras del espacio pre-prótesis no se confirmó este hallazgo (Tabla 19). También se observó una edad significativamente mayor (85,0 años $\pm 0,7$) en los dos pacientes con estreptococos en su ojo sano, respecto a los pacientes sin estreptococos en esa localización (61,1 años $\pm 16,1$), aunque al igual que en el caso anterior, las muestras obtenidas de la cavidad anoftálmica no mostraron esta diferencia. El resto de variables cualitativas de la flora no se relacionaron con la edad (Tabla 19), así como tampoco se observó una correlación entre la edad y la densidad microbiana medida como absorbancia espectrofotométrica.

3.1.2. Sexo

El estudio de las variables cualitativas y cuantitativas de la flora conjuntival (Tabla 18), no mostró diferencias significativas en las características de la microbiota entre hombres y mujeres.

3.1.3. Enfermedades sistémicas

Se confrontaron los datos de flora conjuntival, tanto cualitativos como cuantitativos, con las características de los pacientes respecto a sus enfermedades sistémicas, considerando: personas sanas (sin patologías conocidas y ausencia de tratamientos sistémicos), pacientes con hipertensión arterial, con hipercolesterolemia, diabéticos, con depresión, o alérgicos a algún medicamento, con los de los pacientes que no presentaban estas condiciones (Tabla 18). No se observó asociación estadísticamente significativa entre las variables de enfermedades sistémicas, tanto en la flora conjuntival obtenida de los ojos sanos como de las cavidades anoftálmicas, respecto a la absorbancia espectrofotométrica (D.O. $_{540\text{ nm}}$) de las muestras (ver apartado 1.4.6 de Materiales y Métodos).

Tabla 19. Análisis de la edad como factor potencialmente modificador de la flora conjuntival.

Variables cualitativas de la flora	Influencia de la edad sobre la flora conjuntival											
	Muestras del ojo sano					Muestras pre-prótesis					Muestras retro-prótesis	
	Pacientes con variable presente	Pacientes con variable ausente	^a p	Pacientes con variable presente	Pacientes con variable ausente	^a p	Pacientes con variable presente	Pacientes con variable ausente	^a p	Pacientes con variable presente	Pacientes con variable ausente	^a p
^b TURBIDEZ PRECOZ	^c 26; 66,5 ±14,4	25; 60,8 ±18,1	0,214	45; 61,6 ±16,3	12; 66,5 ±18,2	0,843	53; 61,3 ±16,4	7; 66,6 ±16,8	0,431			
^d CULTIVO POSITIVO	51; 63,7 ±16,4	9; 51,9 ±12,8	0,044*	57; 61,3 ±16,5	3; 73,3 ±6,8	0,219	60; 62,0 ±16,4	0; - ± -	-			
MICROORGANISMOS:												
<i>S. epidermidis</i>	40; 62,5 ±16,8	20; 61,0 ±15,9	0,741	43; 60,8 ±16,1	17; 64,8 ±17,2	0,407	42; 62,5 ±15,5	18; 60,6 ±18,6	0,669			
Otros SCN	8; 57,0 ±14,2	52; 62,7 ±16,7	0,362	8; 70,1 ±15,3	52; 60,7 ±16,3	0,130	13; 60,8 ±19,4	47; 62,3 ±15,6	0,786			
SCP	5; 67,8 ±11,5	55; 61,4 ±16,7	0,408	11; 61,3 ±13,9	49; 62,1 ±17,0	0,881	11; 61,8 ±13,5	49; 62,0 ±17,1	0,977			
Corineformes	3; 70,3 ±16,6	57; 61,5 ±16,4	0,367	2; 55,0 ±28,3	58; 62,2 ±16,2	0,546	2; 48,0 ±24,0	58; 62,4 ±16,1	0,223			
Micrococos	1; 89,0 ± -	59; 61,5 ±16,1	-	1; 75,0 ± -	59; 61,7 ±16,4	-	0; - ± -	60; 62,0 ±16,4	-			
Streptococos	2; 85,5 ±0,7	58; 61,1 ±16,1	0,000**	14; 61,9 ±14,3	46; 62,0 ±17,1	0,981	13; 60,5 ±15,0	47; 62,4 ±16,8	0,714			
Enterococos	1; 38,0 ± -	59; 62,4 ±16,2	-	2; 80,0 ±2,8	58; 61,3 ±16,3	0,113	1; 78,0 ± -	59; 61,7 ±16,4	-			
Gram negativos	2; 80,0 ±2,8	58; 61,3 ±16,3	0,113	10; 65,3 ±20,9	50; 61,3 ±15,5	0,483	10; 65,4 ±20,7	50; 61,3 ±15,5	0,470			
Hongos	0; - ± -	60; 62,0 ±16,4	-	1; 69,0 ± -	59; 61,8 ±16,5	-	1; 69,0 ± -	59; 61,8 ±16,5	-			
^e M. PATÓGENOS	10; 70,8 ±15,8	50; 60,2 ±16,0	0,060	30; 61,7 ±16,2	30; 62,2 ±16,8	0,907	31; 64,1 ±16,2	29; 59,6 ±16,5	0,290			

^a p-valor calculado con estadístico t de Student. En caso de heterocedasticidad se empleó el test de Welch (ver apartado 4 de Materiales y Métodos). ^b Se consideró el tiempo requerido para observar turbidez en el medio BHI de las muestras como precoz, si esta se producía en las primeras 24 horas (ver apartado 1.4.1 de Resultados). ^c Número de pacientes (26); edad media (66,5) y desviación estándar (±14,4). Este orden se siguió en todos los datos expuestos en la tabla, en relación a los pacientes. ^d Cultivos con algún microorganismo presente (cultivos positivos) o bien con ausencia de crecimiento después de 10 días (cultivos negativos). ^e Cultivos con presencia de algún microorganismo considerado patógeno (ver apartado 1.4.3 de Resultados). * Diferencia estadísticamente significativa. ** Diferencia estadísticamente muy significativa.

La comparación de variables cualitativas de enfermedades sistémicas y grupos de microorganismos supuso la realización de 216 tablas de contingencia, de las cuales, sólo dos resultaron estadísticamente significativas. Se encontró una menor presencia de estreptococos en la flora retro-prótesis de los pacientes con tratamientos sistémicos ($p = 0,032$), así como una menor presencia de estas mismas bacterias en la flora pre-prótesis de los pacientes sin hipercolesterolemia ($p = 0,020$), cuya relevancia será discutida posteriormente (ver apartado 3.1 de Discusión).

3.2. Características de la cavidad anoftálmica

Otro de los aspectos a valorar fue la influencia que podrían tener las características de la cavidad anoftálmica sobre la flora conjuntival. Se estudiaron diferentes aspectos de la cavidad anoftálmica como: antecedentes personales de pérdida ocular (lado, etiología, tiempo transcurrido desde la intervención, tipo de procedimiento quirúrgico y presencia o no de implante orbitario), estado actual de la cavidad (presencia de epífora, obstrucción de la vía lagrimal, inflamación de la cavidad o presencia de moco) y tratamientos tópicos empleados en la cavidad (Tabla 18).

3.2.1. Lado de la anoftalmía

En el estudio de la flora en función del lado de la anoftalmía, se observó un incremento de bacterias patógenas en las muestras pre-prótesis de las cavidades anoftálmicas izquierdas (22/30) respecto de las derechas (8/30) ($p = 0,035$). Analizando por tipos de microorganismos, se observó que era el grupo de los estreptococos el que aparecía con mayor frecuencia en las cavidades izquierdas (12/14), en el espacio pre-prótesis ($p = 0,025$). El resto de variables cualitativas de la flora no se relacionaron significativamente con el lado de anoftalmía. En relación con el crecimiento bacteriano (valores de absorbancia), no se observó una diferencia significativa entre las muestras obtenidas de la conjuntiva del lado derecho o izquierdo.

3.2.2. Causa de la anoftalmía

Respecto a las causas que provocaron la anoftalmía, se diferenciaron los pacientes según la etiología de la pérdida del globo ocular y se comparó con la flora

conjuntival. Se valoraron tres posibles causas: traumatismo (29/60), endoftalmitis (16/60) u otra patología (15/60), como desprendimiento de retina o glaucoma avanzado. Se apreció que los pacientes con antecedente de pérdida ocular por endoftalmitis tenían una presencia significativamente mayor de estreptococos en su flora retro-prótesis ($p = 0,032$). Entre las otras variables, tanto cualitativas como cuantitativas de la flora ocular, no se encontró ninguna relación significativa con la causa de la anoftalmía.

3.2.3. Tiempo de anoftalmía

Al analizar la repercusión, sobre la flora conjuntival, del tiempo transcurrido desde la cirugía de extirpación del globo ocular, se observó que éste presentaba una distribución muy asimétrica (Figura 46), por lo que se dividió la antigüedad de las cavidades anoftálmicas en tres grupos: a) cirugías realizadas entre 0 y 3 años (24/60), b) cirugías realizadas entre 4 y 20 años (16/60), y c) cirugías realizadas hace 21 años o más (20/60).

Distribución de las variables tiempo

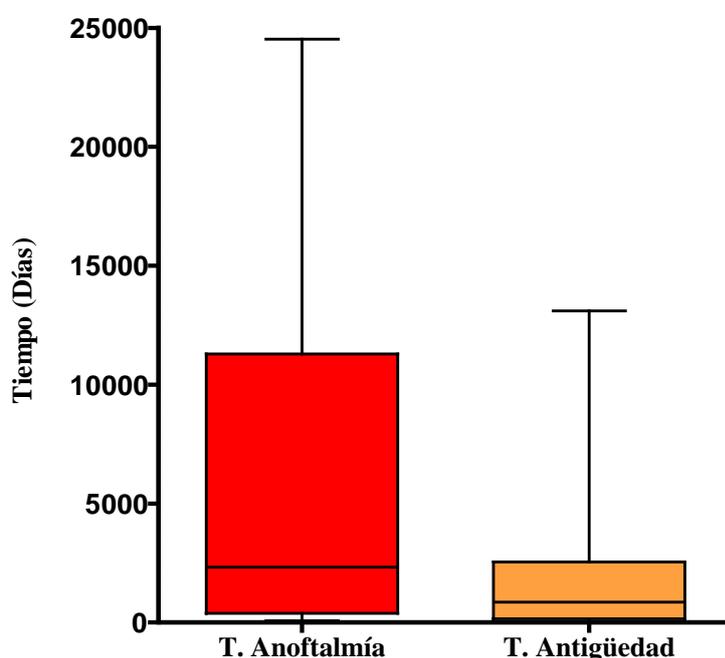


Figura 46. Representación en *box-plot* del tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica (tiempo de anoftalmía) y del tiempo de antigüedad de la prótesis ocular. En ambas variables, la línea en el interior de la caja, que representa la posición de la mediana, se encuentra muy próxima al borde inferior de la caja (percentil 25) y al extremo inferior (valor mínimo). Debido a esta distribución muy alejada de la normalidad, se decidió estratificar estas variables en tres periodos de tiempo.

De esta manera, se pudo comprobar una mayor presencia de las bacterias patógenas en la flora pre-prótesis de los pacientes intervenidos hace 21 años o más ($p = 0,022$). Estudiando por grupos de microorganismos, nuevamente fue el grupo de los estreptococos los que aparecieron con mayor frecuencia en la flora pre-prótesis de los pacientes intervenidos hace más tiempo ($p = 0,001$). En el resto de variables cualitativas y en el crecimiento bacteriano, medido por D.O. de las muestras, no se encontraron diferencias significativas.

3.2.4. Tipo de procedimiento quirúrgico

Según el procedimiento realizado para extirpar el globo ocular, los pacientes del estudio se dividieron en eviscerados (55/60) y enucleados (5/60). En este caso no se encontró diferencia significativa respecto a la flora, ni cualitativa ni cuantitativa.

3.2.5. Presencia de implante orbitario

Uno de los objetivos principales de nuestro trabajo, fue valorar la posible influencia del implante orbitario en la microbiota conjuntival. Los resultados de la comparación entre las diferentes variables, cualitativas y cuantitativas, se muestran en la Tabla 20. En los pacientes sin implante orbitario (27/60) se constató un mayor número de cultivos de bacterias patógenas, tanto en la flora pre-prótesis ($p = 0,004$) como retro-prótesis ($p = 0,035$). En el análisis por grupos de microorganismos, se determinó un mayor número de cultivos de estreptococos, tanto en las muestras pre-prótesis ($p = 0,004$) como retro-prótesis ($p = 0,047$). Con el resto de variables de la flora, no se encontraron diferencias significativas entre la presencia o ausencia de implante orbitario.

También se estudió si el tamaño o el material del implante ejercía alguna modificación en la flora. Los implantes de los 33 pacientes portadores eran esféricos, siendo mayoritariamente de PPAD poroso (30/33), y los restantes de silicona (3/33). Se apreciaron cuatro tamaños diferentes de implantes en función de su diámetro: 16 mm (1/33), 18 mm (10/33), 20 mm (8/33) y 22 mm (14/33). Para facilitar el análisis estadístico, se decidió agrupar los tamaños en tres tipos, según su diámetro: a) de 18 mm o menor, b) de 20 mm y c) de 22 mm. Así se consiguió una variable cualitativa, referida al tamaño del implante.

Tabla 20. Análisis de la presencia de implante orbitario como factor potencialmente modificador de la flora conjuntival.

Variables cualitativas de la flora presentes en los pacientes	Influencia del implante orbitario sobre la flora conjuntival								
	Muestras del ojo sano		Muestras pre-prótesis		Muestras retro-prótesis				
	Pacientes sin implante orbitario (27/60)	Pacientes con implante orbitario (33/60)	^a p	Pacientes sin implante orbitario (27/60)	Pacientes con implante orbitario (33/60)	^a p	Pacientes sin implante orbitario (27/60)	Pacientes con implante orbitario (33/60)	^a p
^b TURBIDEZ PRECOZ	13	13	0,313	23	22	0,107	25	28	0,599
^c CULTIVO POSITIVO	22	29	0,744	26	31	1,000	27	33	-
MICROORGANISMOS:									
<i>S. epidermidis</i>	18	22	1,000	18	25	0,437	20	22	0,533
Otros SCN	1	7	0,109	4	4	1,000	7	6	0,469
SCP	4	1	0,241	7	4	0,299	6	5	0,712
Corineformes	1	2	1,000	0	2	0,563	0	2	0,563
Micrococos	0	1	1,000	0	1	1,000	0	0	-
Estreptococos	1	1	1,000	11	3	0,004**	9	4	0,047*
Enterococos	0	1	1,000	1	1	1,000	0	1	1,000
Gram negativos	1	1	1,000	5	5	1,000	5	5	1,000
Hongos	0	0	-	1	0	0,919	1	0	0,919
^d M. PATÓGENOS	6	4	0,486	19	11	0,004**	18	13	0,035*
Densidad microbiana medida por absorbancia espectrofotométrica a 540 nm, después de 48 h	0,196 ±0,144	0,232 ±0,253	0,644	0,384 ±0,231	0,376 ±0,299	0,936	0,432 ±0,274	0,445 ±0,272	0,899
^f D.O. ±SD									

^a p-valor calculado con el estadístico χ^2 . En caso de existir unas frecuencias esperadas bajas, se empleó la corrección por continuidad de Yates (ver apartado 4 de Materiales y Métodos). ^b Se consideró el tiempo requerido para observar turbidez en el medio BHI de las muestras como precoz, si ésta se producía en las primeras 24 horas (ver apartado 1.4.1 de Resultados). ^c Muestras con crecimiento de algún microorganismo después de 10 días de cultivo. ^d Cultivos con presencia de algún microorganismo considerado patógeno (ver apartado 1.4.3 de Resultados). ^e p-valor calculado con estadístico t de Student. En caso de heterocedasticidad se empleó el test de Welch (ver apartado 4 de Materiales y Métodos). ^f Densidad óptica media del caldo BHI después de 48 horas de cultivo, con su desviación estándar. * Diferencia estadísticamente significativa. ** Diferencia estadísticamente muy significativa.

Se observó una mayor presencia de bacterias Gram negativas entre los pacientes portadores de implantes de 20 mm, coincidiendo exactamente en las proporciones los datos de la flora pre-prótesis y retro-prótesis. Así, los pacientes con presencia de bacterias Gram negativas en su cavidad anoftálmica e implantes de 20 mm (4/8), fueron significativamente más numerosos (p-valor: 0,008) que los que tenían implantes menores (0/11) o mayores (1/13). El resto de variables analizadas no se relacionaron con el tamaño.

Respecto al material del implante, no se encontró asociación estadística con las variables cualitativas de la flora. Sin embargo, se observó que el crecimiento bacteriano a las 48 horas de las muestras pre-prótesis era significativamente mayor ($p = 0,026$) en los tres pacientes con implante de silicona ($0,703 \pm 0,155$) respecto a los once con implante de PPAD ($0,287 \pm 0,266$). Un resultado equivalente se obtuvo con las muestras tomadas de los ojos sanos, donde la densidad microbiana en los pacientes con implante de silicona ($0,617 \pm 0,063$), respecto a los portadores de implantes de PPAD ($0,127 \pm 0,160$), resultó ser muy superior (p-valor $< 0,001$).

3.2.6. Epífora y obstrucción de la vía lagrimal

A los pacientes que referían epífora en la encuesta de tolerancia de la prótesis ocular (ver apartado 1.3.2 de Materiales y Métodos) se les exploró la permeabilidad de la vía lagrimal de su cavidad anoftálmica, mediante sondaje e irrigación con suero fisiológico.

De los 14 pacientes que referían epífora en su cavidad, sólo 8 presentaron obstrucción de la vía lagrimal. La única diferencia significativa en las características cualitativas de la flora se encontró en el hecho de que todos los pacientes con epífora presentaron cultivos pre-prótesis positivos para *S. epidermidis* ($p = 0,019$). Respecto a los cambios cuantitativos de la flora, se constató un incremento en el crecimiento microbiano (absorbancia espectrofotométrica) en las muestras de las cavidades anoftálmicas de los pacientes con obstrucción de la vía lagrimal, tanto en la flora pre-prótesis ($p = 0,032$) como retro-prótesis ($p = 0,002$). De un modo similar, en los pacientes con epífora se observó un incremento de la absorbancia en las muestras retro-prótesis ($p = 0,019$), aunque en las muestras pre-prótesis no se alcanzó la significación estadística ($p = 0,084$).

3.2.7. Inflamación de la cavidad anoftálmica

Para valorar el grado de inflamación de la cavidad, se consideraron dos variables: el grado de hiperemia de la conjuntiva (ver apartado 1.3.3 de Materiales y Métodos) y la presencia o ausencia de moco en el momento de la recogida. Estas dos variables se mostraron relacionadas entre sí ($p < 0,001$), de modo que los pacientes que no tenían moco en su cavidad anoftálmica en el momento del frotis conjuntival, presentaban menos hiperemia en la conjuntiva. Tanto la hiperemia como la presencia de moco en la cavidad anoftálmica se relacionaron con la flora, pero no de la cavidad, sino del ojo sano contralateral. Así, los pacientes con presencia de moco en su cavidad anoftálmica (28/60) presentaron todos sus cultivos del ojo sano positivos para algún microorganismo ($p = 0,007$), y los pacientes con conjuntivas hiperémicas (17/60), presentaron un mayor número de cultivos positivos para microorganismos patógenos en la flora de sus ojos sanos contralaterales ($p = 0,040$). En los 29 pacientes en los que se midió la D.O. $_{540 \text{ nm}}$ del caldo de cultivo a las 48 horas, se observó una mayor absorbancia en los ojos sanos de los pacientes con presencia de moco en su cavidad anoftálmica ($p = 0,037$).

La única variable de inflamación de las cavidades anoftálmicas que se relacionó con la modificación de la flora de la cavidad, fue la mayor proporción de cultivos de crecimiento tardío (7/17) en las muestras pre-prótesis de los pacientes con hiperemia en su cavidad, siendo esta significativamente mayor ($p = 0,038$), respecto a los que no mostraban hiperemia (5/40).

3.2.8. Tratamientos tópicos empleados en la cavidad anoftálmica

Otro parámetro que se valoró, fue el tratamiento tópico habitual de la cavidad anoftálmica de los pacientes estudiados, en el último mes, considerando distintos factores: (I) si no utilizaban tratamiento (34/60); (II) si empleaban únicamente suero fisiológico (6/60), en forma de lavados de una a tres veces al día, sin retirar la prótesis ocular; (III) si empleaban lubricantes (11/60), como lágrimas artificiales o aceite de ricino; (IV) o si empleaban colirio antibiótico (9/60), siendo este uso, en todos los casos, autoprescrito.

Entre las variables cualitativas de la flora, sólo se encontró relación con el uso de lubricantes oculares en la cavidad anoftálmica, asociándose a un incremento de cultivos de bacterias corineformes en la flora pre-prótesis ($p = 0,035$), así como a un aumento de otros SCN diferentes de *S. epidermidis* en el ojo sano ($p = 0,046$).

Respecto a la cuantificación de la flora por absorbancia espectrofotométrica, únicamente se observó una mayor D.O. en las muestras pre-prótesis de los pacientes que empleaban antibióticos tópicos, pasando de $0,302 \pm 0,231$ en los 20 pacientes que no empleaban antibióticos, a $0,553 \pm 0,251$ en los 9 que sí lo utilizaban ($p = 0,014$).

3.3. Características de la prótesis ocular en relación a su cuidado

Para determinar el impacto sobre la flora de la prótesis ocular, se estudiaron diferentes aspectos relacionados con el mantenimiento de la misma. Se consideró la antigüedad de la prótesis, el hecho de que se tratase de la primera prótesis ocular que empleaba el paciente, la frecuencia de lavado y el método de limpieza habitual.

3.3.1. Antigüedad de la prótesis ocular

Debido a la distribución asimétrica de la antigüedad de la prótesis empleada por cada paciente (Figura 46), se transformó esta variable continua en una variable categórica, estableciendo tres grupos: a) pacientes cuya prótesis tenía hasta un año de uso (24/60), b) pacientes con prótesis de entre 2 y 4 años (16/60), y pacientes que empleaban prótesis con 5 años o más antigüedad (20/60). También se valoró, en cada paciente, si la prótesis actual era su primera prótesis o si ya había utilizado otras prótesis anteriormente.

En ningún caso se encontraron diferencias significativas, ni cualitativas ni en el crecimiento microbiano medido por absorbancia espectrofotométrica, respecto a la flora en relación con la antigüedad de la prótesis o por ser la primera prótesis ocular utilizada.

3.3.2. Frecuencia y método de lavado de la prótesis ocular

Como en el caso del tiempo de anoftalmía o de la antigüedad de la prótesis, la frecuencia con la que cada paciente extraía la prótesis ocular para su limpieza

presentaba una distribución muy alejada de la normalidad. Por ello, se establecieron dos grupos de pacientes: aquellos que extraían la prótesis al menos cada 7 días (32/60) y aquellos que retiraban la prótesis para su limpieza a intervalos más prolongados (28/60). Se observó un mayor número de pacientes con cultivos de bacterias patógenas en las muestras pre-prótesis entre aquellos que extraían la prótesis cada 7 días o menos ($p = 0,038$), sin que se pudiera establecer una predominancia de ningún grupo de microorganismos patógenos. Además, también se encontró un mayor crecimiento bacteriano (D.O. $_{540\text{ nm}}$) en las muestras pre-prótesis de los pacientes con mayor frecuencia de extracción de la prótesis ocular respecto a los que la retiraban con menos asiduidad ($p = 0,001$).

Respecto al método de lavado de la prótesis, la mayoría de los pacientes empleaban simplemente el lavado convencional con agua y jabón de manos (44/60), respecto a otros métodos de limpieza como jabones neutros o soluciones limpiadoras de lentes de contacto. En cualquier caso, no se encontraron diferencias significativas en la microbiota conjuntival, ni cualitativas ni cuantitativas.

4. Factores en relación con la tolerancia subjetiva de la prótesis ocular

Entre los objetivos principales de nuestro trabajo se planificó estudiar los factores que pudieran modificar el grado de confort del paciente anoftálmico, respecto a su prótesis ocular. Así, se clasificó la tolerancia subjetiva como buena (32/60), regular (18/60) o mala (10/60), en función de la encuesta facilitada a los pacientes (ver apartado 1.3.2 de Materiales y Métodos). Al establecer tres posibles niveles de tolerancia, si alguna comparación resultaba significativa, sería necesario realizar un análisis de las causas de la significación, para determinar entre qué grupos se establecía la diferencia (ver apartado 4 de Materiales y Métodos), por lo que se decidió estudiar también la tolerancia en dos grupos de dos niveles: tolerancia buena *versus* tolerancia regular o mala, y tolerancia buena o regular *versus* tolerancia mala (Tabla 21).

Así, todas las variables en relación con las características de los pacientes (Tabla 18), se compararon con la tolerancia subjetiva de cada paciente a su prótesis ocular,

posponiendo el estudio de la relación entre la tolerancia y la flora conjuntival para el apartado 5 de Resultados.

4.1. Características epidemiológicas de los pacientes

Según se indica en la Tabla 18, las características epidemiológicas analizadas en los pacientes incluyeron la edad, el sexo y la presencia de enfermedades sistémicas. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas tras analizar estas variables respecto a la tolerancia subjetiva de la prótesis ocular.

4.2. Características de la cavidad anoftálmica

Los antecedentes en relación con la pérdida del globo ocular, como el lado de la anoftalmía, la causa de la misma, el tiempo transcurrido, el tipo de intervención quirúrgica, la presencia de implante orbitario, así como el tamaño y material de fabricación de éste, no mostraron relación con la tolerancia de la prótesis ocular. Por el contrario, sí se encontró relación entre la tolerancia y las variables referidas al estado actual de la conjuntiva y el uso de tratamientos tópicos.

En la Tabla 21 se aprecia como 13 de los 17 pacientes que presentaban conjuntivas hiperémicas refirieron una tolerancia regular o mala, mientras que los pacientes sin hiperemia conjuntival manifestaron, en general, una tolerancia buena (28/43). Esta diferencia fue estadísticamente relevante ($p = 0,004$). Además, se encontró una diferencia significativa ($p = 0,010$) entre los pacientes con presencia de moco, quienes referían, en general, una tolerancia regular o mala (18/28), y los pacientes sin mucosidad, quienes manifestaron, sobre todo, una tolerancia buena (22/32).

Respecto al uso de tratamientos tópicos, los pacientes que no utilizaban tratamiento presentaron una buena tolerancia (22/34), de forma significativa ($p = 0,043$). En cuanto al resto de tratamientos, incluidos los colirios antibióticos, no mostraron diferencias significativas en relación con la tolerancia.

Tabla 21. Análisis de la influencia sobre la tolerancia de la prótesis ocular de las variables relacionadas con las características actuales de la cavidad anoftálmica y del cuidado de la prótesis ocular.

Variables de las características actuales de la cavidad anoftálmica	Tolerancia subjetiva en 3 niveles			Tolerancia en 2 niveles			Tolerancia en 2 niveles		
	Pacientes con tolerancia buena (n = 32)	Pacientes con tolerancia regular (n = 18)	Pacientes con tolerancia mala (n = 10)	^a p	Pacientes con tolerancia buena (n = 32)	Pacientes con tolerancia regular o mala (n = 28)	Pacientes con tolerancia buena o regular (n = 50)	Pacientes con tolerancia mala (n = 10)	^a p
Epifora	5	5	4	0,256	5	9	10	4	0,339
Obstrucción de la vía lagrimal	4	1	3	0,216	4	4	5	3	0,234
Presencia de moco	10	11	7	0,034*	10	18	21	7	0,203
Hiperemia conjuntival	4	8	5	0,014*	4	13	12	5	0,200
Ausencia de tratamiento tópico	22	8	4	0,127	22	12	30	4	0,415
Uso de suero salino fisiológico	3	3	0	0,237	3	3	6	0	0,564
Uso de lubricantes oculares	5	3	3	0,608	5	6	8	3	0,551
Uso de colirios antibióticos	2	4	3	0,107	2	7	6	3	0,332
Variables del cuidado de la prótesis ocular									
Manipulación frecuente de la prótesis	12	13	7	0,031*	12	20	25	7	0,418
Lavado convencional de la prótesis	25	12	7	0,658	25	19	37	7	1,000

n: Número de pacientes. ^a p-valor calculado con el estadístico χ^2 . En caso de existir unas frecuencias esperadas bajas, se empleó la corrección por continuidad de Yates (ver apartado 4 de Materiales y Métodos). * Diferencia estadísticamente significativa. ** Diferencia estadísticamente muy significativa.

4.3. Cuidados de la prótesis ocular

Con respecto a la frecuencia de extracción y limpieza de la prótesis ocular, se observó una diferencia muy significativa en la tolerancia de la misma, ya que una menor manipulación (extracción en períodos superiores a una semana) se asoció a una tolerancia buena ($p = 0,009$). El resto de variables relacionadas con el cuidado de la prótesis (su antigüedad, ser la primera prótesis empleada, o el método de lavado utilizado), no mostraron diferencias significativas.

5. Influencia de la flora conjuntival en la tolerancia de la prótesis ocular

La relación de la flora microbiana con la tolerancia subjetiva de la prótesis ocular (ver apartado 1.3.2 de Materiales y Métodos), se analizó de un modo similar al empleado para comparar las características del paciente y la tolerancia a la prótesis (ver apartado 4 de Resultados). Las variables empleadas para describir las características de la flora (Tabla 18), de los tres tipos de muestras (ojo sano, pre-prótesis y retro-prótesis), se compararon con la tolerancia. Esta fue clasificada inicialmente en tres niveles: buena (32/60), regular (18/60) o mala (10/60), y posteriormente, agrupando las categorías en tolerancia buena o regular (40/60) y mala (10/60); y también como buena (32/60) y regular o mala (28/60), como se expone en la Tabla 22. La flora retro-prótesis fue la que con más claridad se relacionó con la tolerancia, por lo que se decidió representar los datos de su análisis (Tabla 22).

Tras el estudio estadístico, se observó que la existencia de microorganismos patógenos en la cavidad anoftálmica se relacionaba con una mala tolerancia a la prótesis ocular, tanto la presencia de los mismos en la flora pre-prótesis ($p = 0,038$) como, de forma muy significativa, en la retro-prótesis ($p = 0,003$). Analizando por grupos de microorganismos, se apreció que la existencia de bacterias Gram negativas en las muestras retro-prótesis se asociaba fuertemente con una tolerancia clasificada como mala ($p = 0,008$), así como la presencia de Gram negativos en los cultivos procedentes de los ojos sanos ($p = 0,024$). Entre los otros grupos de microorganismos clasificados como patógenos, de los diferentes espacios conjuntivales, no se encontró asociación.

Tabla 22. Análisis de la influencia de las variables en relación con la flora conjuntival, obtenida del espacio retro-prótesis, en la tolerancia de la prótesis ocular.

Variables cualitativas de la flora conjuntival retro-prótesis	Tolerancia subjetiva en 3 niveles			Tolerancia en 2 niveles			Tolerancia en 2 niveles			
	Tolerancia buena (n = 32)	Tolerancia regular (n = 18)	Tolerancia mala (n = 10)	^a p	Tolerancia buena (n = 32)	Tolerancia regular o mala (n = 28)	^a p	Tolerancia buena o regular (n = 50)	Tolerancia mala (n = 10)	^a p
^b TURBIDEZ PRECOZ	29	16	8	0,687	29	24	0,851	45	8	0,719
^c CULTIVO POSITIVO	32	18	10	-	32	28	-	50	10	-
MICROORGANISMOS:										
<i>S. epidermidis</i>	22	14	6	0,601	22	20	0,821	36	6	0,705
Otros SCN	11	2	0	0,011*	11	2	0,011**	13	0	0,161
SCP	5	2	4	0,181	5	6	0,562	7	4	0,136
Corineformes	0	2	0	0,089	0	2	0,414	2	0	1,000
Micrococos	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Estreptococos	9	1	3	0,139	9	4	0,194	10	3	0,779
Enterococos	0	1	0	0,305	0	1	0,946	1	0	1,000
Bacterias Gram negativas	3	2	5	0,021*	3	7	0,203	5	5	0,008**
Hongos	0	1	0	0,305	0	1	0,946	1	0	1,000
^d M. PATÓGENOS	15	6	10	0,002**	15	16	0,427	21	10	0,003**
Variables cuantitativas de la flora retro-prótesis	Tolerancia buena (n = 13)	Tolerancia regular (n = 11)	Tolerancia mala (n = 5)	^ep	Tolerancia buena (n = 13)	Tolerancia regular o mala (n = 16)	^ep	Tolerancia buena o regular (n = 24)	Tolerancia mala (n = 5)	^ep
^e ABSORBANCIA (Media ±SD)	0,440±0,24	0,344±0,25	0,693±0,32	0,123	0,437±0,30	0,440±0,24	0,973	0,396±0,24	0,640±0,32	0,064

n: Número de pacientes. ^a p-valor calculado con el estadístico χ^2 , aplicando las correcciones pertinentes (ver apartado 4 de Materiales y Métodos). ^b Se consideró el tiempo requerido para observar turbidez en el medio BHI de las muestras como precoz, si ésta se producía en las primeras 24 horas (ver apartado 1.4.1 de Resultados). ^c Muestras con crecimiento de algún microorganismo después de 10 días de cultivo. ^d Cultivos con presencia de algún microorganismo considerado patógeno (ver apartado 1.4.3 de Resultados). La suma de los pacientes de los grupos de microorganismos patógenos es superior a los pacientes con microorganismos patógenos, al existir, en algunos casos, varias especies patógenas de distintos grupos en un mismo paciente. ^e p-valor calculado mediante ANOVA. ^f p-valor calculado mediante t de Student. ^g Absorbancia espectrofotométrica a 540 nm de las muestras a las 48 horas de cultivo (ver apartado 1.4.6 de Materiales y Métodos). * Diferencia estadísticamente significativa. ** Diferencia estadísticamente muy significativa.

El único tipo de microorganismos que se asoció con una tolerancia buena de la prótesis ocular fue el grupo de los otros SCN, excluido *S. epidermidis*, en las muestras retro-prótesis ($p = 0,011$).

Finalmente, en la cuantificación del crecimiento microbiano, valorado como absorbancia espectrofotométrica a 540 nm, se apreció una D.O. significativamente mayor ($p = 0,005$) en las muestras pre-prótesis de los pacientes con tolerancia mala ($0,664 \pm 0,250$), frente a aquellos con tolerancia buena ($0,289 \pm 0,196$) o regular ($0,359 \pm 0,263$), no alcanzándose la diferencia estadística en las medidas de los cultivos retro-prótesis ($p = 0,060$), como puede apreciarse en la Tabla 22.

6. Sensibilidad antibiótica de las bacterias de la flora conjuntival

Para determinar la sensibilidad a diferentes antibióticos de las bacterias aisladas de los 60 pacientes objeto de estudio, se utilizó la técnica del antibiograma. En nuestro caso, se utilizaron dos sistemas de antibiogramas: paneles MicroScan y discos de difusión en placa (ver apartado 1.4.4 de Materiales y Métodos), que se emplearon siguiendo las recomendaciones del CLSI de 2010 y 2011 para cada especie bacteriana. En todas las especies de estafilococos se empleó, como método de antibiograma, el panel MicroScan número 31. En las bacterias corineformes, los micrococos y los estreptococos se emplearon antibióticos en discos de difusión en placa, seleccionando el antibiótico para cada especie en función de las directrices establecidas por el CLSI. En los enterococos se empleó el panel MicroScan número 32, y para las bacterias Gram negativas los paneles 53 y 54, en función de si el microorganismo era fermentador o no, respectivamente.

De esta manera, no se emplearon los mismos antibióticos en todas las especies aisladas ni dentro de cada grupo de bacterias. Por este motivo, se determinó el porcentaje de evaluación de cada antibiótico respecto al tipo de microorganismos (ver apartado 1.4.2 de Resultados), dividiendo el número de cepas de ese grupo, en las que se estudió un determinado antibiótico, entre el número total de cepas obtenidas en dicho grupo (Tabla 23).

Resultados

Tabla 23. Porcentaje de realización de antibiograma según la evaluación de cada antibiótico en cada grupo bacteriano.

Antibiótico	Grupos de bacterias							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Ciprofloxacino	^a 100	100	100	0	0	0	100	78
Levofloxacino	100	100	100	86	100	100	100	100
Gentamicina	100	100	100	100	100	0	0	100
Tobramicina	100	100	100	0	50	0	0	100
Amikacina	100	100	100	0	50	0	0	100
Ácido Fusídico	100	100	100	86	0	0	0	0
Cloranfenicol	0	0	0	86	50	100	0	100
Eritromicina	100	100	100	100	100	100	100	0
Clindamicina	100	100	100	86	100	86	75	100
Rifampicina	100	100	100	86	100	100	0	100
Vancomicina	100	100	100	100	100	100	100	0
Penicilina	100	100	100	100	100	100	100	35
Amoxi./Clav.	100	100	100	0	100	0	0	57
Oxacilina	100	100	100	0	0	66	0	0
Ampicilina	0	0	0	71	50	100	100	52
Piper./Tazo.	0	0	0	0	0	0	0	100
Cefoxitina	0	0	0	0	50	0	0	52
Cefuroxima	0	0	0	0	50	0	0	48
Cefotaxima	0	0	0	86	50	100	0	52
Ceftazidima	0	0	0	0	0	0	0	96
Cefepime	0	0	0	0	0	0	0	74
Imipenem	0	0	0	100	0	0	0	100
Meropenem	0	0	0	0	0	0	0	100
Aztreonam	0	0	0	0	0	0	0	78
Tetraciclina	100	100	100	86	100	100	100	100
Cotrimoxazol	100	100	100	86	50	69	50	96
Linezolid	100	100	100	100	100	100	100	0
Daptomicina	100	100	100	86	50	0	100	0
N cultivos totales	126	29	28	7	2	29	4	23

Grupos de bacterias: I: *S. epidermidis*. II: Otros estafilococos coagulasa negativos. III: Estafilococos coagulasa positivos. IV: Bacterias corineformes. V: Micrococcos. VI: Estreptococos. VII: Enterococos. VIII: Bacterias Gram negativas. Amoxi./Clav.: Amoxicilina en combinación con ácido clavulánico. Piper./Tazo: Piperacilina en combinación con tazobactam. ^a Este valor, de 100 por 100, se refiere al hecho de que en todas las cepas aisladas, 126 en el caso *S. epidermidis*, se evaluó su sensibilidad al antibiótico, en este caso, ciprofloxacino, independientemente de si el resultado de la sensibilidad de la cepa al antibiótico estudiado fue sensible, intermedia o resistente.

6.1. Sensibilidad antibiótica por grupos de bacterias conjuntivales

La sensibilidad de cada cepa bacteriana a cada antibiótico se estableció de forma diferente en función del método de antibiograma realizado (discos de difusión o paneles MicroScan). En los microorganismos evaluados por discos de difusión se estableció la sensibilidad o resistencia de la bacteria al antibiótico según las normas del CLSI de interpretación de los halos de inhibición. En el caso de las bacterias valoradas por paneles MicroScan, las CMI se interpretaron de forma automática por el sistema experto del lector, en base a los puntos de corte establecidos por el CLSI. De esta manera, se clasificó la sensibilidad antimicrobiana de cada cepa para cada antibiótico como: sensible, intermedia o resistente. Para los cálculos estadísticos posteriores, la sensibilidad intermedia se consideró como resistente (Kim *et al.*, 2010).

Así, se pudo establecer un porcentaje de sensibilidad de cada grupo bacteriano a cada antibiótico, al dividir el número de cepas sensibles en relación al número total de cepas evaluadas para ese antibiótico (Tabla 24). Los porcentajes de sensibilidad de los grupos de microorganismos mostrados en esta tabla, se estudiaron inicialmente diferenciándolos según su localización (procedentes de la cavidad anoftálmica o del ojo sano contralateral). Sin embargo, dado que no se observaron diferencias significativas según el área de obtención de la muestra, finalmente se decidió valorar de forma conjunta la sensibilidad de los grupos bacterianos obtenidos.

Dado que el antibiograma de los estafilococos fue realizado con los mismos antibióticos en todas y cada una de las cepas aisladas, se pudo estudiar la diferencia en cuanto a la sensibilidad antimicrobiana de los tres grupos de estafilococos (ver apartado 1.4.2 de Resultados). La media de la sensibilidad a los 17 antibióticos evaluados en los estafilococos fue de 75,9% para *S. epidermidis*, 89,7% para los otros SCN y de 82,1% para los SCP. Como se puede observar en la Tabla 25, estas diferencias fueron significativas ($p < 0,05$) para los siguientes antibióticos: ciprofloxacino, levofloxacino, tobramicina, eritromicina, penicilina, amoxicilina con ácido clavulánico, y oxacilina.

Al realizar el análisis de las causas de la significación, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo formado por los otros SCN diferentes de *S. epidermidis* y los SCP, y por lo tanto, era el grupo de los *S. epidermidis* el que resultaba significativamente más resistente a estos antibióticos.

Resultados

Tabla 24. Sensibilidad antibiótica de las cepas bacterianas evaluadas, por grupos de microorganismos.

Antibiótico	Grupos de bacterias							
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Ciprofloxacino	70	97	86	N.D.	N.D.	N.D.	0	67
Levofloxacino	70	97	89	67	100	97	25	52
Gentamicina	83	97	82	100	100	N.D.	N.D.	70
Tobramicina	71	97	75	N.D.	100	N.D.	N.D.	70
Amikacina	81	97	75	N.D.	100	N.D.	N.D.	70
Ácido Fusídico	84	90	96	100	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Cloranfenicol	N.D.	N.D.	N.D.	100	0	90	N.D.	13
Eritromicina	42	76	79	57	100	69	0	N.D.
Clindamicina	71	90	71	50	100	92	0	4
Rifampicina	100	100	100	100	100	100	N.D.	9
Vancomicina	100	100	100	100	100	100	100	N.D.
Penicilina	6	24	11	100	100	83	75	13
Amoxi./Clav.	68	97	75	N.D.	100	N.D.	N.D.	77
Oxacilina	70	97	75	N.D.	N.D.	53	N.D.	N.D.
Ampicilina	N.D.	N.D.	N.D.	100	100	90	100	8
Piper./Tazo.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	74
Cefoxitina	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	100	N.D.	N.D.	58
Cefuroxima	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	100	N.D.	N.D.	73
Cefotaxima	N.D.	N.D.	N.D.	100	100	97	N.D.	75
Ceftazidima	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	68
Cefepime	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	82
Imipenem	N.D.	N.D.	N.D.	100	N.D.	N.D.	N.D.	70
Meropenem	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	35
Aztreonam	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	72
Tetraciclina	79	66	82	100	100	76	25	9
Cotrimoxazol	96	100	100	50	0	85	0	82
Linezolid	100	100	100	100	100	100	100	N.D.
Daptomicina	100	100	100	100	100	N.D.	100	N.D.

Grupos de bacterias: I: *S. epidermidis*. II: Otros estafilococos coagulasa negativos. III: Estafilococos coagulasa positivos. IV: Bacterias corineformes. V: Micrococos. VI: Estreptococos. VII: Enterococos. VIII: Bacterias Gram negativas. Amoxi./Clav.: Amoxicilina en combinación con ácido clavulánico. Piper./Tazo: Piperacilina en combinación con tazobactam. N.D.: No determinado, al no realizarse la evaluación de dicho antibiótico en ninguna cepa de ese grupo.

Resultados

Tabla 25. Número de cepas sensibles respecto al total de cepas evaluadas en cada grupo de estafilococos.

Antibiótico	N cepas sensibles			
	<i>S. epidermidis</i>	Otros SCN	SCP	p
Ciprofloxacino	88	28	24	0,004**
Levofloxacino	88	28	25	0,002**
Gentamicina	105	28	23	0,171
Tobramicina	89	28	21	0,017*
Amikacina	102	28	21	0,072
Ácido Fusídico	106	26	27	0,195
Eritromicina	53	22	22	< 0,001**
Clindamicina	89	26	20	0,105
Rifampicina	126	29	28	-
Vancomicina	126	29	28	-
Penicilina	7	7	3	0,008**
Amoxi./Clav.	86	28	21	0,008**
Oxacilina	88	28	21	0,011*
Tetraciclina	100	19	23	0,224
Cotrimoxazol	121	29	28	0,313
Linezolid	126	29	28	-
Daptomicina	126	29	28	-
N cepas evaluadas	126	29	28	

Amoxi./Clav.: Amoxicilina en combinación con ácido clavulánico. *Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$). **Diferencia estadísticamente muy significativa ($p < 0,01$).

No obstante, al comparar la sensibilidad de los SCP respecto a los otros SCN excluido *S. epidermidis*, se observó una mayor resistencia de los SCP muy próxima a la relevancia estadística ($p = 0,050$) en el caso de amikacina, ácido fusídico, oxacilina y tetraciclina. Teniendo en cuenta estos valores tan cercanos al límite de significación, se decidió estudiar también las posibles diferencias entre la sensibilidad antimicrobiana del grupo de los *S. epidermidis* respecto a los SCP, encontrando dos antibióticos, levofloxacino y eritromicina, en los que la resistencia de *S. epidermidis* era significativamente mayor (valor de p : 0,035 y $< 0,001$, respectivamente).

6.2. Relevancia de la presencia de *S. epidermidis* resistentes

Dada la gran presencia de *S. epidermidis* en la flora conjuntival, tanto de los ojos sanos como de las cavidades anoftálmicas (ver apartado 1 de Resultados), y su escasa relación con las características del paciente (ver apartado 3 de Resultados) o con la tolerancia a la prótesis ocular (ver apartado 5 de Resultados); se decidió estudiar si la

presencia de *S. epidermidis* resistentes a distintos antibióticos mantenía alguna relación con estas variables.

Para realizar el cálculo estadístico, en cada paciente con presencia de *S. epidermidis*, bien en su ojo sano o bien en su cavidad anoftálmica (57/60), se determinó si existía alguna cepa con sensibilidad clasificada como resistente o intermedia. Respecto a los antibióticos evaluados (Tabla 25), dado que todas cepas de *S. epidermidis* fueron sensibles para rifampicina, vancomicina, linezolid y daptomicina se excluyeron dichos antibióticos de este análisis. Así se valoraron las posibles relaciones entre la presencia de al menos una cepa de *S. epidermidis* resistente para cada antibiótico evaluado y las características del paciente y su tolerancia a la prótesis ocular (Tabla 26).

Respecto a las características epidemiológicas de los pacientes, sólo se encontró alguna asociación significativa aislada, destacando la mayor presencia de *S. epidermidis* resistentes a la amikacina y a la clindamicina entre los pacientes con depresión.

En cuanto a las características de la cavidad anoftálmica, el lado derecho de la misma se asoció con un incremento en la presencia de *S. epidermidis* resistentes a las quinolonas (ciprofloxacino y levofloxacino) y a la amikacina. Los pacientes intervenidos más recientemente (menos de tres años), presentaron una mayor resistencia a los aminoglucósidos (gentamicina, tobramicina y amikacina), así como a la amoxicilina en combinación con ácido clavulánico y a la tetraciclina. Algo similar ocurrió con la presencia de implante orbitario que se asoció con una mayor resistencia de los *S. epidermidis* a quinolonas, aminoglucósidos, clindamicina y amoxicilina-clavulánico.

Como se observa en la Tabla 26, la inflamación de la cavidad anoftálmica, valorada tanto por la presencia de moco, como por la hiperemia conjuntival, se asoció con un incremento en la resistencia a varios antibióticos. Sin embargo, entre los pacientes que empleaban de forma habitual colirios de antibióticos sólo se pudo constatar un incremento de la resistencia a los aminoglucósidos. En cuanto a los cuidados de la prótesis ocular, la manipulación frecuente de la prótesis, extrayéndola al menos una vez por semana, se asoció con una mayor resistencia de *S. epidermidis* a las quinolonas y a la oxacilina.

Tabla 26. Relación entre el incremento de resistencias antibióticas de *S. epidermidis* con las características de los pacientes y su tolerancia a la prótesis ocular.

^aV. presentes en los pacientes	Incrementos significativos de <i>S. epidermidis</i> resistentes a diferentes antibióticos											
	Cipro.	Levo.	Genta.	Tobra.	Amika.	Ác. Fus.	Eritro.	Clinda.	Penicil.	AmoxC.	Oxacil.	Tetrac.
Sexo femenino						*						
Presencia de alguna enferm. sistémica					**			*				
Depresión				*				*				
Cavidad anofálmica en lado derecho	**	**	**	**	*				**			*
Tiempo de anofthalmía de 0 a 3 años				**	*			*	*			
Presencia de implante orbitario	*	*	*	**								
Epifora												
Obstrucción de la vía lagrimal												
Presencia de moco	**	**	*	*						*		
Presencia de hiperemia conjuntival			**	**	*			*	*	**		
Uso de algún tratamiento tópico			**	*								
Uso de suero salino fisiológico												
Uso de lubricantes oculares												
Uso de colirios antibióticos			**	**	**	**						
Antigüedad de la prótesis ocular												
Primera prótesis empleada								**				
Manipulación frecuente de la prótesis	**	**	**	**						*		
Lavado convencional de la prótesis									*	**		
Tolerancia subjetiva										**		
Tolerancia regular o mala									+	*		

^a Variables presentes en los pacientes. Cipro.: ciprofloxacino. Levo.: levofloxacino. Genta.: gentamicina. Tobra.: tobramicina. Amika.: amikacina. Ác. Fus.: ácido fusídico. Eritro.: eritromicina. Clinda.: clindamicina. Penicil.: penicilina. AmoxC.: amoxicilina en combinación con ácido clavulánico. Oxacil.: oxacilina. Tetrac.: tetraciclina. * Diferencia estadísticamente significativa. ** Diferencia estadísticamente muy significativa. + : p = 0,051 aunque, en la valoración por tolerancia subjetiva con tres niveles (tolerancia buena, regular o mala), sí se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Respecto a la tolerancia subjetiva a la prótesis ocular, en los pacientes con tolerancia regular o mala, sólo se observó un incremento de resistencia a los antibióticos amoxicilina-clavulánico y oxacilina. En el caso de la amoxicilina-clavulánico, si bien se observó una diferencia significativa cuando se evaluó la tolerancia en tres niveles (tolerancia buena, regular o mala), no se alcanzó la significación estadística ($p = 0,051$) cuando se estudió agrupando las categorías de tolerancia regular y mala.

Las otras características de los pacientes (edad, hipertensión arterial, hipercolesterolemia, diabetes mellitus), o de las cavidades anoftálmicas (causa de la pérdida ocular, tipo de procedimiento quirúrgico, tamaño y material del implante orbitario), así como la existencia de epífora u obstrucción de la vía lagrimal, no se relacionaron con un incremento de la resistencia antimicrobiana de los *S. epidermidis*.

7. Evaluación de la adhesión y formación de biofilm

Como vimos en el apartado 5 de Resultados, la mala tolerancia a la prótesis ocular se relacionó con la existencia de microorganismos considerados patógenos, en concreto con un aumento de bacterias Gram negativas. Uno de los principales factores que incrementan la supervivencia de las bacterias, tanto patógenas como saprofitas, es su capacidad de adhesión y formación de biofilms. Es más, los microorganismos pueden competir entre ellos por el mismo nicho ecológico (ver apartado 5.3.1 de Introducción), desplazando los no patógenos o habituales de la flora conjuntival a los patógenos, o viceversa. Por este motivo, se decidió estudiar la capacidad de adhesión y formación de biofilms de las bacterias presentes en la flora conjuntival, seleccionadas en este trabajo (ver apartado 2.1 de Materiales y Métodos, Tabla 6).

7.1. Cinética del crecimiento bacteriano

Las bacterias descritas en el apartado 2.1 de Materiales y Métodos, típicas de la flora conjuntival, fueron cultivadas en TSB en agitación y medida su absorbancia espectrofotométrica a 540 nm (ver apartado 3.3 de Materiales y Métodos). Las curvas de crecimiento celular, obtenidas de la medición por triplicado cada 2 horas, desde la siembra hasta las 40 horas, se muestran en la Figura 47. En las gráficas del crecimiento bacteriano se aprecia, en todas ellas, la típica forma sigmoidal, pudiendo diferenciarse

las fases de adaptación o latencia, crecimiento exponencial, estacionaria, y, en algunas especies, una fase de declive, como *S. epidermidis* CECT 231, *S. hominis* o *S. marcescens*.

La fase exponencial se alcanzó a las 12 horas de cultivo en la mayoría de las cepas, siendo algo más precoz en el caso de *L. rhamnosus* (8 horas) y más tardía para *A. calcoaceticus* (18 horas). La cepa que alcanzó un mayor crecimiento (valorado por su D.O. _{540 nm}) fue *S. aureus*, seguido de *S. marcescens*, ambas consideradas especies patógenas. Las especies con menor nivel de crecimiento fueron *A. calcoaceticus* (bacteria Gram negativa saprofita de la flora cutánea, ver Tabla 6) y *L. rhamnosus*.

En la Figura 47 se muestra la cinética de crecimiento de dos cepas de *S. epidermidis* (CECT y HL). Como se puede observar, a pesar de tratarse de la misma especie, mostraron comportamientos cinéticos distintos, lo que demuestra que nos encontramos ante dos cepas diferentes.

7.2. Cinética de adhesión bacteriana

Siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.1 de Materiales y Métodos, se cuantificó la adhesión bacteriana a placas de poliestireno de 96 pocillos. Las células fueron recogidas al final de la fase exponencial de crecimiento (Figura 47), que correspondió con las 12 horas de cultivo para la mayoría de las cepas, excepto para *A. calcoaceticus* cuyas células se tomaron a las 20 horas de cultivo en agitación. Tras incubarlas en placas de poliestireno a 37°C, las células adheridas se cuantificaron por tinción con cristal violeta al 0,1 % y lecturas del color a 570 nm. El experimento se repitió 6 veces con cada cepa, midiendo su adhesión a las 4, 6, 8, 12, 24, 36 y 48 horas. Con los resultados obtenidos se elaboraron las gráficas de adhesión bacteriana que se reflejan en la Figura 48.

Como se puede apreciar en dicha figura, la mayoría de las cepas alcanzaron su máxima adhesión a poliestireno a las 12 horas, siendo ligeramente más precoz en el caso de *S. epidermidis* CECT 231 (8 horas), y más tardío (24 horas) para *S. aureus*, *C. amycolatum* y *A. calcoaceticus*.

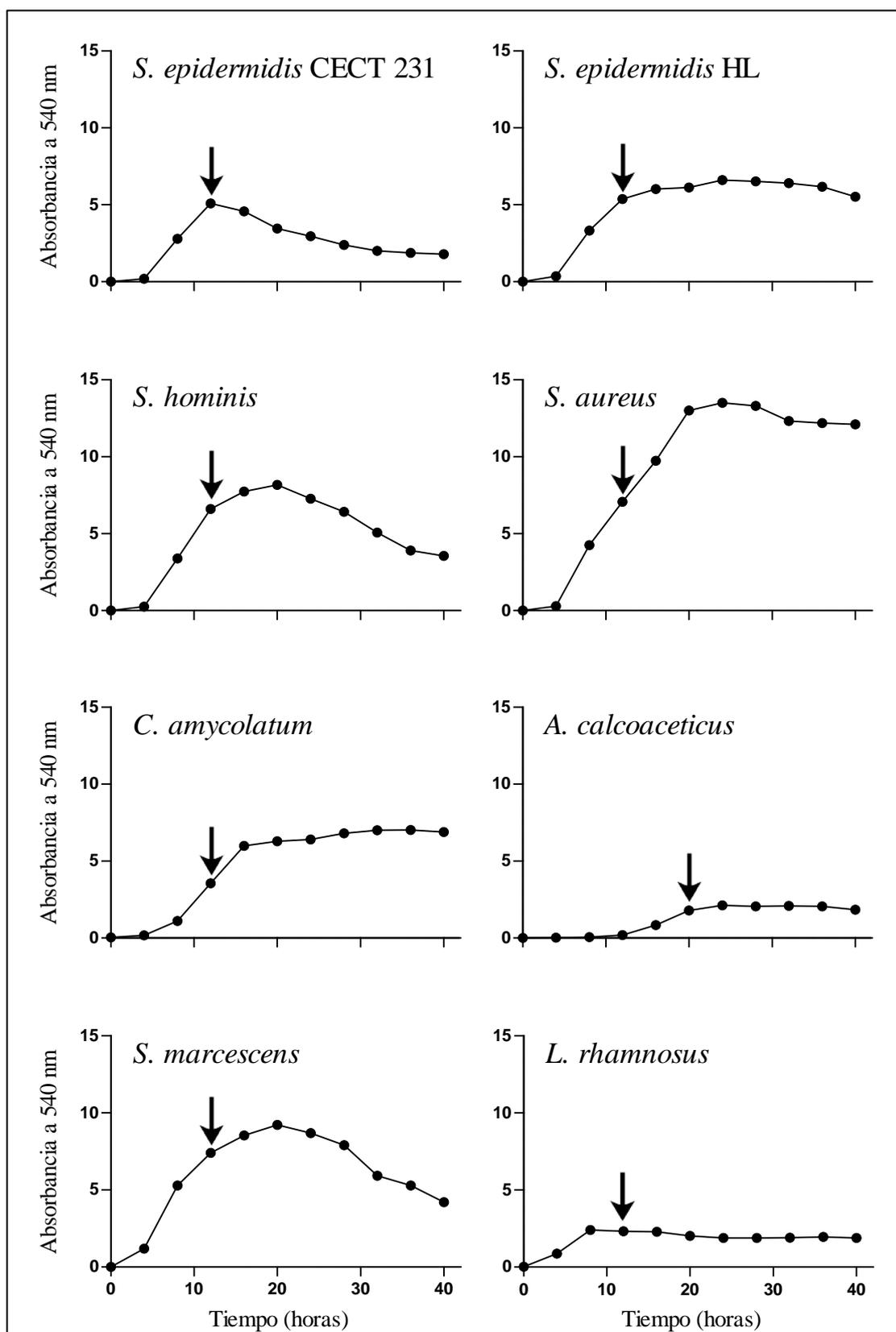


Figura 47. Curvas de crecimiento celular en medio TSB, realizadas midiendo la absorbancia espectrofotométrica a 540 nm, a lo largo del tiempo de incubación a 37°C. Los puntos dibujados representan el valor medio registrado. *S. epidermidis* HL: cepa aislada de la conjuntiva de un paciente del Hospital de León. La flecha indica el momento de recogida de las cepas para estudiar su cinética de adhesión, que fue a las 20 horas para *A. calcoaceticus* y de 12 horas para las demás especies bacterianas.

Como se ha descrito en Materiales y Métodos (apartado 2.1), para los estudios de adhesión y formación de biofilm se ha incluido a *L. rhamnosus*. Aunque esta bacteria ácido-láctica puede formar parte de la flora intestinal, no se ha descrito su presencia en la flora conjuntival. Sin embargo, se decidió emplear como cepa control en este apartado, ya que su capacidad de adhesión ha sido ampliamente estudiada (Monteagudo, 2010).

De este modo, y estableciendo como referencia los resultados obtenidos con *L. rhamnosus*, se pudo establecer un orden de mayor a menor capacidad de adhesión de las cepas conjuntivales estudiadas. Así, la especie con mayor unión al poliestireno fue *S. marcescens*, cuya capacidad de adhesión fue casi 5 veces mayor que *L. rhamnosus*, lo que supone un incremento del 395% respecto al nivel alcanzado por la cepa de referencia. También mostraron una adhesión mayor que la cepa control: *S. aureus* (incremento del 138%), *S. epidermidis* CECT (83%) y *S. epidermidis* HL (41%). Las especies restantes presentaron una adhesión al poliestireno menor que la cepa control: *S. hominis* (-25%), *C. amycolatum* (-47%), y por último, *A. calcoaceticus*, que fue la especie en la que se registró una adhesión menor (-63%).

Respecto a las dos cepas de *S. epidermidis*, aunque sus curvas de crecimiento fueron considerablemente diferentes (Tabla 47), sus cinéticas de adhesión resultaron muy similares (Figura 48), constatando el hecho de que estas dos características de las bacterias son independientes entre sí.

También en el caso de *S. hominis* se observó una llamativa discrepancia entre los valores de sus curvas de adhesión y de crecimiento, presentando una escasa adhesión al poliestireno (Figura 48), si bien su crecimiento celular fue superior al de las dos cepas de *S. epidermidis* (Figura 47).

Las cepas que mostraron una mayor capacidad de adhesión fueron *S. marcescens* y *S. aureus* (Figura 48), que también fueron las cepas con mayor crecimiento (Figura 47). Sin embargo, la adhesión celular fue mucho mayor en *S. marcescens* que en *S. aureus* en todos los tiempos, al contrario de lo que se observó en las curvas de crecimiento, donde *S. aureus* alcanzó valores más elevados de crecimiento, medido como D.O. _{540 nm}.

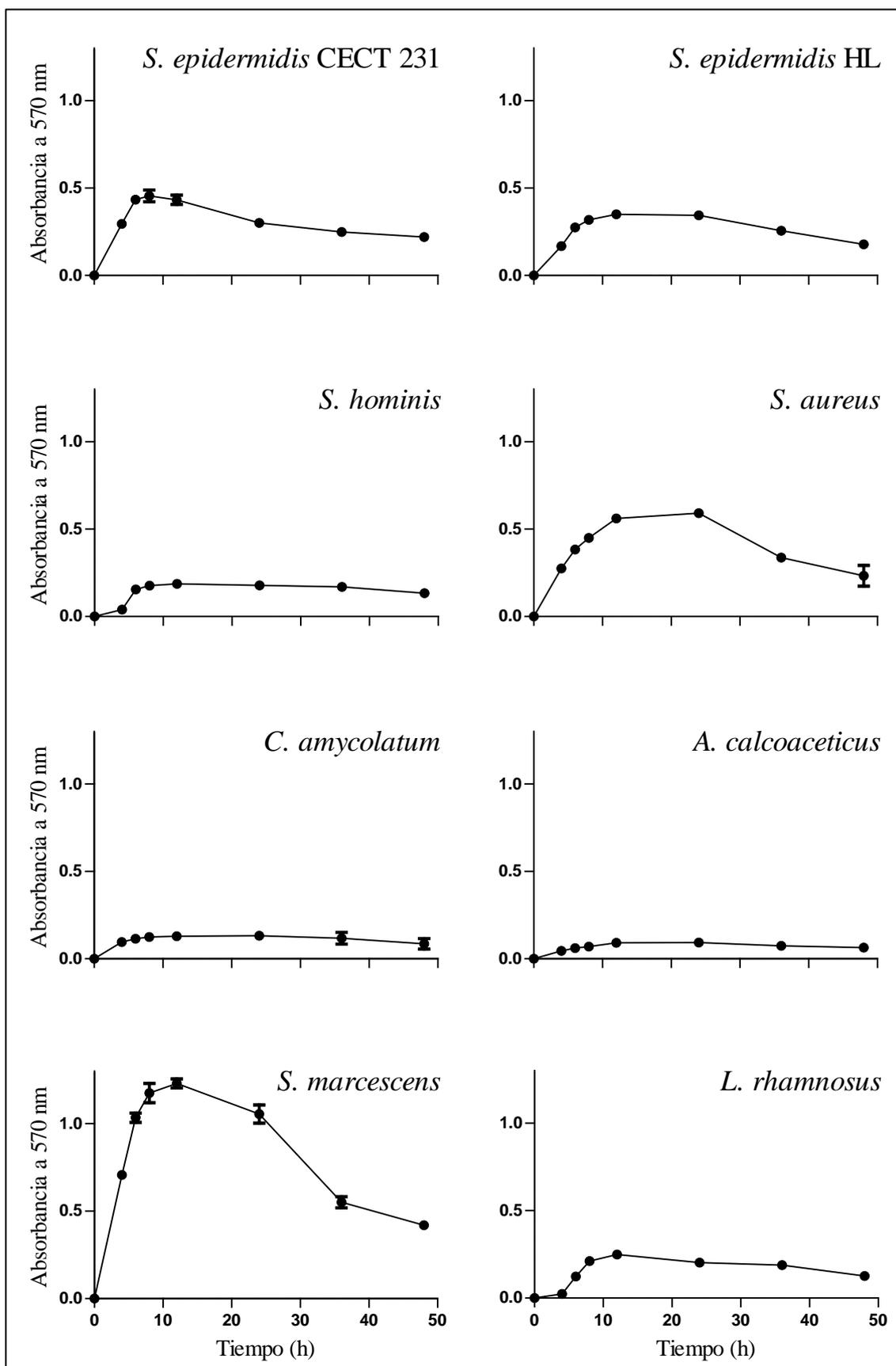


Figura 48. Curvas de adhesión en placa de poliestireno de 96 pocillos. Para medir las células adheridas se empleó la tinción con cristal violeta y se midió la absorbancia espectrofotométrica a 570 nm. *S. epidermidis* HL: cepa silvestre aislada de la conjuntiva de un paciente del Hospital de León.

7.3. Cuantificación de la adhesión bacteriana sobre diferentes materiales

Entre las principales características que debe tener el material empleado en la fabricación de prótesis, podemos señalar la capacidad del mismo para permanecer libre de contaminación por microorganismos, los cuales serán más invasivos cuanto mayor sea su capacidad para unirse a los materiales utilizados en los implantes médicos.

Con el objeto de establecer la resistencia a la adhesión microbiana de diferentes productos empleados en la fabricación de prótesis oftalmológicas (ver apartado 2.4 de Introducción), se evaluó la capacidad de unión a la superficie de distintos materiales (cristal, acero, resina acrílica, teflón, implante orbitario de silicona, tapones de silicona comercial, láminas de Medpor® semi-liso y rugoso) de las bacterias estudiadas. Se incubaron por triplicado plaquitas de estos materiales, en presencia de cada una de las cepas seleccionadas, empleando placas de poliestireno de 24 pocillos (ver apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos). Los tiempos de cultivo del preinóculo utilizado fueron los mismos que se emplearon para el estudio de la cinética de adhesión (Figura 47). Después de 12 horas a 37°C, se midió el crecimiento celular del sobrenadante (como D.O. $_{540\text{ nm}}$) y el número de células adheridas a la superficie de cada material. Para cada una de las cepas estudiadas, no se encontraron diferencias significativas en la D.O. del sobrenadante en función del material depositado en el fondo del pocillo. En relación con las células adheridas, y dado el carácter exponencial del crecimiento bacteriano, tras realizar el recuento de UFC por ml y ajustarlo por mm^2 de superficie de cada plaquita (ver apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos), se calculó el logaritmo decimal (log) de las UFC, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura 49.

La cepa de control de adhesión, *L. rhamnosus*, mostró una mayor adhesión, medida como $\log\text{UFC}/\text{ml}\cdot\text{mm}^2$, para la mayoría de los materiales estudiados respecto a las cepas de la flora conjuntival, siendo superada sólo con claridad por la mayor adhesión de *S. epidermidis* HL y de *S. aureus* a la silicona de implante orbitario. No obstante, dado el objetivo de este experimento, el análisis matemático se centró en analizar las posibles diferencias en la adhesión bacteriana según el tipo de material.

Resultados

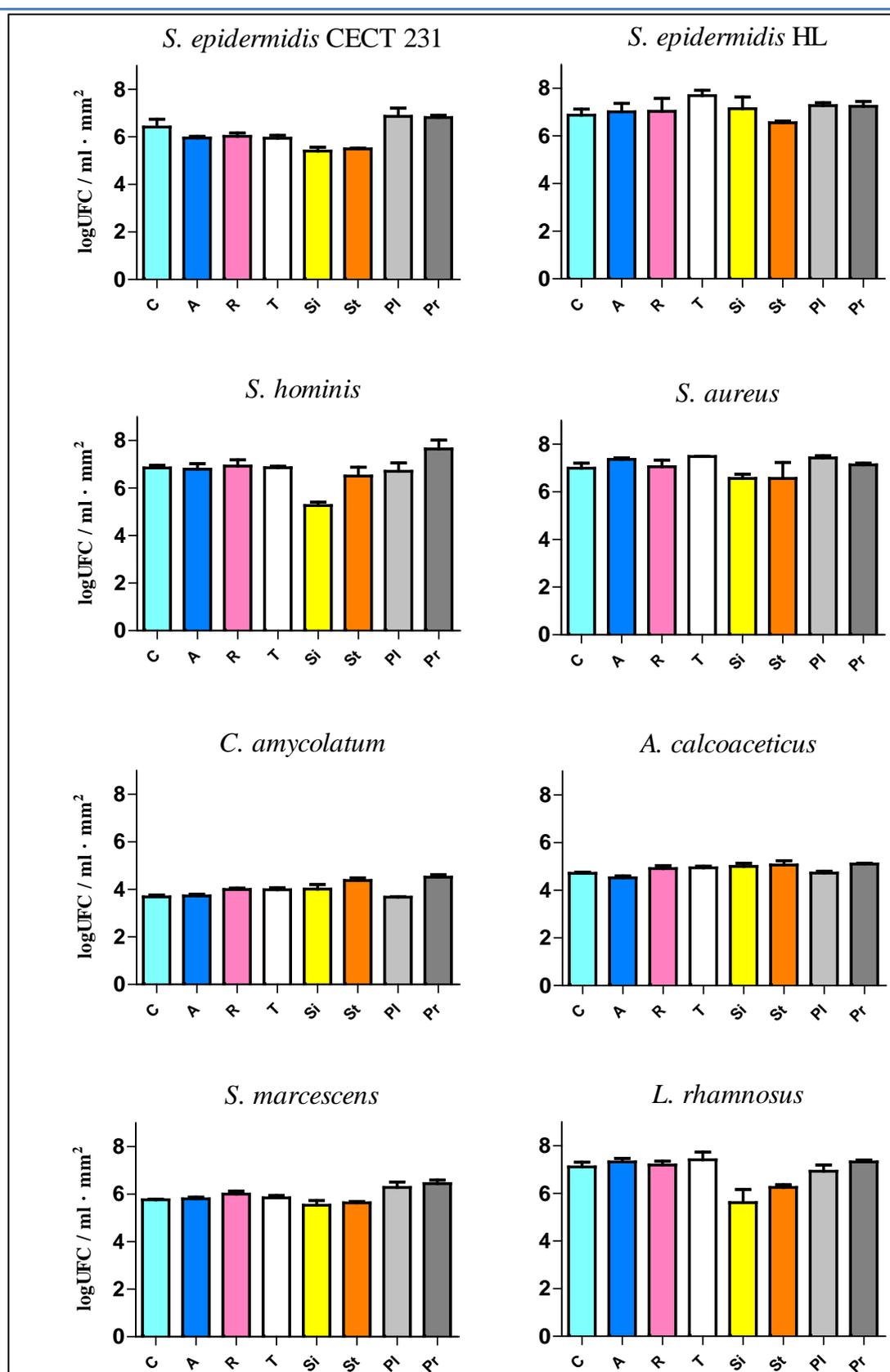


Figura 49. Resultados del recuento de UFC de cada cepa, medidas como logUFC/ml·mm². C: cristal. A: acero. R: Resina acrílica de prótesis ocular. T: teflón. Si: silicona obtenida de implante orbitario. St: silicona obtenida de tapón para uso en laboratorio. Pl: Polietileno poroso de alta densidad (PPAD) con una superficie lisa y otra rugosa. Pr: PPAD rugoso. Se obtuvieron diferencias significativas en la adhesión a los diferentes materiales en todas las cepas, excepto en *S. epidermidis* HL ($p = 0,423$) y *S. aureus* ($p = 0,066$).

Inicialmente se realizó un análisis estadístico para valorar, en cada bacteria estudiada, las posibles diferencias a la adhesión en función del material. Para ello, se empleó un ANOVA en aquellas cepas que presentaron homocedasticidad en sus mediciones: *S. epidermidis* HL, *S. hominis*, *C. amycolatum*, *A. calcoaceticus* y *S. marcescens*; utilizando el test de Bonferroni para el análisis de comparaciones múltiples. En aquellas bacterias que presentaron diferencias significativas en sus varianzas: *S. epidermidis* CECT 231, *S. aureus*, y *L. rhamnosus*; se utilizó inicialmente el test de Kruskal-Wallis, realizando, posteriormente, la comparación por pares mediante el test T3 de Dunnett.

De esta manera se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la adhesión en función del material para: *S. epidermidis* CECT ($p = 0,010$), *S. hominis* ($p = 0,001$), *C. amycolatum* ($p < 0,001$), *A. calcoaceticus* ($p = 0,013$), *S. marcescens* ($p = 0,003$), y *L. rhamnosus* ($p = 0,045$). En el caso de *S. epidermidis* HL ($p = 0,423$) y de *S. aureus* ($p = 0,066$), no se encontraron diferencias significativas en la adhesión entre los materiales, exhibiendo ambas cepas una elevada adhesión a todos los materiales (Figura 49).

Dado que no se pudieron realizar placas de poliestireno de las dimensiones requeridas (ver apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos), debido a la tendencia de este material a deformarse cuando se intentaba cortar, no se estableció un material como control de adhesión, si no que se decidió comparar los diferentes materiales entre sí, según la adhesión bacteriana de cada cepa.

Así, tras realizar el análisis de comparaciones múltiples, se determinó que la cepa control, *L. rhamnosus*, presentó una mayor adhesión al PPAD rugoso respecto a la silicona de tapón comercial ($p = 0,022$). También la cepa de *S. epidermidis* CECT 231, mostró una adhesión significativamente mayor al PPAD rugoso respecto al acero ($p = 0,028$), la silicona de implante orbitario ($p = 0,027$) y de tapón comercial ($p = 0,018$).

Como se puede apreciar en la Figura 49, *S. hominis* mostró una adhesión significativamente menor a la silicona de implante orbitario, respecto a los demás materiales: cristal ($p = 0,016$), acero ($p = 0,022$), resina acrílica de prótesis ocular ($p = 0,010$), teflón ($p = 0,015$), PPAD semi-liso ($p = 0,036$) y PPAD rugoso ($p < 0,001$); siendo la única excepción la adhesión a la silicona de tapón comercial, con la que no mostró diferencias significativas ($p = 0,112$).

Resultados

En el caso de *C. amycolatum*, también se adhirió de forma diferente a los distintos materiales, presentando una mayor adhesión a la silicona de tapón comercial respecto al cristal ($p = 0,004$), al acero ($p = 0,009$) y al PPAD semi-liso ($p = 0,004$). Además, mostró una significativa mayor adhesión al PPAD rugoso, respecto al cristal ($p = 0,001$), al acero ($p = 0,001$), al teflón ($p = 0,046$) y al PPAD semi-liso ($p = 0,001$). En la cepa de *A. calcoaceticus*, sólo se encontraron diferencias significativas en la mayor adhesión al PPAD rugoso respecto al acero ($p = 0,032$).

S. marcescens, presentó una menor adhesión a la silicona de implante orbitario respecto al PPAD semi-liso ($p = 0,037$) y al PPAD rugoso ($p = 0,007$). Además, el PPAD rugoso, también presentó una mayor adhesión de *S. marcescens* respecto a la silicona de tapón ($p = 0,017$).

Por último, para poder comparar entre las distintas cepas la adhesión a los diferentes materiales, se analizó el porcentaje de adhesión relativa de cada bacteria a cada material. Este porcentaje se calculó dividiendo el $\log\text{UFC}/\text{ml}\cdot\text{mm}^2$ obtenidas de una cepa bacteriana sobre un material entre la suma de los $\log\text{UFC}/\text{ml}\cdot\text{mm}^2$ obtenidos, de esa misma cepa, en cada uno de los materiales (Tabla 27). En el supuesto de que la adhesión fuera independiente del material, el porcentaje esperado de adhesión relativa sería de un octavo ($1/8 = 12,5\%$), dado que se emplearon 8 materiales distintos.

Tabla 27. Adhesión relativa de cada cepa bacteriana a cada material.

Adhesión relativa (%) por cepas bacterianas a cada material *								
	Cristal	Acero	Resina acrílica	Teflón	Silicona de implante	Silicona de tapón	PPAD semi- liso	PPAD rugoso
<i>S. epidermidis</i> CECT	13,12	12,17	12,32	12,14	11,06	11,23	14,03	13,93
<i>S. epidermidis</i> HL	12,09	12,35	12,38	13,54	12,57	11,53	12,80	12,74
<i>S. hominis</i>	12,79	12,68	12,94	12,80	9,84	12,15	12,52	14,27
<i>S. aureus</i>	12,36	13,02	12,47	13,22	11,60	11,60	13,12	12,61
<i>C. amycolatum</i>	11,51	11,66	12,49	12,47	12,56	13,68	11,49	14,14
<i>A. calcoaceticus</i>	12,08	11,61	12,60	12,67	12,83	12,99	12,11	13,10
<i>S. marcescens</i>	12,17	12,28	12,70	12,36	11,71	11,90	13,27	13,62
<i>L. rhamnosus</i>	12,90	13,26	13,04	13,43	10,18	11,33	12,57	13,28

* Puesto que se emplearon 8 materiales diferentes, el porcentaje esperado de adhesión relativa, en caso de ser independiente del material, era de un octavo ($1/8 = 12,5\%$).

De este modo se pudo estudiar la resistencia de cada material a la adhesión bacteriana de forma conjunta. Dado que las varianzas diferían de forma significativa, se empleó un test de Kruskal-Wallis que resultó estadísticamente significativo ($p = 0,001$). Posteriormente se empleó el test de comparaciones múltiples T3 de Dunnett, que identificó una adhesión significativamente mayor ($p = 0,030$) al PPAD rugoso respecto a la silicona de implante orbitario (Figura 50).

Adhesión bacteriana en función del material

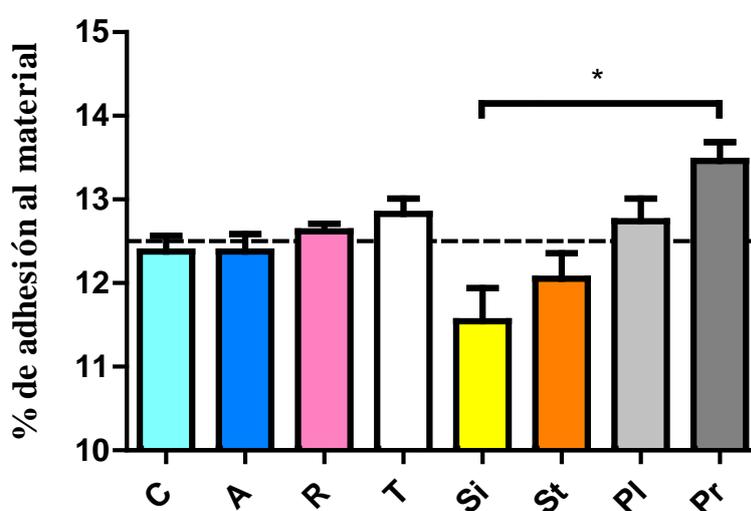


Figura 50. Comparación de la adhesión bacteriana relativa en cada material. C: cristal. A: acero. R: Resina acrílica de prótesis ocular. T: teflón. Si: silicona obtenida de implante orbitario. St: silicona obtenida de tapón para uso en laboratorio. Pl: Polietileno poroso de alta densidad (PPAD) con una superficie lisa y otra rugosa. Pr: PPAD rugoso. *Se observó una adhesión significativamente mayor en el PPAD (Medpor®) rugoso respecto a la silicona de implante ($p = 0,030$). Línea discontinua: Porcentaje esperado en caso de adherirse independientemente del material ($1/8 = 12,5\%$).

7.4. Estudio electromicroscópico de los materiales y de la formación de biofilms

Dado que se observaron diferencias en la adhesión bacteriana en función del material, siendo el PPAD rugoso el que permitió una mayor asociación de microorganismos (Figura 50), se decidió estudiar microscópicamente la topografía de la superficie de los distintos materiales, con el fin de encontrar estriaciones de tamaño

similar al diámetro de las bacterias y que, por lo tanto, pudieran favorecer la unión de las mismas (ver apartado 5.3.3.2 de la Introducción).

Posteriormente, se visualizó el crecimiento y adhesión de las bacterias seleccionadas, pertenecientes a la flora conjuntival, sobre un mismo material, el teflón, por cumplir los requisitos de ser de superficie lisa, de naturaleza plástica y de fácil manejo. Así, se pudo observar el desarrollo y grado de madurez del biofilm en cada cepa a estudio.

Por último, se investigó la presencia *in vivo* de bacterias adheridas, y su posible estructuración en biofilm, utilizando muestras de implantes orbitarios expuestos de tres pacientes anoftálmicos

7.4.1. Evaluación electromicroscópica de la superficie de los materiales protésicos seleccionados

Los materiales descritos en el apartado 2.4 de Materiales y Métodos fueron visualizados utilizando un microscopio electrónico de barrido a 10.000 y 20.000 aumentos (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos). Las imágenes a 10.000 aumentos se muestran en la Figura 51, en la que el cristal mostró una de las superficies más lisas, a pesar de presentar algunas pequeñas irregularidades. En el caso del acero, se observaron unos surcos de 0,5 μm , escasamente interconectados. La resina acrílica, el PPAD semi-liso y el PPAD rugoso mostraron una superficie lisa, semejante a “tierra cuarteada”, mientras que el teflón y las siliconas tenían un aspecto granular.

A pesar de que el PPAD rugoso presentó una mayor adhesión bacteriana que otros materiales (Figura 50), al comparar la superficie de la cara lisa del PPAD semi-liso y del PPAD rugoso, a la escala de 10.000 aumentos, pudimos comprobar que no se observa ninguna diferencia entre ellas, puesto que los poros del PPAD rugoso son de un tamaño entre 300 y 1000 μm , como veremos en el apartado 7.4.3 de Resultados.

Por lo tanto, el acero fue el único material con estriaciones de diámetro similar al de las bacterias (0,5 - 1 μm), aunque la presencia de estos canales no se relacionó con un incremento en la adhesión bacteriana a este material (Figura 50). El resto de materiales no presentaron canales de tamaño semejante al de las bacterias, que pudieran favorecer su adhesión (ver apartado 5.3.3.2 de Introducción).

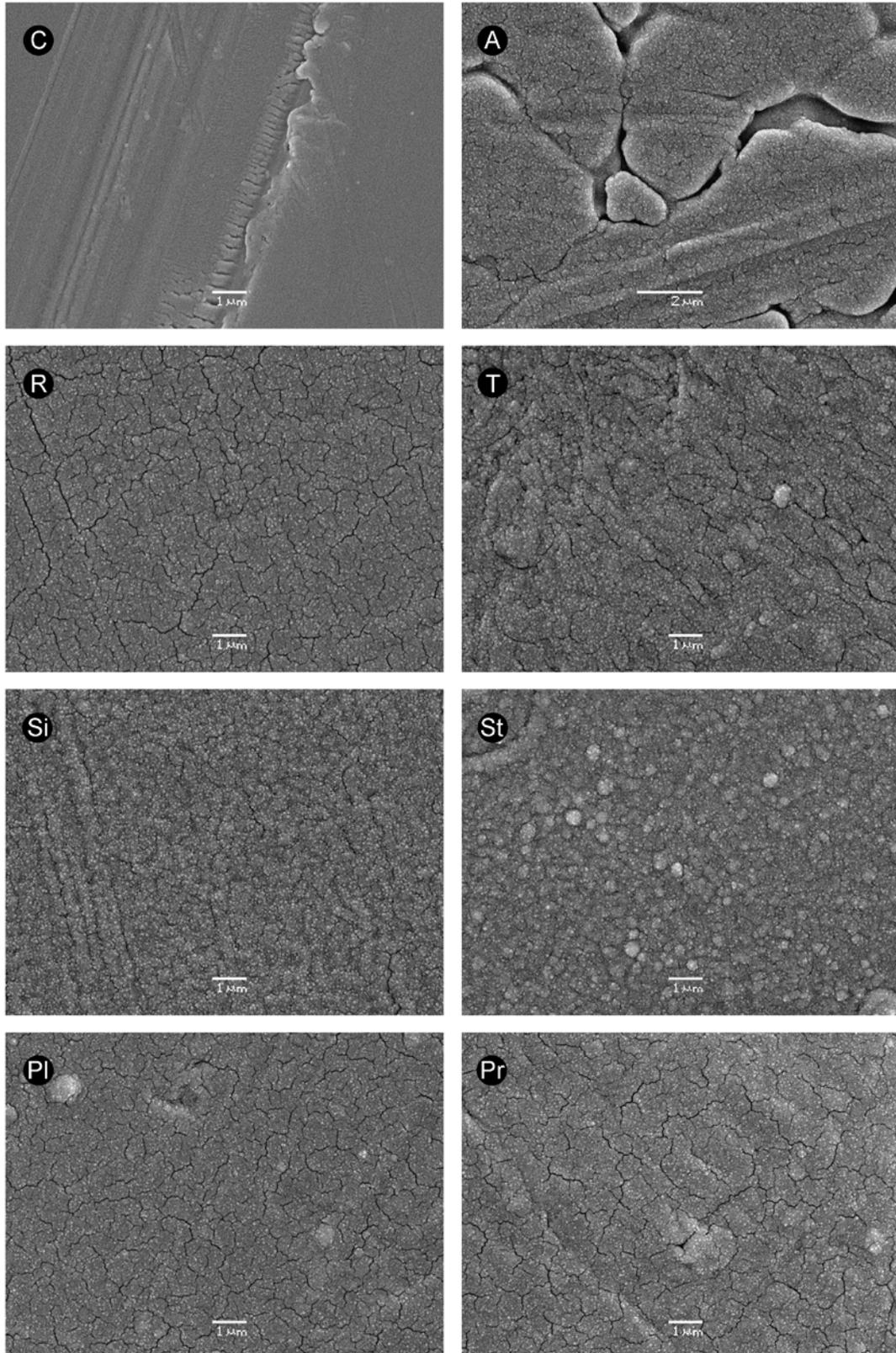


Figura 51. Microscopía electrónica de barrido a 10.000 aumentos de los materiales protésicos estudiados. C: cristal. A: acero. R: Resina acrílica de prótesis ocular. T: teflón. Si: silicona obtenida de implante orbitario. St: silicona obtenida de tapón de uso en laboratorio. PI: Polietileno de alta densidad liso. Pr: Polietileno poroso de alta densidad (PPAD).

7.4.2. Evaluación electromicroscópica de la formación del biofilm según la cepa bacteriana

Con los resultados obtenidos del estudio de la adhesión bacteriana sobre diferentes materiales (ver apartado 7.3 de Resultados) y después del análisis microscópico de la superficie de los mismos (ver apartado 7.4.1 de Resultados), se seleccionó el teflón como material sobre el que visualizar el grado de madurez del biofilm que era capaz de formar cada cepa. Se prefirió el teflón, ya que todas las cepas estudiadas mostraron una buena unión a este material (Figura 49), su adhesión relativa fue una de las más elevadas (Figura 50) y presentaba una superficie lisa (Figura 51). Además, al ser plástico y relativamente flexible, resultaba fácil de manipular.

Así, las cepas se incubaron a 37°C durante 24, 48 y 72 horas para valorar el momento en el que presentaban un biofilm con mayor grado de madurez. Se empleó el mismo procedimiento que para cuantificar la adhesión bacteriana sobre materiales (ver apartado 3.4.2 de Materiales y Métodos), pero empleando plaquitas de teflón. Tras este periodo de formación de biofilms, se procesaron las muestras para su visualización bajo el microscopio electrónico (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos).

Según se observa en la Figura 52, *S. marcescens* presentó un crecimiento en forma de microcolonia a las 24 h (Figura 52A), mientras que a las 48 h se redujo la población celular (Figura 52B), hasta casi desaparecer a las 72 h (Figura 52C). A mayor aumento, se apreció como la matriz extracelular estaba constituida por vesículas membranosas (Figura 52D). En el cultivo que se mantuvo durante 48 h en adhesión, pudimos observar, en algunas áreas con mayor densidad celular, estructuras tridimensionales, en forma de dedos y con canales en su base, características de un biofilm maduro (Figura 52E). En las bacterias degeneradas, se apreció con mayor facilidad el esqueleto de los pili sexuales, a través de los cuales las bacterias pueden compartir información genética (Figura 52F).

En la Figura 53 se muestran los biofilms formados por otras especies. La cepa aislada *S. epidermidis* HL, a las 24 h de crecimiento, mostró una abundante producción de matriz extracelular (Figura 53A), formada por vesículas membranosas de gran tamaño (Figura 53B). Al igual que en el caso de *S. marcescens* a las 72 h, la inmensa mayoría de las células y vesículas habían degenerado (Figura 53C).

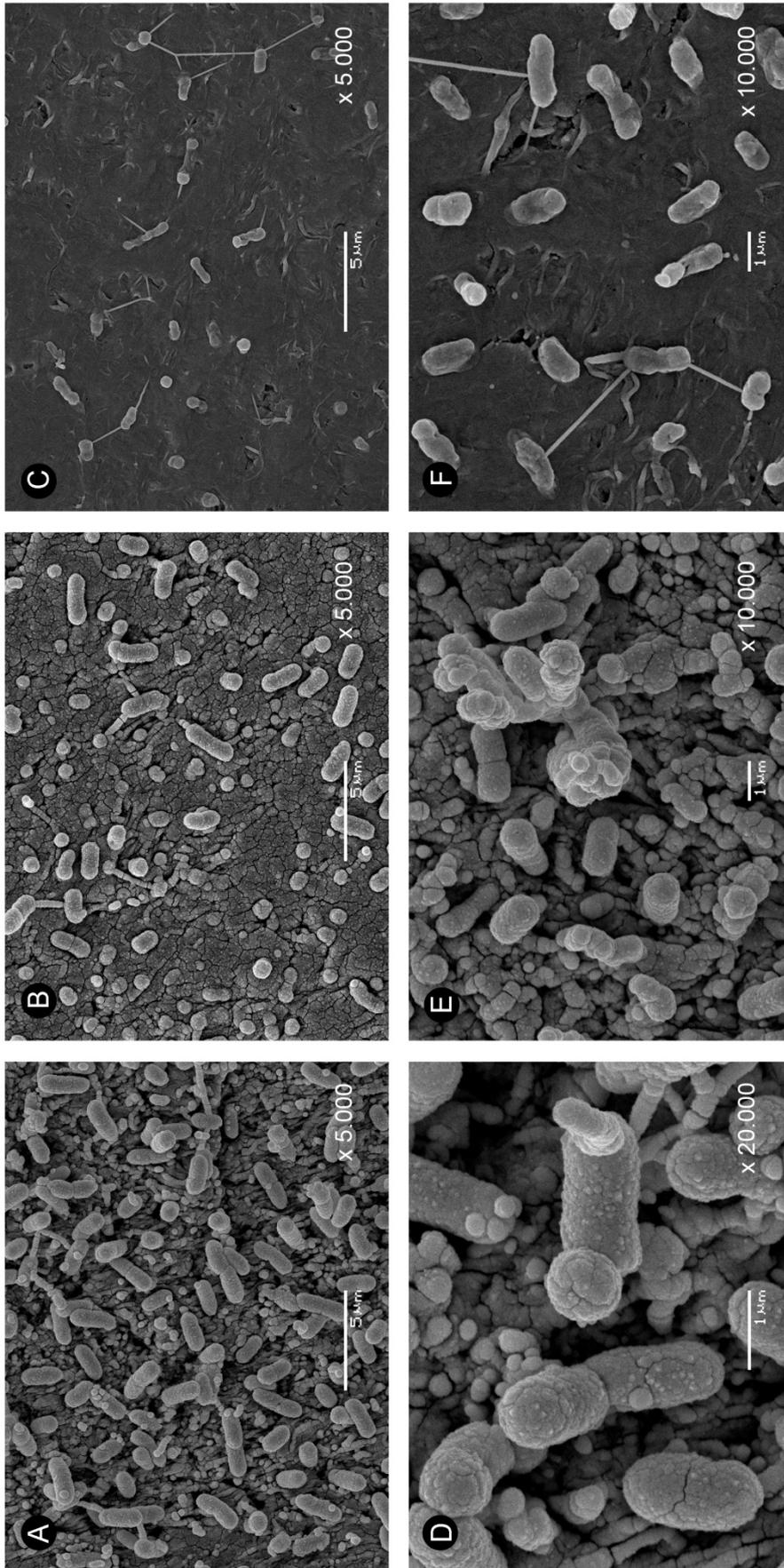


Figura 52. Microscopía electrónica de barrido del cultivo de *S. marcescens* sobre teflón, tras incubación durante 24 horas (A y D), 48 horas (B y E) y 72 horas (C y F). Aunque la densidad celular es menor a las 48 horas (B), existen áreas con desarrollo de un biofilm maduro (E). Tras 72 horas, las células presentan un aspecto deshidratado y degenerativo (F).

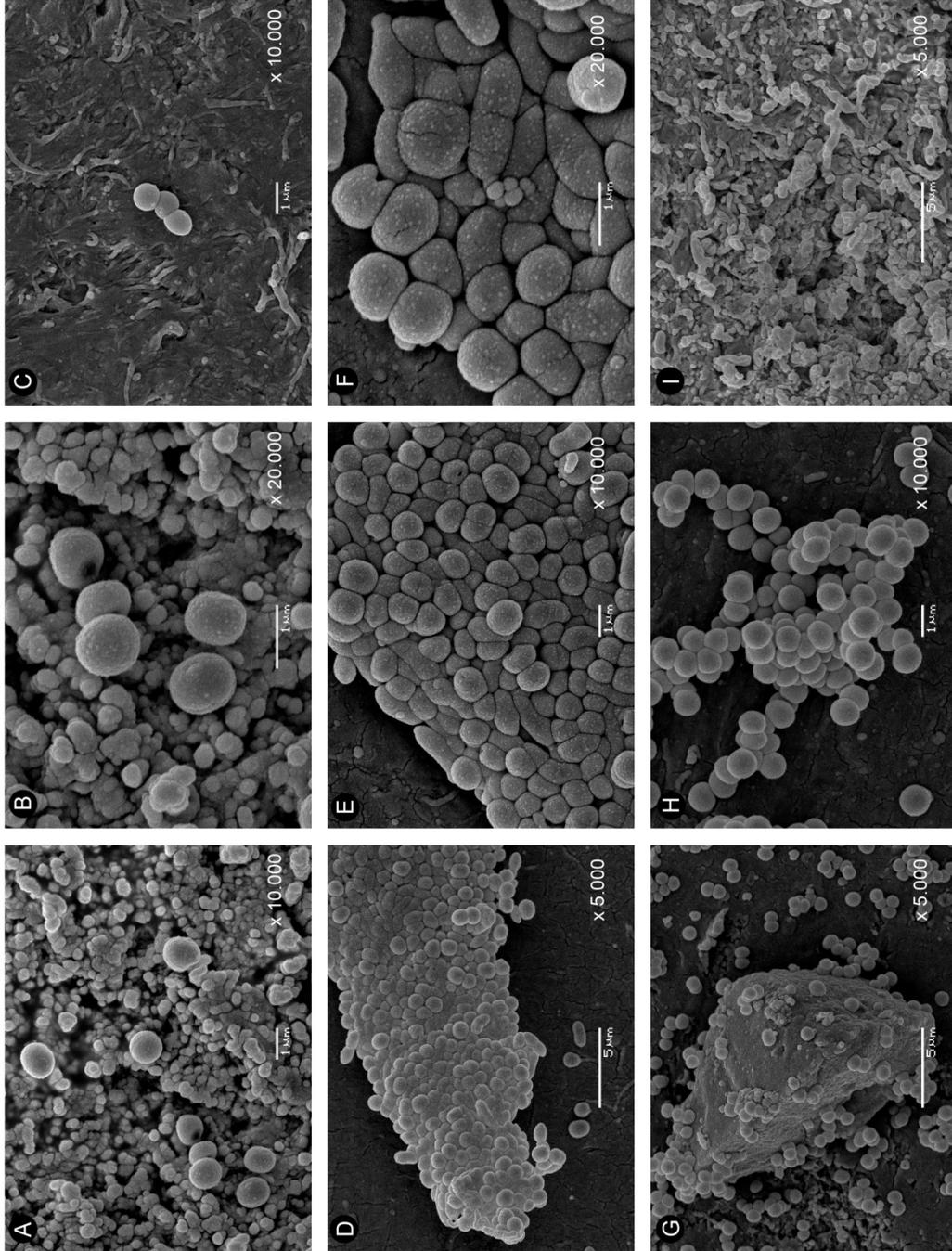


Figura 53. Microscopía electrónica de barrido del cultivo de diferentes cepas sobre teflón. A y B. *S. epidermidis* HL a las 24 horas de incubación, a diferentes aumentos. C. *S. epidermidis* HL a las 48 horas a distintos aumentos. D, E y F. *S. hominis* a las 24 horas. G. *S. aureus* a las 24 horas. Detalle donde se observa como las zonas resguardadas de una pequeña partícula de polvo fueron especialmente colonizadas. H. *S. aureus* a las 24 horas. I. *C. amycolatum* a las 48 horas.

La capacidad de formación de biofilm de *S. hominis* sobre la plaquita de teflón, fue claramente inferior, coincidiendo con los datos obtenidos en la cuantificación de adhesión sobre poliestireno (Figura 48). A las 48 horas de cultivo se observó un biofilm en fase de microcolonia (Figura 53D), con muy escasa matriz extracelular (Figura 53E) y vesículas membranosas de muy pequeño tamaño (Figura 53F). Por el contrario, *S. aureus* presentó una matriz extracelular más abundante (Figura 53G). A mayor aumento se pudo apreciar el crecimiento en forma racimo típico de *S. aureus* (Figura 53H).

En el caso de *C. amycolatum*, a las 48 h se observó una importante matriz extracelular, con formación de canales (Figura 53I).

De *S. epidermidis* CECT, ya que mostró una adhesión muy similar a la cepa *S. epidermidis* HL en el estudio de cuantificación de adhesión sobre poliestireno (Figura 48), así como de *A. calcoaceticus* dado su escaso crecimiento y adhesión (Figuras 47 y 48), y de *L. rhamnosus* por no tratarse de una bacteria típica de la flora conjuntival, no se tomaron imágenes microscópicas.

De este modo, en las cepas estudiadas, el máximo grado de madurez en los biofilms se obtuvo a las 24 horas, en el caso de *S. epidermidis* HL y *S. aureus*, y a las 48 horas en el caso de *S. hominis*, *S. marcescens* y *C. amycolatum*, mostrando todas ellas biofilms maduros, excepto *S. hominis* que sólo alcanzó la fase de microcolonia.

7.4.3. Electromicroscopía de la adhesión bacteriana *in vivo*

A fin de comprobar la presencia de microorganismos adheridos a prótesis oftalmológicas que habían sufrido una exposición, es decir, una necrosis del tejido de recubrimiento, se estudiaron las superficies de los implantes orbitarios expuestos de tres pacientes. Los implantes orbitarios estaban fabricados todos ellos en PPAD rugoso (Medpor®) y los pacientes reclutados resultaron ser todos varones. El aspecto macroscópico de los implantes orbitarios estudiados se muestra en la Figura 54.

El caso 1 correspondió con un varón de 30 años con exposición de su implante orbitario a los 2 meses de la cirugía de implantación y en el que los cultivos microbiológicos resultaron positivos para *S. pneumoniae*. El caso 2, fue un varón de 60 años, afecto de artritis reumatoide, cuyo implante orbitario se expuso 7 años después de

su introducción. Los cultivos microbiológicos, tomados de la superficie del implante, no mostraron crecimiento.



Figura 54. Aspecto macroscópico de los implantes orbitarios expuestos, cuya superficie fue evaluada mediante microscopía electrónica. A. Caso 1: cultivo positivo para *S. pneumoniae*. B. Caso 2. C. Caso 3. Tanto para el caso 2 como para el caso 3, los cultivos microbiológicos de la superficie expuesta no mostraron crecimiento.

Por último, el caso 3 correspondió con un varón de 49 años, con exposición de su implante orbitario 3,5 años después de la realización de una cirugía de evisceración y colocación de implante orbitario por sufrir una endoftalmitis. Al igual que en el caso 2, los cultivos microbiológicos fueron negativos.

La técnica para obtener la muestra de la superficie del implante varió de los pacientes 1 y 2 al paciente 3. En los dos primeros casos, se procuró realizar las manipulaciones mínimas para evitar dañar el biofilm, no se lavaron las superficies de la muestras y se introdujeron inmediatamente en su correspondiente frasco con glutaraldehído al 2,5% (ver apartado 3.5 de Materiales y Métodos). Sin embargo, la ausencia de lavado dificultó la observación nítida de formas bacterianas, debido a la presencia muy abundante de hematíes y fibrina (Figuras 55A y 55D). Únicamente se pudieron localizar algunas estructuras semejantes a bacterias aisladas (Figuras 55B y 55C) o a un biofilm (Figura 55E), siendo excepcional la localización de microorganismos en división (Figura 55F).

A tenor de los resultados obtenidos, en el caso 3 se modificó la técnica de obtención de la muestra. A pesar de que se había decidido extraer completamente el implante, se empleó inicialmente un punzón sacabocados dermatológico de 4 mm, con el cual, mediante movimientos rotatorios, se consiguió una muestra cilíndrica de PPAD, con una correcta orientación de la superficie expuesta. Tras extraer el cilindro de PPAD

Resultados

del sacabocados, se realizó un lavado profuso de la superficie del mismo con BSS, para eliminar los restos de moco, fibrina y sangre, asumiendo que con ello se pudiera eliminar parte del biofilm formado. Tras el lavado, se introdujo en un frasco con glutaraldehído al 2,5%.

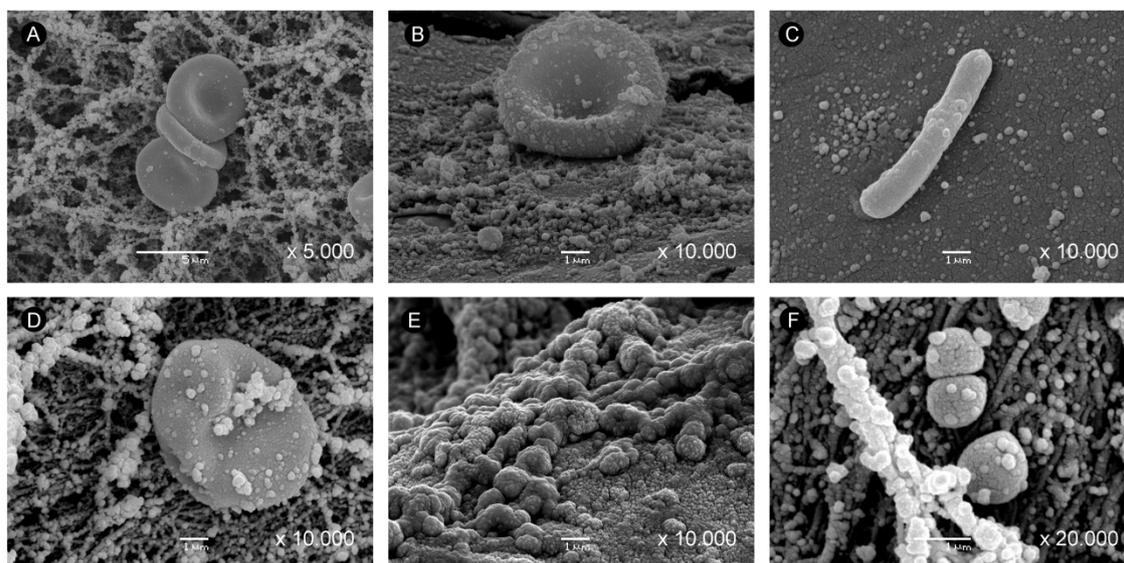


Figura 55. Microscopía electrónica de barrido del implante orbitario expuesto de dos pacientes. A. Caso 1: abundante presencia de fibrina con un grupo de tres hematíes. B. Caso 1: se observa a la izquierda de la escala una forma esférica, que por su tamaño probablemente fuera un coco. C. Caso 1: estructura de aspecto bacilar. D. Caso 2: hematí rodeado de abundante fibrina y moco. E. Caso 2: estructura con aspecto de biofilm. F. Caso 2: cocos dividiéndose, inmersos en un magma de fibrina.

Una vez procesada la muestra, se obtuvieron, bajo el microscopio electrónico, las imágenes que se presentan en la Figura 56. En primer lugar, y para mantener la orientación deseada en todo momento, se realizaron imágenes a sólo 20 aumentos, en donde se podía apreciar la forma cilíndrica de la muestra obtenida por el sacabocados de 4 mm (Figura 56A), y el aspecto rugoso del PPAD. A mayor aumento, se apreció como los poros en el PPAD, de entre 300 y 1000 μm , se continuaban como canales en profundidad (Figura 56B), pudiendo observarse, en el fondo de uno de estos canales, macrófagos adheridos a la superficie del implante (Figura 56C). En sucesivas ampliaciones, se localizaron numerosos cocos en división (Figuras 56D y 56E), algunos de ellos con formaciones de vesículas membranosas sobre su superficie (Figura 56F), sin que se observaran restos de sangre, fibrina, moco o matriz extracelular.

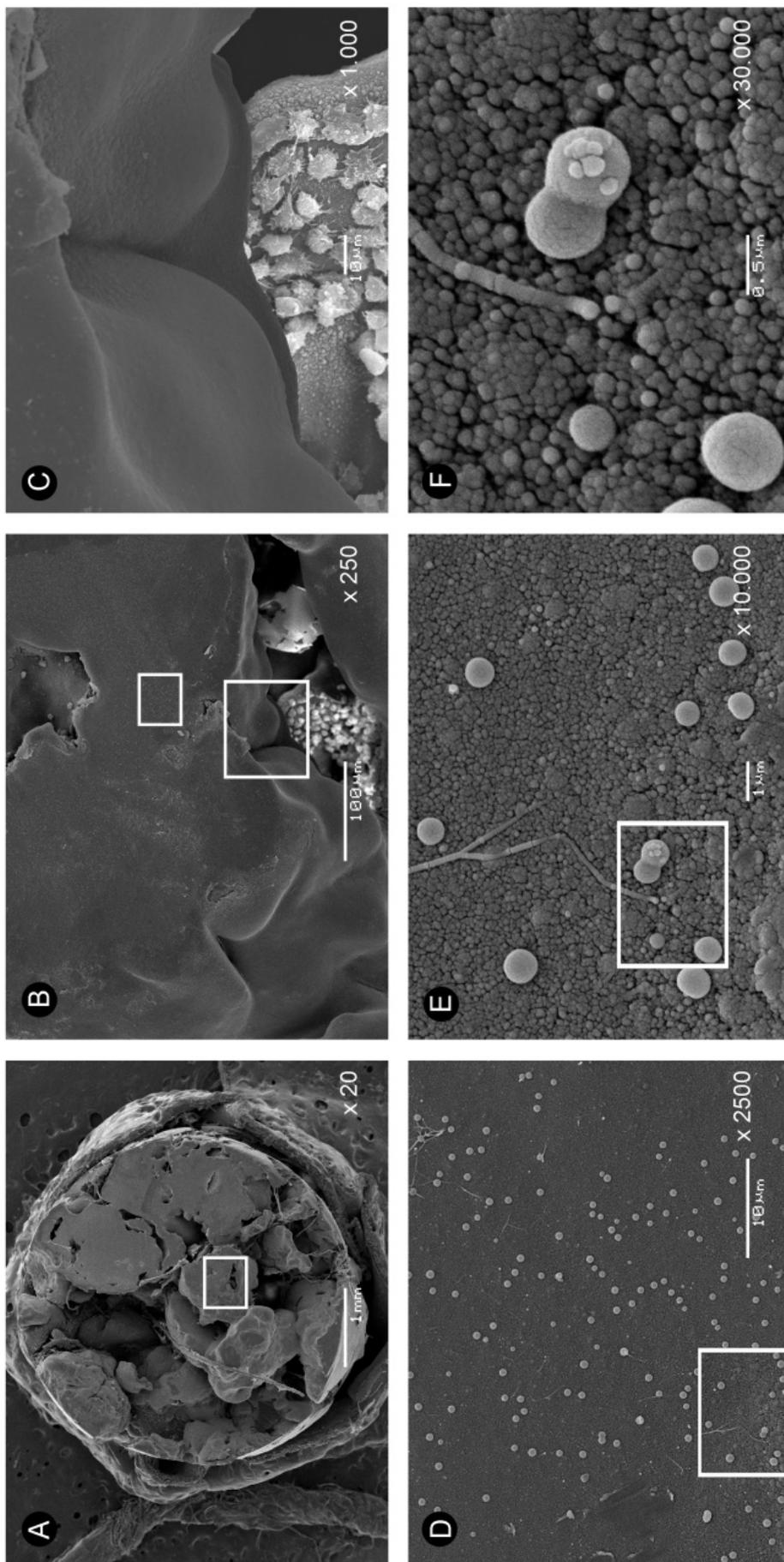


Figura 56. Microscopía electrónica de barrido del implante orbitario del paciente 3. A. Muestra del área expuesta del implante, obtenida con sacabocados dermatológico de 4 mm. B. Imagen ampliada del cuadro dibujado en la Figura 56A. Se aprecia como los poros en el PPAD (Medpor®) se continúan como canales en profundidad. C. Imagen ampliada del cuadro grande dibujado sobre la Figura 56B. En la parte inferior se observa un grupo de macrófagos adheridos a la superficie. D. Imagen ampliada del cuadro pequeño dibujado sobre la Figura 56B. Se observan múltiples cocos adheridos a la superficie. E. Imagen ampliada del cuadro dibujado sobre la Figura 56D. Cocos adheridos sin apreciarse matriz extracelular. F. Imagen ampliada del cuadro dibujado sobre la Figura 56E. Cocos dividiéndose, con alguna vesícula membranosa en su superficie.

Resultados

Es decir, tanto en el paciente 2 como en el paciente 3 (a pesar de haber lavado intensamente la superficie de la muestra), se visualizaron formaciones bacterianas adheridas a la superficie de los implantes orbitarios, aunque los cultivos microbiológicos habían sido informados como negativos.

DISCUSIÓN

1. Estudio microbiológico de la flora conjuntival en pacientes portadores de prótesis ocular

En este trabajo se ha realizado un exhaustivo estudio microbiológico de la flora conjuntival en pacientes anoftálmicos. Para ello, se analizaron 60 pacientes con pérdida del globo ocular y portadores de prótesis, en los que se estudiaron diferentes aspectos relacionados con la microbiota conjuntival. Esto hace, según los datos de que disponemos, que sea el estudio más amplio efectuado hasta el momento, referido a este tipo de patología.

Las características epidemiológicas que presentaban los pacientes de nuestro trabajo son similares a las recogidas en la mayoría de los estudios microbiológicos en pacientes anoftálmicos (Christensen y Fahmy, 1974; López-Sánchez *et al.*, 2001; Patillon *et al.*, 1978). También, hay que señalar que las enfermedades sistémicas que mostraban los pacientes incluidos en nuestro estudio mantienen la prevalencia habitual en nuestro medio para personas de su edad, destacando la patología cardiovascular (Aranda Lara *et al.*, 2000; Ortiz Marrón *et al.*, 2011).

A continuación, cotejaremos nuestros resultados con los obtenidos por otros autores, diferenciando entre los estudios que valoran la flora de los ojos sanos y de las cavidades anoftálmicas.

1.1. Flora conjuntival en los ojos sanos

En la Tabla 28 se presenta un resumen con las características principales de diferentes estudios microbiológicos realizados sobre la flora conjuntival en ojos sanos. Podemos observar que, aunque los SCN son el grupo más frecuentemente aislado, existe una considerable variabilidad en la TAG y la TAE de otros géneros como *Corynebacterium* o *Streptococcus*.

La flora identificada en los ojos sanos de nuestros pacientes (Tabla 10) ha sido similar a la descrita por estos autores (Tabla 28), aunque presenta algunas diferencias, especialmente en las TAE de *S. epidermidis*, corineformes y bacterias anaerobias estrictas, como puede apreciarse en la Tabla 29.

Discusión

Tabla 28. Resumen de diferentes estudios sobre flora conjuntival en ojos sanos.

Autores	Doyle et al. (1995)	Gritz et al. (1997)	De Kaspar et al. (2004)	Martins et al. (2004)	Fernández - Rubio (2004)	Gündüz et al. (2008)	Kusbeci et al. (2009)	Suto et al. (2012)
Número de pacientes	17	42	339	60	4432	50	102	579
Tipo de pacientes	Preop. Catarata	Controles	Preop. Catarata	Controles	Preop. Catarata	Controles	Controles	Preop. Catarata
Media de edad	75	38	75 *	67	73	36	61	72
Útil de muestreo	Hisopo	Hisopo	Hisopo	Hisopo	Asa	Hisopo	Hisopo	Hisopo
Material	Lana- algodón	Calcio- alginato	N.D.	Calcio- alginato	Platino	N.D.	N.D.	Algodón
Solución de muestreo	SSF	BSS	Caldo de sangre	BHI	N.D.	BHI	No (Seco)	N.D.
Cultivo previo	No	No	No	No	No	En BHI	No	No
Medio de cultivo Agar (Caldo)	Sangre, Columbia, anaerobio, Lab M	Sangre, Chocolate	Sangre Chocolate	Sangre, (BHI)	Sangre, Chocolate, McConkey	Sangre eosina, Chocolate, Saboreaud	Sangre, Chocolate, Saboreaud, (BHI)	Sangre, Chocolate,
TAG (%)	76,5	54,7	87,3	73,3	78,7	58,0	71,6	39,2
Nº cultivos positivos	23	34	360	69	4868	36	99	285
Nº especies / paciente	1,77	1,48	1,22	1,57	1,39	1,24	1,35	1,25
TAE (%)								
Aerobios Gram +								
SCN	52,2	67,7	46,4	53,6	51,8	66,7	49,5	57,5
<i>S. aureus</i>	4,3	0	3,6	10,1	6,0	5,6	10,1	3,9
<i>Corynebacterium spp</i>	4,3	11,8	25,6	33,3	27,7	0	15,2	26,7
<i>Micrococcus spp</i>	0	5,9	1,1	0	0	0	5,1	0
<i>Streptococcus spp</i>	0	0	2,8	0	7,6	2,8	11,1	3,2
Otros aerob. Gram +	0	0	1,1	0	0,5	8,3	1,0	2,8
Aerobios Gram -								
<i>Haemophilus spp</i>	0	0	0	0	2,3	0	2,0	0,4
<i>Moraxella spp</i>	0	2,9	0	0	0	5,6	1,0	0,4
<i>Proteus spp</i>	0	0	0	0	1,1	0	3,0	0,7
<i>Pseudomonas spp</i>	0	2,9	0	2,9	0,3	0	0	0,7
Otros aerob. Gram -	0	5,9	3,6	0	2,8	8,3	2,0	3,9
Anaerobios estrictos								
<i>P. acnes</i>	34,8	0	15,8	0	0	0	0	0
Otros anaerobios	0	0	0	0	0	0	0	0
Hongos								
<i>Candida spp</i>	4,3	0	0	0	0	2,8	0	0
Otros hongos	0	2,9	0	0	0	0	0	0

* Edad media estimada, teniendo en consideración que se trata de pacientes programados para cirugía de catarata. N.D.: No descrito. SSF: Suero salino fisiológico. BSS: Solución salina balanceada. BHI: Medio *Brain-Heart-Infusion*. TAG: Tasa de aislamiento global. TAE: Tasa de aislamiento por especie. SCN: Estafilococos coagulasa negativos.

Discusión

Así, la tasa de aislamiento de SCN ha sido más elevada en nuestra serie, mientras que la de bacterias corineformes ha sido más baja (Tabla 29). Además, no se ha conseguido el cultivo de ninguna especie de bacterias anaerobias estrictas ni de hongos en los ojos sanos de nuestros pacientes, a pesar de que la TAG de nuestra serie es, en promedio, más elevada que la de los trabajos referenciados (Tablas 28 y 29).

Tabla 29. Comparación de los resultados medios de microflora obtenidos en ojos sanos por los estudios de la Tabla 28 y en nuestro estudio (Tabla 10).

	Media de estudios Tabla 28 ±SD	Valores de nuestro estudio
TAG (%)	67,4 ±15,6	85,0
Nº especies / paciente con cultivo positivo	1,41 ±0,19	1,22
TAE (%)		
Aerobios Gram +	85,8 ±5,5 *	96,7
SCN	55,7 ±7,8	77,4
<i>S. aureus</i>	5,5 ±3,4	8,1
<i>Corynebacterium spp</i>	18,1 ±12,1	4,8
<i>Micrococcus spp</i>	1,5 ±2,5	1,6
<i>Streptococcus spp</i>	3,4 ±4,0	3,2
Otros aerobios Gram +	1,6 ±2,9	1,6
Aerobios Gram -	6,6 ±1,6	3,2
<i>Haemophilus spp</i>	0,6 ±1,0	0
<i>Moraxella spp</i>	1,2 ±2,0	1,6
<i>Proteus spp</i>	0,6 ±1,1	0
<i>Pseudomonas spp</i>	0,9 ±1,3	0
Otros aerobios Gram -	3,3 ±2,8	1,6
Anaerobios estrictos	6,4 ±6,6	0
<i>P. acnes</i>	6,3 ±12,8	0
Otros anaerobios	0,1 ±0,3	0
Hongos	1,3 ±1,4	0
<i>Candida spp</i>	0,9 ±1,7	0
Otros hongos	0,4 ±1,0	0

TAG: Tasa global de aislamiento. TAE: Tasa de aislamiento por especie. SCN: Estafilococos coagulasa negativos. * Valor calculado sumando los valores de TAE de cada grupo de microorganismos (en este caso Aerobios Gram positivos) y promediando la desviación estándar de los valores de TAE.

Como hemos mencionado, en la recopilación de los resultados de otros autores (Tabla 28), se observó una gran variabilidad inter-estudio que dificultó el análisis comparativo. Esta disparidad obstaculiza el establecimiento de una flora conjuntival habitual estándar (Fernández-Rubio, 2004; Hsu *et al.*, 2013), aunque podemos

establecer una serie de porcentajes aproximados de géneros y especies microbianas en la flora conjuntival normal (ver apartado 4.1.5 de Introducción).

Las causas de las diferencias entre los resultados de los distintos trabajos las encontramos en la diferente metodología y tipo de población. Aunque otros factores, como la temperatura y humedad ambiental podrían influir (Ando y Takatori, 1982), son los medios de cultivo empleados, así como las condiciones de cultivo (tiempo, temperatura y atmósfera), técnica de recogida de muestras, material empleado, o momento de la siembra, los primeros factores que debemos considerar (Fernández-Rubio, 2004).

Según los medios de cultivo, podemos diferenciar los trabajos en dos grandes grupos: convencionales, aquellos que utilizan medios de cultivo generales; y específicos, aquellos que emplean técnicas y medios de cultivos especiales y que están expresamente diseñados para el aislamiento de microorganismos difíciles de cultivar, como son las bacterias anaerobias estrictas (McNatt *et al.*, 1978) o los hongos (Ando y Takatori, 1982). En nuestro caso, nos decidimos por el empleo de un pre-cultivo inicial en un medio general, BHI, y un segundo pase a medios específicos. Sin embargo, no se consiguió el aislado de microorganismos anaerobios estrictos, y tan sólo se aislaron dos especies de hongos y sólo en las muestras de las cavidades anoftálmicas. Seguramente, el hecho de cultivar inicialmente nuestros hisopos en medio BHI en condiciones aeróbicas (ver apartado 1.4 de Materiales y Métodos), ha impedido que posteriormente se pudieran aislar bacterias anaerobias estrictas u hongos, a pesar del uso de medios específicos para estas especies.

Respecto a la población seleccionada, también existen dos grupos de estudios: a) aquellos que toman muestras preoperatorias de los pacientes programados para cirugía de catarata, que son los más numerosos, y b) estudios que valoran las modificaciones que ciertas enfermedades pueden provocar sobre la flora conjuntival. Los primeros, pueden presentar un sesgo en cuanto a los gérmenes aislados, ya que los pacientes que se intervienen de cataratas habitualmente son personas mayores, con mayor incidencia de factores modificadores de la flora como DM, blefaritis, ojo seco, etc. (ver apartado 4.2 de Introducción). Además, como podemos apreciar en la Tabla 28, existe, en general, una correlación positiva entre la edad y la tasa de aislamiento de microorganismos, ya descrita por Thiel y Schumacher (1994). Estos autores observaron

que con la edad se produce un incremento en la tasa de aislamiento de *Corynebacterium spp*, manteniéndose la de las especies del género *Staphylococcus* y disminuyendo las del género *Propionibacterium*.

Por el contrario, los estudios realizados para valorar la influencia de ciertas patologías sobre la flora cuentan con grupos controles formados por pacientes sanos de edad similar al grupo de estudio, lo que permite que podamos tener una idea global más aproximada de la flora conjuntival común.

En nuestro caso, el hecho de emplear el ojo sano contralateral como control, elimina el efecto modificador de la edad o las condiciones ambientales. Sin embargo, debemos considerar el hecho de que la presencia de una cavidad anoftálmica, podría ser en sí misma un factor que alterase la flora conjuntival del ojo sano (Patillon *et al.*, 1978; López-Sánchez *et al.*, 2001), como más adelante discutiremos.

En resumen, y a pesar de estas diferencias metodológicas, tras comparar nuestros resultados con los trabajos previos, podemos concluir que los microorganismos más característicos de una flora conjuntival normal son los SCN, siendo, con mucha diferencia, *S. epidermidis* la especie más frecuente en una conjuntiva sana. Las bacterias corineformes se presentan en la flora conjuntival habitual en un porcentaje muy variable (5-30%), mientras que la presencia de una TAE superior al 10% de SCP, estreptococos o bacterias Gram negativas, debe considerarse una disbiosis que promovería determinadas patologías oculares (ver apartado 4.3 de Introducción). Parece probable por tanto, que la presencia de *S. epidermidis*, en equilibrio con otros SCN y bacterias corineformes, proteja a la superficie ocular de la colonización de otras especies como SCP, estreptococos o bacterias Gram negativas.

1.2. Flora conjuntival en las cavidades anoftálmicas

La flora bacteriana obtenida de las cavidades anoftálmicas de nuestros pacientes, difirió de forma significativa de la encontrada en los ojos sanos contralaterales (Tablas 10 y 11). Así, en la flora de las cavidades anoftálmicas se constató una mayor TAG (95% y 100% en las muestras pre-prótesis y retro-prótesis de las cavidades, respectivamente, frente a un 85% en las muestras de ojos sanos), un crecimiento microbiano más precoz (Tabla 13), así como la presencia significativamente más

elevada de microorganismos considerados patógenos (Tabla 16), en particular de estreptococos y de bacterias Gram negativas (Tabla 14).

Nuestros resultados están en línea con los obtenidos por otros autores que también encuentran diferencias significativas entre la flora de las cavidades anoftálmicas y los ojos sanos contralaterales (Christensen y Fahmy, 1974; Miller *et al.*, 1976; Campos *et al.*, 1994). Existen otros trabajos que no observan estas diferencias como significativas, probablemente, por carecer del tamaño muestral adecuado (Patillon *et al.*, 1978; López-Sánchez *et al.*, 2001) o por no contar con un grupo control (Macivor, 1950; Thygeson y Kimura, 1963; Morgan y Hill, 1964; Goldfarb y Turz, 1966; Vasquez y Linberg, 1989). Los estudios microbiológicos de la cavidad anoftálmica sin grupo control resultan, en general, difíciles de interpretar. Aun así, parecen indicar que en las cavidades anoftálmicas podría existir un aumento de bacterias Gram negativas y una disminución relativa de los SCN. Por el contrario, los trabajos con grupo control permiten obtener resultados más precisos. El primer estudio que comparó la flora obtenida de la cavidad anoftálmica con la del ojo contralateral, como grupo control, fue el de Christensen y Fahmy (1974). Estos autores constataron un incremento significativo en la cavidad anoftálmica del grupo de bacterias formado por Gram negativos y anaerobios (Tabla 30). Otros trabajos han obtenido datos de incrementos significativos en las cavidades anoftálmicas de bacterias Gram negativas, SCP, *S. pneumoniae* (Miller *et al.*, 1976) y *P. acnes* (Campos *et al.*, 1994).

En definitiva, tanto nuestros resultados como los obtenidos por otros estudios revelan que la pérdida del globo ocular provoca un desplazamiento de la microbiota habitual de la conjuntiva, produciéndose un aumento de la presencia de algunos microorganismos menos habituales, en general, considerados patógenos.

Para establecer una división objetiva de los grupos de microorganismos por su capacidad patogénica, nos basamos en la diferente tasa de aislamiento en ojos con endoftalmitis (como complicación infecciosa más severa de la cirugía intraocular) respecto a la tasa de aislamiento en la flora conjuntival pre-cirugía (Tabla 31). Así, según los datos de Fernández-Rubio (2004) y Gentile *et al.* (2014), pudimos comprobar que la tasa de aislamiento en endoftalmitis de SCP (*S. aureus*), estreptococos, enterococos, bacterias Gram negativas y hongos, duplica o incluso triplica la obtenida de los cultivos de flora conjuntival pre-cirugía, lo que indica su elevada agresividad.

Discusión

Tabla 30. Flora aislada por otros estudios en ojos sanos y cavidades anoftálmicas, estratificada por grupos de microorganismos y patogenicidad de los mismos.

Autores	Christensen y Fahmy (1974)		Miller <i>et al.</i> (1976)		Patillon <i>et al.</i> (1978)		López-Sánchez <i>et al.</i> (2001)	
	Número de pacientes	44		52		42		26
Tipo de prótesis	Cristal		Cristal / Plástico acrílico		N.D.		N.D.	
Controles	Ojo sano contralateral		Ojo sano contralateral		Ojo sano contralateral		Ojo sano contralateral	
Media de edad	67,5		22		49		57	
Útil de muestreo	Hisopo		Hisopo		Hisopo		Hisopo	
Material	Lana-algodón		Lana-algodón		N.D.		Algodón	
Solución de muestreo	Seco		Seco		SSF		N.D.	
Cultivo previo	No		Stuart's Holding Broth		No		No	
Medio de cultivo Agar (Caldo)	Sangre, (Suero bovino)		Sangre, Chocolate (Caldo Tioglicolato)		N.D.		Sangre, Chocolate, McConkey, Saboraud, Wilkins-Chalgren	
Muestra	Control	C.A.	Control	C.A.	Control	C.A.	Control	C.A.
TAG (%)	93%	98%	N.D.	98%	45%	55%	58%	77%
Nº cultivos positivos	76	89	66	101	24	31	15	20
Nº especies / paciente	1,93	2,09	N.D.	1,98	1,26	1,35	N.D.	
Grupos de microorganismos								
SCN	36	37	39	16	9	8	N.D.	
<i>Corynebacterium spp</i>	27	28	9	10	7	8		
<i>Micrococcus spp</i>	1	1	0	0	2	4		
<i>S. aureus</i>	7	9	13	24	2	4		
<i>Streptococcus spp</i> y otros Gram positivos	4	6	3	24	0	2		
Aerobios Gram negativos, anaerobios y hongos	1	8	2	27	4	5		
Cultivos según patogenicidad								
Baja patogenicidad	64	66	48	26	18	20	8*	10*
Alta patogenicidad	12	23	18	75	6	11	7*	10*

En negrita, valores estadísticamente significativos en cada estudio. * Valores estimados.

Discusión

Por el contrario, los SCN y, especialmente, los corineformes presentan unas tasas de aislamiento inferiores en los cultivos de endoftalmitis respecto a los cultivos de la flora conjuntival pre-cirugía, lo que nos permite asumir el carácter comensal o simbiótico de estas especies.

Tabla 31. Comparación de la flora aislada en la conjuntiva pre-intervención quirúrgica de catarata (Fernández-Rubio, 2004) y la obtenida del cultivo de muestras intraoculares en pacientes con endoftalmitis (Gentile *et al.*, 2014). La tasa de aislamiento en endoftalmitis es considerablemente mayor para los grupos de microorganismos más agresivos.

Autores	Fernández- Rubio (2004)	Gentile et al (2014)
Número de pacientes	4432	911
Tipo de pacientes	Preop. Catarata	Endoftalmitis post-cirugía intraocular
Media de edad	73	67
Nº cultivos positivos	4868	988
TAE (%)		
SCN	51,8	39,4
<i>S. aureus</i>	6	11,1
<i>Corynebacterium spp</i>	27,7	1,3
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,4	5,2
Otros estreptococos ^a	4,8	13,7
Enterococos	0,3	2,2
Bacterias Gram negativas	6,5	10,3
Hongos	0	4,5

^a Fundamentalmente incluye estreptococos del grupo viridans.

De este modo, hemos establecido dos grandes grupos de microorganismos en cuanto a su capacidad patogénica. Por una lado los SCP, estreptococos, enterococos, bacterias Gram negativas y hongos que han sido considerados como especies altamente patógenas; y por otro lado, los SCN y las bacterias corineformes, que se han considerado saprofitas o de baja patogenicidad. Una división similar ha sido realizada por otros autores previamente (Patillon *et al.*, 1978; López-Sánchez *et al.*, 2001), aunque estos lo hicieran, probablemente, para intentar compensar una baja tasa de aislamiento global y un tamaño muestral reducido.

Estudiando nuestros resultados en función de la patogenicidad asignada a cada grupo de microorganismos, también se observó una diferencia significativa, siendo mayor la presencia de especies consideradas como patógenas (SCP, estreptococos, enterococos, Gram negativas y hongos), en las cavidades anoftálmicas (ver apartado 1.4.3 de Resultados). Este hecho es lógico, si consideramos que en los otros grupos de microorganismos no encontramos diferencias significativas entre su presencia en los ojos sanos y las cavidades anoftálmicas, y que tanto los estreptococos como las bacterias Gram negativas se consideraron especies patógenas.

Por lo tanto, aunque *S. epidermidis* continúa siendo la especie más prevalente en las cavidades anoftálmicas, se observa un desplazamiento de la flora conjuntival normal en las cavidades en favor de un aumento de las especies patógenas, lo que implicaría un mayor riesgo de infección de los elementos protésicos al realizar una cirugía en las cavidades, así como una mayor diseminación de patógenos hacia las áreas próximas (piel y conjuntiva del ojo sano contralateral) si se manipula con frecuencia la prótesis ocular o los párpados de la cavidad anoftálmica.

2. Cuantificación de la densidad microbiana conjuntival

Cuando se estudió la flora conjuntival de forma cuantitativa, esto es, valorando el crecimiento celular (expresado por la D.O. _{540 nm}) de las muestras tras incubación a 37°C durante 48 horas, también se encontraron diferencias significativas entre las muestras de los ojos sanos y de las cavidades anoftálmicas, en los 29 pacientes en que fue medida.

Esta valoración global de la flora refleja la densidad microbiana de cada entorno y por tanto, la mayor carga bacteriana presente en las cavidades anoftálmicas (Figura 44). Estos datos están en consonancia con los obtenidos en los apartados 1.2 y 1.3 del capítulo de Resultados, en donde se observó una mayor TAG en las cavidades anoftálmicas respecto a los ojos sanos, lo que reafirma la hipótesis de que la flora de la cavidad anoftálmica se encuentra alterada respecto a los ojos sanos, no sólo cualitativamente como se expuso en el apartado anterior, sino también cuantitativamente, al presentar una mayor densidad microbiana. Además, este incremento bacteriano en las cavidades anoftálmicas es lógico, puesto que en ellas

existe un aumento de especies patógenas (Tabla 16), las cuales muestran en general una curva de crecimiento más elevada y rápida, como se comprobó para *S. aureus* y *S. marcescens* (Figura 47), haciendo que su presencia en un cultivo conjuntival provoque un incremento en la densidad microbiana del mismo (Tabla 17).

Además de determinar diferencias globales en la D.O. entre ojos sanos y cavidades anoftálmicas, se observó una correlación entre el crecimiento microbiano de las muestras retro-prótesis y pre-prótesis (Figura 45A), lo cual es lógico puesto que se trata de espacios comunicados, tan sólo separados de forma no hermética por la prótesis ocular. Más llamativo fue el hecho de que se observara una correlación positiva entre la absorbancia de las muestras pre-prótesis y de los ojos sanos contralaterales (Figura 45B), lo que parece indicar que una mayor densidad microbiana en la cavidad anoftálmica repercutiría en una mayor densidad microbiana en la conjuntiva del ojo sano contralateral. Este traspaso de microbios desde la cavidad anoftálmica al ojo sano contralateral explicaría por qué algunos autores no encuentran diferencias significativas entre la flora de las cavidades anoftálmicas y los ojos sanos contralaterales (Patillon *et al.*, 1978; López-Sánchez *et al.*, 2001). Así, López-Sánchez *et al.* (2001) describieron un incremento no significativo en la tasa de aislamiento de bacterias patógenas (Gram negativos, estreptococos, y SCP) de las cavidades anoftálmicas (37%) frente a los ojos sanos contralaterales (27%). Sin embargo, en su segundo grupo control formado por ojos sanos de pacientes sin prótesis, encontraron una tasa de bacterias patógenas significativamente menor (8%).

Por tanto, en base a los datos obtenidos por otros autores y a nuestros resultados, podemos concluir que la ausencia de globo ocular, junto con la presencia de un ojo artificial, modifica la flora conjuntival en la cavidad anoftálmica, y además, también repercute, aunque en menor medida, sobre la flora del ojo sano contralateral. De esta manera, debemos extremar los cuidados antisépticos y antibióticos en la cirugía intraocular del ojo único de un paciente anoftálmico (Patillon *et al.*, 1978; López-Sánchez *et al.*, 2001), y hacer conscientes a los pacientes anoftálmicos de la importancia de no manipular excesivamente la prótesis ocular y el área periocular de su cavidad anoftálmica, ya que ésta actúa como reservorio de microorganismos patógenos.

3. Factores modificadores de la flora conjuntival

A continuación, interpretaremos los datos presentados en el apartado 3 de Resultados, obtenidos de la comparación entre las características evaluadas en los pacientes (Tabla 18) y su flora conjuntival, tanto en los ojos sanos como en las cavidades anoftálmicas.

3.1. Características del paciente

De los posibles factores modificadores de la flora conjuntival dependientes del paciente (edad, sexo y enfermedades sistémicas), se observó una relación significativa en función de la edad, siendo ésta menor en los pacientes con cultivo negativo en su ojo sano respecto a los pacientes con cultivo positivo (Tabla 19). Este resultado está en línea con los datos recogidos en la Tabla 28, donde ya comentamos que existía una correlación positiva entre la edad y la tasa de aislamiento de microorganismos. Sin embargo, en nuestra serie no se encontró el incremento de un grupo de microorganismos en concreto, a diferencia de lo publicado por Thiel y Schumacher (1994) quienes han apreciado un aumento de las bacterias corineformes con la edad.

Con respecto al sexo, no se observó diferencia alguna en la flora conjuntival en nuestra serie de pacientes. Tampoco hemos encontrado otro trabajo que presente diferencias en la microbiota conjuntival en función del género, por lo que consideramos que éstas no deben existir.

En cuanto a las enfermedades sistémicas, sólo se observó una mayor presencia de estreptococos en los pacientes sin tratamiento sistémico y en aquellos con hipercolesterolemia. Aunque estas asociaciones fueron estadísticamente significativas ($p = 0,032$ y $p = 0,020$; respectivamente), sus conclusiones parecen dirigirse en sentidos opuestos (mayor presencia de estreptococos en personas sanas y también en hipercolesterolémicas) por lo que no encontramos una explicación clínica que justifique estas asociaciones. Además, la hipercolesterolemia, al igual que la hipertensión arterial o la alergia a medicamentos, no parecen condiciones que puedan tener una repercusión a nivel de la flora conjuntival. Por otro lado, los fármacos antidepresivos pueden producir un ojo seco (Yang *et al.*, 2015) que podría relacionarse con una modificación en la flora conjuntival (Kusbeci *et al.*, 2009). Sin embargo, este hecho no se ha constatado en

nuestro estudio, al igual que en otros realizados específicamente para valorar la influencia de la sequedad ocular en la microbiota conjuntival (Chen *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2013). Algo similar ocurre en el caso de la DM, que aunque parece ser un factor favorecedor del crecimiento bacteriano en la conjuntiva (Martins *et al.*, 2004), no se apreció este efecto en nuestra serie.

3.2. Características de la cavidad anoftálmica

3.2.1. Antecedentes de la pérdida ocular

La causa de la anoftalmía, así como el tipo de intervención quirúrgica, no demostraron ser factores modificadores de la microbiota conjuntival, como era de esperar puesto que no parece plausible pensar que su efecto pueda prolongarse una vez realizada la extirpación ocular. Por el contrario, los pacientes intervenidos hace más tiempo (tiempo de anoftalmía igual o superior a 21 años) presentaron una mayor tasa de microorganismos patógenos, en concreto de estreptococos, en la flora pre-prótesis (ver apartado 3.2.3 de Resultados).

Consideramos que la explicación más probable del aumento de bacterias patógenas en los pacientes operados hace más tiempo se debe a que el tiempo de anoftalmía es un factor de confusión y no un factor relacionado directamente con la flora. El tiempo de anoftalmía está asociado de forma muy significativa ($p < 0,001$) con la presencia de implante orbitario en la cavidad (Tabla 32), puesto que los implantes orbitarios se emplean en nuestro ámbito sólo desde hace unos 20 años (ver apartado 2.3.4 de Introducción). De este modo, los pacientes intervenidos hace más tiempo no portan, en general, implantes orbitarios, y en ellos se aprecia un incremento de especies patógenas, nuevamente de estreptococos, tanto en la flora pre-prótesis como retro-prótesis de las cavidades (Tabla 20).

No hemos encontrado, en nuestra revisión, artículos en los que se valore el posible efecto de la presencia del implante orbitario sobre la flora conjuntival, aunque parece lógico pensar que su existencia empequeñece de forma considerable el espacio retro-prótesis, disminuyendo la cantidad de lágrima y moco que puede acumularse en la cavidad. Por ello, la presencia de implantes orbitarios en las cavidades anoftálmicas,

además de las conocidas ventajas estéticas, parecen reducir la posibilidad de la colonización conjuntival por bacterias patógenas (Tabla 20).

Tabla 32. Relación entre el tiempo de anoftalmía y la presencia o ausencia de implante orbitario.

	Número de pacientes según el tiempo de anoftalmía			^a p-valor
	0 a 3 años	4 a 20 años	21 años o más	
Presencia de implante orbitario	19	11	3	< 0,001**
Ausencia de implante orbitario	0	8	19	

^a p-valor calculado con el estadístico χ^2 . **Diferencia estadísticamente muy significativa.

Por último, resalta la asociación estadísticamente significativa encontrada entre el incremento de especies patógenas, otra vez a costa del aumento de estreptococos, en las muestras pre-prótesis de las cavidades anoftálmicas izquierdas (ver apartado 3.2.1 de Resultados). Una posible explicación a este hallazgo es que, aunque no se ha registrado en el estudio realizado, suponemos que la mayoría de nuestros pacientes eran diestros, lo cual puede suponer una ventaja a la hora de lavar la cavidad anoftálmica si ésta es la derecha.

3.2.2. Estado actual de la cavidad

La existencia de epífora se asoció a un mayor número de cultivos de *S. epidermidis* en las muestras del espacio retro-prótesis, así como a un mayor crecimiento bacteriano, medido por D.O., en dicha localización (ver apartado 3.2.6 de Resultados). Esto indica que la existencia de una mayor cantidad de fluido, puede favorecer el crecimiento bacteriano, aunque no parece influir en el grado de patogenicidad ni en la flora del ojo sano contralateral. Por el contrario, tanto la hiperemia como la presencia de moco en la cavidad anoftálmica se relacionaron con una modificación de la microbiota, pero no de la flora de la cavidad, sino del ojo sano contralateral. Así, se aislaron más patógenos en los ojos sanos si existía hiperemia en la cavidad, y un crecimiento bacteriano más elevado en los cultivos de los ojos sanos si se observaba moco en la cavidad (ver apartado 3.2.7 de Resultados).

Estos datos vuelven a poner de manifiesto la posible transferencia de microorganismos desde la cavidad anoftálmica al ojo sano contralateral, aunque la

valoración, bien del grado de epífora como de la hiperemia y presencia de moco, tiene un componente subjetivo importante, tanto por parte del paciente como del investigador, lo que limita su utilidad.

3.2.3. Tratamientos tópicos empleados en la cavidad anoftálmica

En este punto se debe resaltar el escaso interés del empleo continuado de antibióticos, ya que su uso, al igual que el suero fisiológico, no se asoció con la disminución de grupo bacteriano alguno ni de la densidad bacteriana. Por el contrario, los pacientes que empleaban lubricantes oculares presentaron un mayor número de bacterias corineformes, no patógenas, en el espacio pre-prótesis, mientras que los pacientes que no empleaban tratamientos tópicos mostraron un incremento de estreptococos en la flora pre-prótesis (ver apartado 3.2.8 de Resultados). Basándonos en estos resultados, podemos concluir que la limpieza con suero fisiológico y el uso de lubricantes oculares es aconsejable, debiendo evitarse el uso prolongado de antibióticos o la ausencia de tratamiento tópico.

3.3. Cuidados de la prótesis ocular

Ni la antigüedad de la prótesis ni los productos de limpieza de la misma se asociaron con una modificación de la flora conjuntival. Por el contrario, la manipulación frecuente de la prótesis, retirándola al menos una vez cada semana, se asoció con una mayor presencia, en las muestras pre-prótesis, de bacterias patógenas (SCP, estreptococos, enterococos, bacterias Gram negativas y hongos) así como de un incremento en el crecimiento bacteriano (ver apartado 3.3 de Resultados). Nuestros datos corroboran los obtenidos por Vasquez y Linberg (1989) quienes encuentran un aumento significativo de bacterias Gram negativas en los pacientes considerados manipuladores frecuentes. Probablemente, la reintroducción de la prótesis arrastra microorganismos de la piel hacia la cavidad, mientras que el roce mecánico de la extracción y inserción de la prótesis actuaría traumatizando la conjuntiva, como ocurre en el síndrome de captura de moco (Kanski, 2002), donde la presencia de secreción hace que los pacientes se limpien la conjuntiva irritándola y favoreciendo que esta produzca de nuevo más moco.

4. Factores en relación con la tolerancia subjetiva de la prótesis ocular

Las variables del paciente y de la cavidad anoftálmica que se asociaron con una mejor tolerancia subjetiva a la prótesis ocular fueron: la ausencia de inflamación de la conjuntiva, la ausencia de tratamiento tópico y la menor manipulación de la prótesis ocular (Tabla 21).

Las cavidades anoftálmicas sin hiperemia conjuntival ni moco se asociaron con una mejor tolerancia subjetiva, lo cual es lógico si pensamos que la hiperemia conjuntival y la presencia de moco son dos variables asociadas entre sí ($p < 0,001$) y que uno de los parámetros que se valoró como criterio para definir la tolerancia subjetiva era, precisamente, la existencia de secreción (ver apartado 1.3.2 de Materiales y Métodos).

La asociación entre la ausencia de tratamiento tópico y una tolerancia buena se debe, probablemente, a que los pacientes que consideran que tienen una buena tolerancia, no tienen la necesidad de emplear ningún tipo de tratamiento. El extremo opuesto se observó en los pacientes que empleaban colirios antibióticos de forma habitual, quienes solían presentar una tolerancia mala o regular, aunque en esta comparación (Tabla 21) no se alcanzó el nivel de significación estadística ($p = 0,096$). Por ello, como comentamos en el apartado 3.2.3 de Discusión, no parece recomendable el uso prolongado de antibióticos, ya que con ellos no se consigue disminuir la flora patógena ni mejorar la tolerancia.

El tercer factor que se asoció con una mejor tolerancia, fue la menor manipulación de la prótesis ocular (Tabla 21). Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Pine *et al.* (2012) quienes observaron un incremento en el volumen y viscosidad de la secreción en pacientes que retiraban con frecuencia su prótesis ocular. Nuevamente se plantean varias explicaciones posibles a este hecho. Por un lado, al igual que ocurre con los tratamientos tópicos, los pacientes con buena tolerancia, tienen menos necesidad de retirar la prótesis ocular, lo que a su vez, disminuye la agresión mecánica de la conjuntiva y el arrastre de microorganismos desde la piel. Además, se ha observado que tras un tiempo de uso, la prótesis ocular se recubre de depósitos

mucoproteicos, que lejos de producir inflamación la previenen (Pine *et al.*, 2013). La explicación a este hecho podría ser que cierto grado de depósitos sobre la prótesis mejora la lubricación de ésta y disminuye el roce sobre la conjuntiva. Además aclararía por qué el pulido de la prótesis no ha demostrado ser un factor que mejore la tolerancia de la misma (Vasquez y Linberg, 1989; Pine *et al.*, 2012).

5. Influencia de la flora conjuntival en la tolerancia de la prótesis ocular

Otro de los objetivos de nuestro estudio consistía en determinar si la flora conjuntival se asociaba de alguna manera con la tolerancia de los pacientes a su prótesis ocular.

En este sentido, se observó que los pacientes con una tolerancia mala presentaban en sus muestras pre-prótesis una mayor densidad microbiana (p-valor: 0,005), medida como D.O. (ver apartado 5 de Resultados), y una mayor presencia de microorganismos patógenos, tanto en las muestras pre-prótesis ($p = 0,038$) como retro-prótesis ($p = 0,003$, ver Tabla 22).

Sin embargo, al analizar por grupos de microorganismos, sólo se relacionó con una mala tolerancia la presencia de bacterias Gram negativas a nivel retro-prótesis (Tabla 22). La única concordancia de un grupo de bacterias con una tolerancia buena se encontró entre aquellos pacientes con positividad en sus muestras retro-prótesis al grupo de los otros SCN diferentes de *S. epidermidis* (p-valor: 0,011, ver Tabla 22), lo que parece confirmar el carácter poco agresivo, en general, de estas especies.

Nuestros resultados parecen estar en contradicción con los publicados por Vasquez y Linberg (1989), ya que refieren no encontrar diferencias en la flora de los pacientes con mala tolerancia. Sin embargo, su estudio cuenta con menos pacientes, y, además, no realizaron un análisis agrupando los microorganismos en función de la patogenicidad. En su trabajo contaban con 12 pacientes con mala tolerancia, de los cuales 9 resultaron positivos para microorganismos que consideramos patógenos (SCP, estreptococos, enterococos, bacterias Gram negativas u hongos). En nuestro estudio, de 10 pacientes con mala tolerancia 8 presentaron microorganismos patógenos en la flora

pre-prótesis. Como vemos la proporción es muy similar (75% vs 80%). En nuestro trabajo, los pacientes con tolerancia buena o regular y presencia de microorganismos patógenos fue del 44% (22/50), permitiendo obtener una diferencia significativa. Sin embargo, en el estudio de Vasquez y Linberg (1989) desconocemos el número de pacientes con buena tolerancia y presencia de patógenos, aunque sí podemos calcular el número de cepas consideradas patógenas, siendo 13 cepas en los 12 pacientes con mala tolerancia y sólo 17 en los 28 pacientes con buena tolerancia. Además, la triple correlación encontrada entre: tolerancia mala – mayor densidad bacteriana – presencia de microorganismos patógenos (Tabla 17), parece corroborar la existencia de diferencias en la flora conjuntival en función de la tolerancia. No obstante, resulta imposible establecer, con el diseño de nuestro estudio, la secuencia temporal en las modificaciones de la flora, siendo difícil dilucidar si la modificación de la flora es previa a la mala tolerancia, o si es la irritación conjuntival la que provoca la modificación de la flora.

6. Sensibilidad antibiótica de las bacterias de la flora conjuntival

6.1. Tipos de antibióticos evaluados

Como se puede apreciar en la Tabla 23, los antibióticos con un mayor uso en forma de colirios (quinolonas, aminoglucósidos y macrólidos) fueron ampliamente evaluados, especialmente entre los estafilococos. Los antibióticos betalactámicos, de escaso uso tópico ocular, se valoraron sobre todo en el caso de las bacterias Gram negativas, aunque en todas las cepas de estafilococos se valoró la sensibilidad a la oxacilina, siendo este betalactámico de gran importancia ya que permite establecer la resistencia a la meticilina (ver apartado 6.3 de Discusión).

En total se estudiaron 28 antibióticos, de los cuales sólo 7 (ciprofloxacino, levofloxacino, gentamicina, tobramicina, ácido fusídico, cloranfenicol y eritromicina) están disponibles, actualmente, en forma de preparados comerciales de uso tópico ocular.

Otros antibióticos evaluados, como la amikacina, clindamicina, rifampicina, vancomicina y ceftazidima son de uso habitual en medio hospitalario, al prepararse mediante fórmula magistral. El resto, aunque son poco habituales, pueden prepararse en forma de soluciones oftálmicas, aunque de amoxicilina con ácido clavulánico, cefoxitina, meropenem y aztreonam, no se encontró ninguna publicación que sugiera que se pueden emplear de forma tópica ocular.

6.2. Sensibilidad antibiótica por grupos de bacterias conjuntivales

Como podemos observar en la Tabla 24, los micrococos, las bacterias corineformes y el grupo de los SCN distintos de *S. epidermidis*, presentaron una alta sensibilidad a la mayoría de los antibióticos tópicos oculares, mientras que otras especies con mayor capacidad patogénica se mostraron menos sensibles.

Los grupos de bacterias con mayor tasa de resistencia a los antibióticos evaluados fueron los enterococos y las bacterias Gram negativas. En relación a estas últimas, cabe destacar el elevado porcentaje de resistencias respecto a quinolonas y a aminoglucósidos, si tenemos en cuenta que, en otros estudios, las bacterias Gram negativas de la flora conjuntival fueron sensibles a estos antibióticos en más del 90% de las cepas evaluadas (Lichtinger *et al.*, 2012; Gentile *et al.*, 2014). Incluso la ceftazidima, una cefalosporina de tercera generación empleada en forma de colirio reforzado en pacientes con infecciones oculares severas (básicamente en úlceras corneales o endoftalmitis), sólo presentó un 68% de sensibilidad (Tabla 24), cuando en pacientes con endoftalmitis por bacterias Gram negativas mostró un 91,5% (Gentile *et al.*, 2014).

La presencia de estas bacterias especialmente resistentes probablemente se deba al uso indiscriminado de antibióticos que en muchas ocasiones acompaña a los pacientes anoftálmicos, cuando perciben un incremento de las molestias o de la secreción mucosa en la cavidad anoftálmica. Este dato, junto a la probable transferencia de microorganismos de la cavidad anoftálmica al ojo sano contralateral (ver apartado 2 de Discusión), debe hacernos sospechar de la presencia de microorganismos resistentes en el caso de una infección tras una cirugía endo-ocular en el ojo sano de un paciente anoftálmico.

En el caso de tener que tratar de forma empírica a un paciente con una exposición de material protésico oculoplástico, como puede ser un implante orbitario, y en base a los datos obtenidos (Tabla 24), deberíamos emplear un tratamiento antibiótico que fuera eficaz especialmente contra las bacterias patógenas presentes en la conjuntiva con mayor capacidad de adhesión y formación de biofilm, como *S. aureus* y *S. marcescens* (Figura 48) u otras bacterias Gram negativas, en especial *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae* (Izano *et al.*, 2008; Petrova y Sauer, 2012; Juma y Forsythe, 2015). Para actuar contra las bacterias Gram positivas deberíamos emplear rifampicina o vancomicina, que muestran una elevada tasa de actividad antimicrobiana. Contra las bacterias Gram negativas, y dado que en nuestro caso se ha producido una mejor sensibilidad a la cefuroxima (cefalosporina de segunda generación) que a otras cefalosporinas de tercera generación (como ceftazidima o cefotaxima), sería preferible el uso de cefuroxima. Además, la cefuroxima es de uso común en el tratamiento de úlceras corneales, generalmente combinada con aminoglucósidos (Kowalski *et al.*, 2013).

La otra posibilidad sería emplear vancomicina asociada a un aminoglucósido, como la gentamicina o la tobramicina ya que estas suelen resultar muy eficaces contra las bacterias Gram negativas (Lichtinger *et al.*, 2012). Sin embargo, en nuestro estudio la sensibilidad a los aminoglucósidos sólo ha sido del 70% por lo que podríamos plantear como otra opción más eficaz el cotrimoxazol de forma tópica ocular (Ramos-Esteban *et al.*, 2008), puesto que en nuestra serie presentó una sensibilidad del 82%, siendo la más alta entre las bacterias Gram negativas junto con el cefepime (Tabla 24).

A la hora de tratar pacientes con implantes expuestos, debemos tener presente que la existencia de biofilms modifica la efectividad de los antibióticos, habiéndose estimado que las bacterias con crecimiento en forma de biofilm son unas 1000 veces menos susceptibles a los antibióticos (Samimi *et al.*, 2013). Por el contrario, el uso de antibióticos de forma preventiva, durante el proceso de implantación de prótesis y antes de que se produzca la adhesión bacteriana, podría resultar efectivo, al eliminar células en fase planctónica e impedir que lleguen a constituir un biofilm.

También en prótesis parcialmente expuestas la presencia de antibióticos en el medio disminuye la adhesión de las bacterias, dependiendo de la susceptibilidad bacteriana y de la concentración de antibiótico, como se ha demostrado con la menor

adhesión de *S. epidermidis* a catéteres impregnados con rifampicina-sparfoxacina (Katsikogianni y Missirlis, 2004) o la experiencia clínica recogida por diversos cirujanos oculoplásticos de pacientes con implantes orbitarios expuestos que, manteniendo un tratamiento antibiótico tópico, no progresan a extrusión (Prada *et al.*, 2002; Custer y Trinkaus, 2007; Pongprayoon, 2008). Otra posibilidad terapéutica es el uso de povidona yodada, ya que incluso en concentraciones sub-inhedorias ha demostrado impedir la formación de biofilm de *S. epidermidis* y *S. aureus*, al inhibir la activación del operon icaADBC, productor de adhesinas (Oduwole *et al.*, 2010).

Nuestros resultados muestran que todas las bacterias estudiadas de la flora conjuntival son capaces de unirse, con mayor o menor eficacia, a la superficie de los diferentes materiales probados. Por ello, proponemos que los pacientes que van a recibir una prótesis periocular y que habitualmente son tratados con antibióticos sistémicos después de la intervención, sean medicados uno o dos días antes del procedimiento quirúrgico, a fin de conseguir unos niveles plasmáticos de fármacos eficaces. De esta manera, los antibióticos podrán actuar sobre las posibles bacterias arrastradas por la introducción del dispositivo, ya que inicialmente, se encontrarán en fase planctónica, cuando son más sensibles, y se evitará la constitución de biofilms. Además, en las prótesis implantadas en el área periocular, el lavado de las mismas con antisépticos, como la povidona yodada, parece más adecuado que el uso de antibióticos como la gentamicina, dada la elevada resistencia antibiótica observada (Tabla 24).

6.3. Relevancia de la presencia de *S. epidermidis* resistentes

Como ya hemos visto, *S. epidermidis* es la principal especie en la flora conjuntival, constituyendo parte integral de la misma (ver apartados 4.1 de Introducción y 1.1 de Discusión). Además, está muy adaptado a la presencia de agentes antimicrobianos (Olson *et al.*, 2010), como se comprobó en nuestro estudio, al comparar la sensibilidad a los antibióticos entre los diferentes tipos de estafilococos, donde se observó una resistencia significativamente mayor de *S. epidermidis* frente a otros SCN y a los SCP (Tabla 25).

De los 60 pacientes de nuestro trabajo, en el 95% (57/60) se identificó alguna cepa de *S. epidermidis*, bien en la flora del ojo sano o de la cavidad anoftálmica (ver apartado 6.2 de Resultados). Esta distribución tan homogénea entre los pacientes

favoreció que no se obtuvieran diferencias significativas al comparar la presencia de *S. epidermidis* con las variables de los pacientes, tanto en sus características epidemiológicas, como de su cavidad anoftálmica (donde sólo se encontró un aumento significativo de *S. epidermidis* en la flora pre-prótesis de los pacientes con epífora; ver apartado 3.2.6 de Resultados) o en su tolerancia a la prótesis ocular. Sin embargo, al analizar la presencia de cepas de *S. epidermidis* resistentes a varios antibióticos, se pudo comprobar como el aumento de resistencias se asociaba con diferentes variables de los pacientes (Tabla 26).

La relación existente entre el incremento de cepas de *S. epidermidis* resistentes al ácido fusídico y el sexo femenino, al igual que la mayor resistencia a la clindamicina y amikacina en pacientes con depresión, o a las quinolonas en los pacientes con pérdida de su globo ocular derecho, no nos parecen relevantes desde un punto de vista clínico.

Por el contrario, merece la pena destacar el aumento de resistencias de *S. epidermidis* a varios tipos de antibióticos, tanto en los pacientes con pérdida del globo ocular en los últimos 3 años, como con presencia de implante orbitario, o que empleaban su primera prótesis ocular. Como comentamos en el apartado 3.2.1 de la Discusión, el tiempo de anoftalmía y la presencia de implante mantienen entre sí una fuerte asociación estadística (Tabla 32). Del mismo modo, también el empleo de la primera prótesis ocular se relaciona con el tiempo de anoftalmía ($p = 0,001$), lo que resulta lógico puesto que los pacientes con su primera prótesis suelen haber sido intervenidos más recientemente. Por ello, en este caso, parece más razonable pensar que es el menor tiempo transcurrido desde la intervención quirúrgica el factor causal de una mayor tasa de resistencia, puesto que en el postoperatorio de la intervención se emplean antibióticos tópicos durante varias semanas.

De un modo similar, los pacientes con inflamación de su cavidad anoftálmica (presencia de moco o de hiperemia conjuntival) o con una manipulación frecuente de la prótesis presentaron *S. epidermidis* con una resistencia elevada a quinolonas, aminoglucósidos, betalactámicos y clindamicina (Tabla 26). La explicación más plausible es que, aunque en el momento de realizar nuestro estudio ya no emplearan antibióticos, los habrían utilizado recientemente. De hecho, el uso actual de antibióticos sólo se relacionó con el incremento de resistencias a los aminoglucósidos,

probablemente por ser la tobramicina uno de los antimicrobianos tópicos más empleados.

La resistencia a betalactámicos, fármacos de especial interés clínico en el tratamiento de las infecciones intraoculares (ESCRS, 2007), la valoramos por la existencia de estafilococos meticilín resistentes. Aunque la prueba de referencia es la detección del gen *mecA* por PCR, la resistencia a la oxacilina es una prueba empírica aceptada por el CLSI para realizar este diagnóstico (Olson *et al.*, 2010; Horna *et al.*, 2015). De este modo, como se puede calcular en la Tabla 24, obtuvimos una tasa de *S. aureus* resistentes a meticilina (SARM) del 25% y de *S. epidermidis* resistentes a meticilina (SERM) del 30%, en línea con lo publicado por otros autores, quienes determinaron un 29% de SARM y un 47% de SERM en la flora conjuntival de pacientes programados para cirugía de cataratas (Olson *et al.*, 2010).

Estos datos deben hacernos reflexionar sobre la pérdida de sensibilidad antimicrobiana en *S. epidermidis* por el uso indiscriminado de antibióticos, y el mantenimiento de estas resistencias en el tiempo, aunque el empleo de antimicrobianos fuera puntual o cuando ya no se estén utilizando.

Los SCN los consideramos, en general, especies saprofitas que probablemente actúan como una flora defensiva impidiendo la adhesión de microorganismos patógenos (ver apartados 3 y 5.3.1 de Introducción). Sin embargo, debido a su elevada prevalencia en la flora conjuntival, *S. epidermidis* es la bacteria que más úlceras corneales (Schaefer *et al.*, 2001) y endoftalmitis (Gentile *et al.*, 2014) produce, aunque la evolución de estas infecciones es mucho mejor cuando son causadas por *S. epidermidis* que por otras especies, en concreto, estreptococos y enterococos (EVSG, 1996; Carrim *et al.*, 2009). No obstante, esta situación podría cambiar en los próximos años por el incremento de resistencias en *S. epidermidis* debido al abuso de antibióticos, lo que comprometería su tratamiento y supondría un peor pronóstico para los pacientes. Con el fin de evitar el uso inadecuado de los antibióticos, recientemente se han planteado diferentes estrategias para controlar las especies constituyentes de las microbiotas de diferentes epitelios, en base a productos prebióticos y microorganismos probióticos (Monteagudo, 2010). Así, se ha comprobado que algunas sustancias naturales no tóxicas, como la genisteína, favorecen la adhesión de *S. epidermidis* frente a bacterias patógenas, como *S. aureus* (Morán *et al.*, 2014), lo que abre la posibilidad de regular una flora habitual constituida

por *S. epidermidis* sin requerir del uso de antibióticos ni incrementar las resistencias, lo que podría tener aplicaciones a nivel de la flora conjuntival humana.

7. Evaluación de la adhesión y formación de biofilm

7.1. Cinética del crecimiento bacteriano

Según las gráficas mostradas en la Figura 47, y tomando como cepa control *L. rhamnosus* (microorganismo probiótico de la flora intestinal) podríamos clasificar las cepas estudiadas en función de su crecimiento, como: muy elevado (*S. aureus* y *S. marcescens*), elevado (*S. epidermidis*, *S. hominis* y *C. amycolatum*) y bajo (*A. calcoaceticus*). Esta capacidad de crecimiento, concuerda con las características clínicas de estos microorganismos (Tabla 6), donde se observa como las bacterias con mayor capacidad patógena (*S. aureus* y *S. marcescens*), también presentan un mayor crecimiento.

Además, las curvas de crecimiento de estas bacterias se correlacionan con los datos obtenidos de los 29 pacientes en los que se midió la densidad microbiana conjuntival (ver apartado 1.4.6 de Materiales y Métodos). Así, las muestras de los pacientes con SCP presentaron una mayor densidad microbiana (ver apartado 2 de Resultados) y en el crecimiento *in vitro*, fue *S. aureus* la cepa que alcanzó un crecimiento más elevado (ver apartado 7.1 de Resultados). En el caso de las muestras de los pacientes con presencia de bacterias Gram negativas no pudo establecerse una diferencia estadística en cuanto a la densidad microbiana (Tabla 17), que se ajusta con la importante variabilidad en el crecimiento encontrada entre *S. marcescens* y *A. calcoaceticus*, ambas especies Gram negativas (Figura 47).

De esta manera, las especies patógenas, con mayor capacidad de crecimiento, pueden desplazar a las bacterias de crecimiento más lento, típicas de la flora habitual, al limitar los nutrientes y el espacio disponible (Fujikawa *et al.*, 2014), produciéndose una disbiosis. Cuando las bacterias patógenas alcanzan una masa celular crítica, los mecanismos de defensa del hospedador resultan insuficientes y se desarrolla la enfermedad (ver apartado 3 de Introducción).

7.2. Cinética de adhesión bacteriana

Como se aprecia en la Figura 48, existen notables diferencias en la capacidad de unión, sobre una misma superficie de poliestireno, de las distintas cepas bacterianas estudiadas. Al igual que en las curvas de crecimiento, las especies patógenas, *S. aureus* y *S. marcescens*, presentaron una adhesión muy superior a la cepa de referencia, *L. rhamnosus*. Por el contrario, las bacterias saprofitas exhibieron una asociación a la superficie sólo ligeramente superior a la cepa control, como las dos cepas de *S. epidermidis*, o claramente inferior como *S. hominis*, *C. amycolatum*, y *A. calcoaceticus*.

Comparando las curvas de adhesión (Figura 48) con las de crecimiento (Figura 47), observamos que no siguen necesariamente una proporcionalidad. Así, especies con una proliferación considerable, como *S. hominis* o *C. amycolatum*, se unieron de forma escasa al poliestireno. Algo similar ocurre cuando comparamos *S. aureus* y *S. marcescens*, pues si bien *S. aureus* presentó un mayor crecimiento que *S. marcescens*, ésta mostró, sin embargo, una mayor adhesión.

Estas cinéticas diferentes se correlacionan, en nuestra opinión, con los datos clínicos y epidemiológicos conocidos de las distintas especies bacterianas (Tabla 6). Así por ejemplo, las curvas de crecimiento y adhesión en el caso de las dos cepas de *S. epidermidis*, que muestran una proliferación moderada y lenta junto con una adherencia superior a la cepa control, concuerdan con una especie saprofitas bien adaptada a su entorno, ya que puede asociarse adecuadamente a la superficie mucosa sin una división celular excesiva que pudiera desencadenar una situación patológica. En la práctica, esto se traduce por la gran prevalencia de *S. epidermidis* en las floras cutánea y conjuntival (ver apartado 4.1.1 de Introducción). Por el contrario, las especies con crecimiento moderado o bajo y escasa adhesión (*S. hominis*, *C. amycolatum*, y *A. calcoaceticus*) corresponden, como se ha podido comprobar en la flora conjuntival obtenida (Tablas 10 y 11), a especies saprofitas ocasionales y más lábiles, ya que su unión a las superficies bióticas será más precaria. Por último, el elevado índice de proliferación, junto con su potencial tóxico y su gran capacidad de adhesión, justifican el comportamiento clínico patógeno de *S. aureus* y *S. marcescens* (Alonso *et al.*, 1994; Foster *et al.*, 2014), así como su presencia limitada en la microbiota conjuntival normal.

En definitiva, la capacidad de adhesión, reconocido factor de supervivencia en una bacteria (Davies *et al.*, 1998; Foster *et al.*, 2014), permite que las diferentes

especies compitan entre sí, induciendo sus características de patogenicidad o simbiosis sobre la microflora.

7.3. Cuantificación de la adhesión bacteriana sobre diferentes materiales

Los materiales elegidos para estudiar la adhesión, se seleccionaron en base a los principales grupos de materiales protésicos empleados en cirugía oculoplástica (ver apartado 2.4 de la Introducción): cerámicas como el cristal, empleado en los tubos de Jones; metales como el acero que, aunque de uso escaso, también se ha empleado en tubos de drenaje lagrimal o de humor acuso (ExPRESS®); y polímeros, bien de superficie lisa (resina acrílica de prótesis ocular, teflón, silicona de implante orbitario y silicona de tapones de uso en laboratorio), de superficie semi-lisa (láminas de reconstrucción de paredes orbitarias de polietileno de alta densidad, con poros de 400 μm en una cara y sin ellos en la otra) y rugosa (lámina de PPAD con ambas caras porosas). Las medidas obtenidas a partir de la resuspensión de las células adheridas a cada plaquita de material, ajustándolas por mm^2 de superficie de la plaquita y presentadas como el logaritmo de las UFC por ml, pueden observarse en la Figura 49. En ella se aprecian importantes diferencias, tanto entre los diversos materiales como entre las diferentes cepas bacterianas, que a continuación pasamos a comentar.

En primer lugar, al comparar las gráficas de unión a distintos materiales con las curvas de adhesión sobre el poliestireno (Figura 48), llama la atención el bajo recuento de UFC obtenidas en *S. marcescens*, inferior en todos los materiales al microorganismo de referencia, *L. rhamnosus*, mientras que sobre el poliestireno casi quintuplicó (4,95 veces) el máximo valor alcanzado por esta cepa control. La explicación a este fenómeno creemos que está en la diferente metodología empleada, ya que la tinción con cristal violeta permite evaluar todas las células adheridas a una superficie, mientras que el recuento de UFC evalúa sólo el número de individuos viables asociados a dicha superficie. Además, el metabolismo celular de *S. marcescens* es especialmente rápido como puede deducirse de su curva de crecimiento (Figura 47) y de las visualizaciones bajo microscopía electrónica de sus cultivos (Figura 52).

Otro detalle interesante, es la notable discrepancia en el perfil de adhesión entre las dos cepas de *S. epidermidis*, siendo más elevada y homogénea la asociación a los

materiales de la cepa *S. epidermidis* HL. Como se comentó en el apartado 5.2.2 de la Introducción, pequeñas variaciones genéticas, entre distintas cepas de la misma especie, pueden traducirse en alteraciones en la composición molecular, tanto de la superficie bacteriana como de su matriz extracelular (Wozniak et al., 2003; Colvin et al., 2012). Esto, combinado con las distintas características físico-químicas de los materiales, repercute en la adhesión y formación de biofilm de forma preferente, según la cepa bacteriana, sobre unas superficies u otras. Tanto *S. epidermidis* HL como *S. aureus*, ambas cepas aisladas de pacientes, mostraron una notable adhesión a todos los materiales, no destacando diferencias entre ellos, como cabe presuponer en bacterias adaptadas a la supervivencia en una mucosa hostil y en competencia con otras especies.

Respecto al principal objetivo de este experimento (comprobar si existían diferencias en la resistencia a la colonización bacteriana entre diversos materiales protésicos y en caso afirmativo, determinar cuales tenían un comportamiento mejor y peor) se observó cómo *S. epidermidis* CECT, *C. amycolatum*, *A. calcoaceticus*, *S. marcescens* y nuestra cepa control, *L. rhamnosus*, se adhirieron de forma significativamente mayor al PPAD rugoso frente a otros materiales; mientras que *S. hominis* y *S. marcescens* se unieron significativamente menos a la silicona de implante orbitario, respecto a otras superficies.

Las diferencias entre estos dos materiales resultan más fácilmente apreciables al relativizar los valores de adhesión para cada cepa (Tabla 27), que traducen una mayor unión al PPAD poroso y una mejor resistencia a la colonización bacteriana por parte del implante de silicona. Esta diferencia, que resultó significativa (Figura 50), no parece ser atribuible a la composición de los mismos, teniendo en cuenta que el polímero con el que está fabricado el PPAD rugoso es exactamente el mismo que el polietileno semi-liso, y que entre este material y la silicona de implante no se encontraron diferencias significativas. Por lo tanto, debemos pensar que la principal causa de esta mayor adhesión al material rugoso es la mayor superficie de éste, más que a la propia naturaleza del material. Los implantes orbitarios de PPAD tienen unos canales que oscilan entre los 100 μm y los 1000 μm de diámetro (Mawn et al., 1998), lo que podría incrementar su superficie en un 700% (Braem et al., 2014). Además, como se observa en la Figura 51, la superficie del PPAD rugoso, a escala bacteriana, es lisa.

No obstante, y a pesar de que no se encontraron diferencias significativas, la Figura 50 sugiere que podrían intervenir otros factores además de la mayor superficie de los materiales porosos, al ser inferior la adhesión en silicona, tanto de implante orbitario como de tapón de laboratorio, frente a otros materiales también plásticos y lisos como el teflón. Este hecho pondría de manifiesto la importancia de otros factores de las superficies en la adhesión microbiana, como las cargas electrostáticas o su hidrofobicidad (Tegoulia y Cooper, 2002; Baillif et al., 2010; Braem et al., 2014), aunque en nuestro trabajo no han sido analizadas.

Por lo tanto, existen diferencias en la adhesión bacteriana a distintos materiales oculoplásticos, al igual que se encontraron en otros tipos de prótesis oftalmológicas, como en las LIO (García-Sáenz et al., 2000) o en los tapones lagrimales (John *et al.*, 2001). Seleccionando el material de fabricación de la prótesis que empleemos, podemos dificultar la adhesión de determinados microorganismos y como consecuencia su proliferación (ver apartado 5.3.3 de Introducción). Esto nos permite recomendar el empleo de implantes orbitarios de silicona, no porosos, en aquellos casos en los que exista una alta probabilidad de infección, como puede ser en pacientes cuya evisceración se realice por una endoftalmitis, especialmente si presentan niveles elevados de leucocitos en plasma (Bee *et al.*, 2014).

Para finalizar, debemos resaltar que aunque hemos empleado esta metodología para valorar fundamentalmente materiales oculoplásticos, en concreto implantes orbitarios, podría aplicarse a otros tipos de prótesis oftalmológicas, ya que las bacterias que pueden colonizarlos son las mismas.

7.4. Estudio electromicroscópico de los materiales y del biofilm

El estudio de la superficie de estos materiales con el microscopio electrónico de barrido (Figura 51), no mostró irregularidades de un tamaño en el que pudieran encajar las bacterias, considerando que los cocos tienen un diámetro promedio de 1 μm . En el caso del acero, sí se observaron unos surcos que, en algunos sitios, podrían facilitar la adhesión bacteriana. Sin embargo, como se aprecia en la Figura 50, comparando la adhesión relativa del acero y del cristal (material con la superficie más lisa aparentemente), no se observó diferencia alguna. El resto de los materiales presentan

una superficie lisa, incluido el PPAD rugoso, puesto que los poros que presenta son de tamaño muy superior al de las bacterias.

Además de las características topográficas del sustrato, cada especie bacteriana y cada cepa muestra una capacidad de adhesión y formación de biofilm variable, como se expuso en el apartado 7.3 de Discusión. Dado que los diferentes grados de madurez del crecimiento en comunidad bacteriana se pueden evaluar mediante la visualización con microscopía electrónica (Post, 2001), estudiamos cultivos de nuestras cepas bacterianas, representantes de la flora conjuntival. Tras realizar una incubación prolongada sobre placas de teflón, a fin de someter a las células a un medio más estresante y estimular un crecimiento más inactivo y de supervivencia, el grado de madurez de los biofilms observados presentó una importante variabilidad entre las distintas cepas (Figuras 52 y 53), coincidiendo, notablemente, con el esperado a tenor de las gráficas de adhesión al poliestireno (Figura 48). Así, *S. marcescens*, *S. aureus* y *S. epidermidis* HP, los microorganismos que habían mostrado una mayor asociación al poliestireno a las 24 horas, desarrollan un biofilm maduro, con microcanales en su base y abundante matriz extracelular (Costerton *et al.*, 1999), degenerando a partir de las 72 horas. A las 48 horas, dependiendo del metabolismo de cada cepa, se pueden encontrar diferencias llamativas. Así, en el caso de *S. marcescens*, aunque comienzan a producirse algunas pérdidas celulares, de acuerdo con el rápido metabolismo de esta especie (Figura 47), existen áreas con una buena vitalidad y biofilms maduros (Figura 52E). *S. hominis*, conforme a lo esperado por su escasa adhesión al poliestireno, tan sólo alcanza el grado de microcolonia (ver apartado 5.2.3 de Introducción), presentando una mínima matriz extracelular. Curiosamente, *C. amycolatum* forma un biofilm maduro, pese a haber mostrado una escasa adhesión al poliestireno (Figura 48). Una posible explicación a este hecho, es que la abundante matriz extracelular de *C. amycolatum*, tenga unas características físico-químicas que no sean adecuadas para la adhesión firme a las superficies abióticas, puesto que también mostró una escasa adhesión a la mayoría de los materiales de bioadhesión utilizados (Figura 49).

Por lo tanto, podemos constatar la importante variabilidad existente en el grado de madurez del crecimiento celular en comunidad entre las distintas cepas y debemos señalar su correlación, en general buena, con la medición de la adhesión en poliestireno mediante el método del cristal violeta.

Por último, se valoraron las superficies de implantes orbitarios expuestos en pacientes anoftálmicos. En ellos, a pesar de presentar cultivos negativos en las muestras enviadas al servicio de Microbiología, se observaron bacterias firmemente adheridas a su superficie (Figura 55), corroborando lo publicado por otros autores (Fux *et al.*, 2005; Samimi *et al.*, 2013). Debemos por tanto considerar, independientemente de los cultivos obtenidos, que siempre existe un biofilm adherido a la superficie expuesta de un implante, y por ello, realizar siempre una eliminación mecánica del biofilm (Wu *et al.*, 2015), fresando la superficie, antes del recubrimiento del implante con colgajos de Tenon o con injertos. En el caso de que consideremos, por diversas circunstancias, un tratamiento expectante, es importante que la flora que constituya este biofilm sobre el implante sea lo menos agresiva posible. La formación de un biofilm con microflora saprofita dificulta la colonización por especies patógenas, y está en el origen de la buena evolución en algunos casos de exposición de implante orbitario no tratado (Prada *et al.*, 2002; Custer y Trinkaus, 2007; Pongprayoon, 2008).

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La flora conjuntival de las cavidades anoftálmicas y de los ojos sanos contralaterales ha diferido entre sí significativamente. En las cavidades anoftálmicas se ha constatado un incremento de la densidad microbiana (medida como absorbancia espectrofotométrica y como número total de cultivos positivos), así como un incremento específico de bacterias Gram negativas y estreptococos. Por el contrario, no se han objetivado diferencias en la flora de la cavidad anoftálmica entre el espacio pre-prótesis y retro-prótesis.
2. Existe una transferencia de microorganismos entre la cavidad anoftálmica y el ojo sano contralateral, ya que se ha apreciado una correlación positiva entre la absorbancia espectrofotométrica de los cultivos pre-prótesis de las cavidades y los cultivos de la flora conjuntival de los ojos sanos.
3. La flora conjuntival se modifica de acuerdo a determinados factores. La edad se ha asociado con un incremento de la flora de los ojos sanos. Se ha constatado una mayor presencia de microorganismos patógenos, en los ojos sanos, si la cavidad anoftálmica estaba inflamada. El uso continuado de antibióticos tópicos en la cavidad anoftálmica no ha demostrado ser útil para disminuir la flora conjuntival patógena. Otros factores como el tiempo de anoftalmía, el lado izquierdo de la cavidad, la ausencia de implante orbitario o la manipulación frecuente de la prótesis, se asociaron con un incremento de la flora patógena en la cavidad.
4. La tolerancia subjetiva a la prótesis ocular fue significativamente mejor en aquellos pacientes con una cavidad anoftálmica sin inflamación, que no empleaban medicamentos tópicos y que manipulaban escasamente su prótesis.
5. Por otro lado, se ha asociado con una peor tolerancia a las prótesis oculares la presencia en la cavidad anoftálmica de una mayor densidad microbiana, en concreto de bacterias consideradas patógenas y, especialmente, las bacterias Gram negativas. Por el contrario, los estafilococos con actividad coagulasa negativa, excluido *S. epidermidis*, se han relacionado con una mejor tolerancia de la prótesis.
6. Las bacterias Gram positivas aisladas de la conjuntiva han resultado muy sensibles a vancomicina y rifampicina, mientras que las bacterias Gram negativas han presentado una considerable tasa de resistencia, tanto a los aminoglucósidos como a las cefalosporinas de tercera generación, siendo más sensibles a la cefuroxima, cefepime y cotrimoxazol. Las quinolonas y los

macrólidos han presentado, tanto en bacterias Gram positivas como negativas, una menor eficacia antibacteriana. Se ha constatado una importante tasa de resistencia de *S. epidermidis* a diferentes antibióticos, relacionada con la pérdida ocular en los últimos tres años y el consiguiente uso de antimicrobianos.

7. Las bacterias de la flora conjuntival seleccionadas, han mostrado capacidad de adhesión a diferentes superficies, llegando a constituir biofilms maduros. Se ha constatado la mayor capacidad de adhesión y proliferación de las bacterias con mayor patogenicidad. Respecto a los materiales oculoplásticos, los porosos presentaron una mayor adhesión bacteriana, siendo la silicona el material con menor adhesión. En los implantes orbitarios expuestos de pacientes anoftálmicos, se ha podido identificar microorganismos adheridos a su superficie, a pesar de tener un cultivo microbiológico negativo.

En base a las conclusiones de nuestro trabajo, y dado el carácter clínico y práctico que hemos pretendido en este estudio, nos gustaría proponer las siguientes recomendaciones para mejorar la calidad asistencial a los pacientes anoftálmicos:

- i. Considerar elevado el riesgo de endoftalmitis en la cirugía intraocular del ojo sano contralateral y extremar las medidas antisépticas y antibióticas.
- ii. Evitar el uso prolongado de antibióticos tópicos en la cavidad anoftálmica, así como la manipulación frecuente de la prótesis ocular, a fin de mejorar la tolerancia de la misma.
- iii. Considerar que todo implante orbitario expuesto puede estar colonizado por microorganismos formadores de biofilms, por lo que el tratamiento médico debería combinar antibióticos tópicos (vancomicina con cefalosporinas) o emplear antisépticos como la povidona yodada. En el tratamiento quirúrgico sin extracción del implante, recomendamos fresar la superficie expuesta varios milímetros antes de cubrir el defecto con colgajos o injertos libres.
- iv. Por último, en caso de sospechar infección en la zona de introducción del implante orbitario, bien por existir endoftalmitis o por exposición previa de otro implante, aconsejamos emplear un implante orbitario no poroso, preferiblemente de silicona.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams AD.** (1978) Silicone plug for punctal occlusion. *Trans Ophthalmol Soc U K.* 98:499.
- Adenis JP, Lebraud P, Mathon M.** (1989) Use of polytetrafluoroethylene (Goretex) in the palpebrofrontalis muscle suspension in ptosis. *J Fr Ophthalmol.* 10:607-609. French.
- Ainbinder DJ, Haik BG, Mazzoli RA.** (1998) Anophthalmic socket and orbital implants. Role of CT and MR imaging. *Radiol Clin North Am.* 36:1133-1147.
- Allan VJ, Callow ME, Macaskie LE, Paterson-Beedle M.** (2002) Effect of nutrient limitation on biofilm formation and phosphatase activity of a *Citrobacter* sp. *Microbiology.* 148:277-288.
- Allen K, Berlin AJ.** (1989) Dacryocystorhinostomy failure: association with nasolacrimal silicone intubation. *Ophthalmic Surg.* 20:486-489.
- Alonso Fernández R, Baquero Mochales F.** (1994) Género *Serratia*: biología, repercusiones clínicas y epidemiología. *Rev Clin Esp.* 194:294-9.
- Ambekar S, Nanda A.** (2013) Charles Stent and the mystery behind the word "stent". *J Neurosurg.* 119:774-777.
- An YH, Friedman RJ.** (1997) Laboratory methods for studies of bacterial adhesion. *Journal of Microbiological Methods.* 30:141-152
- An YH, Friedman RJ.** (1998) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *J Biomed Mater Res.* 43:338-348.
- Ando N, Takatori K.** (1982) Fungal flora of the conjunctival sac. *Am J Ophthalmol.* 94:67-74.
- Angelakis E, Armougom F, Million M, Raoult D.** (2012) The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol.* 7:91-109.
- Aoki SK, Malinverni JC, Jacoby K, Thomas B, Pamma R, Trinh BN, Remers S, Webb J, Braaten BA, Silhavy TJ, Low DA.** (2008) Contact-dependent growth inhibition requires the essential outer membrane protein BamA (YaeT) as the receptor and the inner membrane transport protein AcrB. *Mol Microbiol.* 70:323-340.
- Aoki SK, Pamma R, Hernday AD, Bickham JE, Braaten BA, Low DA.** (2005) Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science.* 309:1245-1248.
- Apfelberg DB, Newman J, Graivier M, Petroff MA, Levine R.** (2008) Multispecialty contralateral study of clinical experience with the Ultratine forehead fixation device: evolution of the original Endotine device. *Arch Facial Plast Surg.* 10:280-282.
- Apple DJ.** (2006) *Sir Harold Ridley and His Fight For Sight: He Changed the World So That We May Better See It.* Slack Incorporated.

Applegate DH, Bryers JD. (1991) Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnol Bioeng.* 37:17-25.

Aranda Lara P, Aranda Lara FJ, Aranda Granados P, López de Novales E. (2000) Hipertensión e hipercolesterolemia en la población española. *78 Hipertensión.* 17: 77-79.

Archibald LK, Gaynes RP. (1997) Hospital-acquired infections in the United States. The importance of interhospital comparisons. *Infect Dis Clin North Am.* 11:245-255.

Arion HG. (1972) Dynamic closure of the lids in paralysis of the orbicularis muscle. *Int Surg.* 57:48-50.

Arruga H. (1954) Improved orbital implant. *Am J Ophthalmol.* 38:93-96.

Asencio Durán M, Fernández Prieto A, Arbizu Duralde A, Sánchez-Orgaz M, Oliver Pascual N, Ruiz del Río N. (2004) Tratamiento de la obstrucción del conducto nasolagrimal mediante prótesis de Song. Long term efficacy. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 79:501-506.

Atkinson DT. (1954) Restored vision by means of the artificial pupil. *Am J Ophthalmol.* 37:403-408.

Atlee WE, Burns RP, Oden M. (1970) *Serratia marcescens* keratoconjunctivitis. *Am J Ophthalmol.* 70:31-3.

Bacskulin A, Vogel M, Wiese KG, Gundlach K, Hingst V, Guthoff R. (2000) New osmotically active hydrogel expander for enlargement of the contracted anophthalmic socket. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 238:24-27.

Baillif S, Hartmann D, Freney J, Kodjikian L. (2010) Intraocular lens and bacterial adhesion: influence of the environmental factors, the characteristics of the bacteria, and the target material surface. *J Fr Ophtalmol.* 33:210-221.

Bair RL, Harris GJ, Lyon DB, Komorowski RA. (1995) Noninfectious inflammatory response to gold weight eyelid implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 11:209-214.

Baker BS. (2006) The role of microorganisms in atopic dermatitis. *Clin Exp Immunol.* 144:1-9.

Balbaba M, Ulas F, Toplu SA. (2013) Effect of hemodialysis duration on conjunctival bacterial flora and susceptibility of conjunctival bacterial isolates to fluoroquinolones. *Ocul Immunol Inflamm.* 21:197-200.

Barkana Y, Almer Z, Segal O, Lazarovitch Z, Avni I, Zadok D. (2005) Reduction of conjunctival bacterial flora by povidone-iodine, ofloxacin and chlorhexidine in an outpatient setting. *Acta Ophthalmol Scand.* 83:360-363.

- Barraud N, Hassett DJ, Hwang SH, Rice SA, Kjelleberg S, Webb JS.** (2006) Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 188:7344-7353.
- Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY.** (1968) A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol.* 95:1520-41.
- Baumgarten T, Sperling S, Seifert J, von Bergen M, Steiniger F, Wick LY, Heipieper HJ.** (2012) Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Appl Environ Microbiol.* 78:6217-6224.
- Becker MJ.** (1999) Etruscan Gold Dental Appliances: Three Newly "Discovered" Examples. *American Journal of Archaeology.* 103: 103-111.
- Bee YS, Lin MC, Sheu SJ, Ng JD.** (2014) Elevated white blood cell count may predict risk of orbital implant exposure. *Can J Ophthalmol.* 49:45-49.
- Belmonte J.** (2008) Lentas intraoculares opacificadas. *Microcirugía Ocular.* 3: 15.
- Berens C.** (1941) Synthetic plastic material for implantation into orbit. *Am J Ophthalmol.* 24:550.
- Bernard K.** (2012) The genus *Corynebacterium* and other medically relevant coryneform-like bacteria. *J Clin Microbiol.* 50:3152-3158.
- Berner R, Pelz K, Wilhelm C, Funke A, Leititis JU, Brandis M.** (1997) Fatal sepsis caused by *Corynebacterium amycolatum* in a premature infant. *J Clin Microbiol.* 35:1011-2.
- Bispo PJ, Haas W, Gilmore MS.** (2015) Biofilms in infections of the eye. *Pathogens.* 4:111-136.
- Bladen JC, Norris JH, Malhotra R.** (2012) Cosmetic comparison of gold weight and platinum chain insertion in primary upper eyelid loading for lagophthalmos. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 28:171-175.
- Blomquist PH.** (2006) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections of the eye and orbit (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 104:322-45.
- Bohlman H.** (2003) Perforated punctal plug in the treatment of partial punctal stenosis. *Optometry.* 74:524-528.
- Bowden GH, Li YH.** (1997) Nutritional influences on biofilm development. *Adv Dent Res.* 11:81-99.
- Bowen SF, Dyer JA, Ogle KN, Neault RW.** (1961) The intracorneal lens: an experimental study. *Proc Staff Meet Mayo Clin.* 36:627-632.

- Bowman RA, Buck M.** (1984) Staphylococcus hominis septicaemia in patients with cancer. *Med J Aust.* 140:26-7.
- Boyd A, Chakrabarty AM.** (1994) Role of alginate lyase in cell detachment of *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol.* 60:2355-2359.
- Braem A, Van Mellaert L, Mattheys T, Hofmans D, De Waelheyns E, Geris L, Anné J, Schrooten J, Vleugels J.** (2014) Staphylococcal biofilm growth on smooth and porous titanium coatings for biomedical applications. *J Biomed Mater Res A.* 102:215-24.
- Bunt CR, Jones DS, Tucker JG.** (1993) The effects of pH, ionic strength and organic phase on the bacterial adhesion to hydrocarbons (BATH) test. *International Journal of Pharmaceutics.* 99:93-98.
- Busscher HJ, van der Mei HC.** (1997) Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res.* 11:24-32.
- Busscher HJ, van Hoogmoed CG, Geertsema-Doornbusch GI, van der Kuijl-Booij M, van der Mei HC.** (1997) Streptococcus thermophilus and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Appl Environ Microbiol.* 63:3810-3817.
- Busse H.** (1982) Indications and techniques of implantation of hydrophilic lacrimal tubes. *J Maxillofac Surg.* 10:116-118.
- Callender MG, Tse LS, Charles AM, Lutzi D.** (1986) Bacterial flora of the eye and contact lens. Cases during hydrogel lens wear. *Am J Optom Physiol Opt.* 63:177-180.
- Campos MS, Campos e Silva L de Q, Rehder JR, Lee MB, O'Brien T, McDonnell PJ.** (1994) Anaerobic flora of the conjunctival sac in patients with AIDS and with anophthalmia compared with normal eyes. *Acta Ophthalmol (Copenh).* 72:241-245.
- Can I, Aribal E, Yarangümeli A, Ataoglu H, Kural G.** (1998) Changes in the conjunctival flora after conjunctivodacryocystorhinostomy (CDCR): a preliminary report. *Eur J Ophthalmol.* 8:142-147.
- Cardona H.** (1962) Keratoprosthesis: acrylic optical cylinder with supporting intralamellar plate. *Am J Ophthalmol.* 54:284-294.
- Carrim ZI, Richardson J, Wykes WN.** (2009) Incidence and visual outcome of acute endophthalmitis after cataract surgery--the experience of an eye department in Scotland. *Br J Ophthalmol.* 93:721-725.
- Carroll JM, Beyer CK.** (1973) Conjunctivodacryocystorhinostomy using silicone rubber lacrimal tubes. *Arch Ophthalmol.* 89:113-115.
- Chang HT, Rittmann BE, Amar D, Heim R, Ehlinger O, Lesty Y.** (1991) Biofilm detachment mechanisms in a liquid-fluidized bed. *Biotechnol Bioeng.* 38:499-506.

Chao Y, Zhang T. (2011) Probing roles of lipopolysaccharide, type 1 fimbria, and colanic acid in the attachment of *Escherichia coli* strains on inert surfaces. *Langmuir*. 27:11545-11553.

Chen SY, Kuo MC, Wang PN, Lin TL, Ma DH. (2012) Study of conjunctival flora in patients after peripheral blood stem cell transplantation and its correlation with tear secretion. *Biomed J*. 35:493-499.

Chow K, Deva N, Ng SG. (2011) Prolene frontalis suspension in paediatric ptosis. *Eye (Lond)*. 25:735-9.

Christensen JN, Fahmy JA. (1974) The bacterial flora of the conjunctival anophthalmic socket in glass prosthesis-carriers. *Acta Ophthalmol (Copenh)*. 52:801-809.

Ciulla TA, Starr MB, Masket S. (2002) Bacterial endophthalmitis prophylaxis for cataract surgery: an evidence-based update. *Ophthalmology*. 109:13-24.

Collins MD, Burton RA, Jones D. (1988) *Corynebacterium amycolatum* sp. nov. a new mycolic acid-less *Corynebacterium* species from human skin. *FEMS Microbiol Lett*. 49:349-52.

Colvin KM, Irie Y, Tart CS, Urbano R, Whitney JC, Ryder C, Howell PL, Wozniak DJ, Parsek MR. (2012) The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ Microbiol*. 14:1913-1928.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 284:1318-1322.

Cunningham-Rundles S, Ahrn S, Abuav-Nussbaum R, Dnistrian A. (2002) Development of immunocompetence: role of micronutrients and microorganisms. *Nutr Rev*. 60:S68-72.

Custer PL, Kennedy RH, Woog JJ, Kaltreider SA, Meyer DR. (2003) Orbital implants in enucleation surgery: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*. 110:2054-2061.

Custer PL, Trinkaus KM. (2007) Porous implant exposure: Incidence, management, and morbidity. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 23:1-7.

Cutler NL. (1949) A universal type integrated implant. *Am J Ophthalmol*. 32:253-258.

Da Cruz L, Coley BF, Dorn J, Merlini F, Filley E, Christopher P, et al. (2013) The Argus II epiretinal prosthesis system allows letter and word reading and long-term function in patients with profound vision loss. *Br J Ophthalmol*. 97:632-636.

Dailey RA, Tower RN. (2005) Frosted jones pyrex tubes. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 21:185-187.

- Danese, P.N., Pratt, L.A., Dove, S.L., and Kolter, R.** (2000) The outer membrane protein, Antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol.* 37:424–432.
- Das T, Namperumalsamy P.** (1991) Scleral buckling with hydrogel implant. *Indian J Ophthalmol.* 39:41-43.
- Davey ME, O'toole GA.** (2000) Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64:847-867.
- Davies BW, Bratton EM, Durairaj VD, Hink EM.** (2013) Bilateral *Candida* and atypical mycobacterial infection after frontalis sling suspension with silicone rod to correct congenital ptosis. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 29:e111-113.
- Davies DG, Geesey GG.** (1995) Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol.* 61:860-867.
- Davies DG, Parsek MR, Pearson JP, Iglewski BH, Costerton JW, Greenberg EP.** (1998) The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.* 280:295-298.
- De Beer D, Srinivasan R, Stewart PS.** (1994) Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. *Appl Environ Microbiol.* 60:4339-4344.
- De Kaspar HM, Kreidl KO, Singh K, Ta CN.** (2004) Comparison of preoperative conjunctival bacterial flora in patients undergoing glaucoma or cataract surgery. *J Glaucoma.* 13:507-509.
- Deroche B, Jallet G, Chabanais JL.** (1977) Arion thread in oculo-palpebral surgery. Advantages and disadvantages. *Bull Mem Soc Fr Ophtalmol.* 89:43-45.
- D'Hermies F, Hartmann C, von Ey F, Holzkämper C, Renard G, Pouliquen Y.** (1991) Biocompatibility of a refractive intracorneal PMMA ring. *Fortschr Ophthalmol.* 88:790-793.
- Dickinson RB, Nagel JA, Proctor RA, Cooper SL.** (1997) Quantitative comparison of shear-dependent *Staphylococcus aureus* adhesion to three polyurethane ionomer analogs with distinct surface properties. *J Biomed Mater Res.* 36:152-162.
- Downes RN, Collin JR.** (1989) The Mersilene mesh sling - a new concept in ptosis surgery. *Br J Ophthalmol.* 73:498-501.
- Doyle A, Beigi B, Early A, Blake A, Eustace P, Hone R.** (1995) Adherence of bacteria to intraocular lenses: a prospective study. *Br J Ophthalmol.* 79:347-349.
- Dransart HN.** (1880) Un cas de blépharoptose opéré par un procédé spécial à l'auteur. Guérison. *Analectes Ophtalmologiques* 84: 88. (German).

- Duggan TG, Leng RA, Hancock BM, Cursons RT.** (1984) *Serratia marcescens* in a newborn unit--microbiological features. *Pathology*. 16:189-191.
- Durmaz E, Dursun E, Iriz A, Mumcuoglu I, Eryilmaz A.** (2011) Changes in the ocular and nasal cultures in patients who had undergone septoplasty. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 40:493-498.
- Edwards KJ, Rutenberg AD.** (2001) Microbial response to surface microtopography: the role of metabolism in localized mineral dissolution. *Chemical Geology*. 180:19–32.
- English FP, Apel JV.** (1973) Cerclage technique for dynamic eyelid closure in facial paralysis. *Br J Ophthalmol*. 57:750-752.
- Erdogan H, Kemal M, Toker MI, Topalkara A, Bakici Z.** (2002) Effect of frequent-replacement contact lenses on normal conjunctival flora. *CLAO J*. 28:94-95.
- Ermis SS, Aktepe OC, Inan UU, Ozturk F, Altindis M.** (2004) Effect of topical dexamethasone and ciprofloxacin on bacterial flora of healthy conjunctiva. *Eye (Lond)*. 18:249-252.
- ESCRS Endophthalmitis Study Group.** (2007) Prophylaxis of postoperative endophthalmitis following cataract surgery: results of the ESCRS multicenter study and identification of risk factors. *J Cataract Refract Surg*. 33:978-988.
- EVSG.** (1996) Microbiologic factors and visual outcome in the endophthalmitis vitrectomy study. *Am J Ophthalmol*. 122:830-46.
- Fan J.** (2001) Frontalis suspension technique with a temporal-fasciae-complex sheet for repairing blepharoptosis. *Aneth Plast Surg*. 25: 147-151.
- Fan X, Bi X, Fu Y, Zhou H.** (2008) The use of Medpor coated tear drainage tube in conjunctivodacryocystorhinostomy. *Eye (Lond)*. 22:1148-1153.
- Fay A, Santiago YM.** (2012) A modified levine palpebral spring for the treatment of myogenic ptosis. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 28:372-375.
- Fernández-Rubio E.** (2004) Conjunctival bacteria of patients undergoing cataract surgery: changes in the last 50 years. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 79:13-19.
- Finch J.** (2011) The ancient origins of prosthetic medicine. *The Lancet*. 377: 548-549.
- Fisher RA.** (1925) Intraclass correlations and the analysis of variance. En: *Statistical Methods for Research Workers*. pp. 198-236. Eds: Crew FAE, Ward Cutler D. Oliver and Boyd, London. UK.
- Flemming HC, Wingender J.** (2010) The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*. 8:623-633.

- Foster A.** (2001) Cataract and "Vision 2020-the right to sight" initiative. *Br J Ophthalmol.* 85: 635-637.
- Foster TJ, Geoghegan JA, Ganesh VK, Höök M.** (2014) Adhesion, invasion and evasion: the many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Microbiol.* 12:49-62.
- Fox GM, Joondeph BC, Flynn HW Jr, Pflugfelder SC, Roussel TJ.** (1991) Delayed-onset pseudophakic endophthalmitis. *Am J Ophthalmol.* 111:163-173.
- Freedman J.** (2010) What is new after 40 years of glaucoma implants. *J Glaucoma.* 19:504-508.
- Friedman L, Kolter R.** (2004) Two genetic loci produce distinct carbohydrate-rich structural components of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *J Bacteriol.* 186:4457-4465.
- Fujikawa H, Munakata K, Sakha MZ.** (2014) Development of a competition model for microbial growth in mixed culture. *Biocontrol Sci.* 19:61-71.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP.** (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol.* 176: 269–275.
- Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P.** (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.* 13:34-40.
- Gailey FB, Stefaniak JJ, Olson BH, Johnson MJ.** (1946) A Comparison of Penicillin-producing Strains of *Penicillium notatum*-*chrysogenum*. *J Bacteriol.* 52:129-140.
- García-Sáenz MC, Arias-Puente A, Fresnadillo-Martinez MJ, Matilla-Rodríguez A.** (2000) In vitro adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg.* 26:1673-1679.
- Gedde SJ, Scott IU, Tabandeh H, Luu KK, Budenz DL, Greenfield DS, Flynn HW Jr.** (2001) Late endophthalmitis associated with glaucoma drainage implants. *Ophthalmology.* 108:1323-1327.
- Gentile RC, Shukla S, Shah M, Ritterband DC, Engelbert M, Davis A, Hu DN.** (2014) Microbiological spectrum and antibiotic sensitivity in endophthalmitis: a 25-year review. *Ophthalmology.* 121:1634-1642.
- Giaouris E, Chorianopoulos N, Doulgeraki A, Nychas GJ.** (2013) Co-Culture with *Listeria monocytogenes* within a Dual-Species Biofilm Community Strongly Increases Resistance of *Pseudomonas putida* to Benzalkonium Chloride. *PLoS One.* 8:e77276.
- Gibbs DC.** (1967) New probe for the intubation of lacrimal canaliculi with silicone rubber tubing. *Br J Ophthalmol.* 51:198.

- Gladstone GJ, Putterman AM.** (1985) A modified glass tube for conjunctivodacryocystorhinostomy. *Arch Ophthalmol.* 103:1229-1230.
- Goldberg RA, Samimi DB, Tsirbas A, Douglas RS.** (2008) The hydrogel lacrimal stent for dacryocystorhinostomy: preliminary experience. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 24:85-89.
- Goldfarb HJ, Turtz AI.** (1966) A detergent-lubricant solution for artificial eyes. *Am J Ophthalmol.* 61:1502-1505.
- Goldsmith JR, Sartor RB.** (2014) The role of diet on intestinal microbiota metabolism: downstream impacts on host immune function and health, and therapeutic implications. *J Gastroenterol.* 49:785-98.
- González-Candial M, Umaña MA, Galvez C, Medel R, Ayala E.** (2007) Comparison between motility of biointegratable and silicone orbital implants. *Am J Ophthalmol.* 143:711-712.
- Gopal L, Nagpal A, Verma A.** (2008) Direct aspiration of capsular bag material in a case of sequestered endophthalmitis. *Indian J Ophthalmol.* 56:155-157.
- Gordon JI, Klaenhammer TR.** (2011) A rendezvous with our microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108 Suppl 1:4513-4515.
- Graham JE, Moore JE, Jiru X, Moore JE, Goodall EA, Dooley JS et al.** (2007) Ocular pathogen or commensal: a PCR-based study of surface bacterial flora in normal and dry eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 48:5616-5623.
- Grasbon T, Miño de Kaspar H, Klauss V.** (1995) Coagulase-negative staphylococci in normal and chronically inflamed conjunctiva. *Ophthalmologie.* 92:793-801.
- Griffith TP.** (1963) Polythene tubes in canaliculus surgery. *Br J Ophthalmol.* 47:203-210.
- Gritz DC, Scott TJ, Sedó SF, Cevallos AV, Margolis TP, Whitcher JP.** (1997) Ocular flora of patients with AIDS compared with those of HIV-negative patients. *Cornea.* 16:400-405.
- Güler M, Yılmaz T.** (2013) Anterior vitrectomy and partial capsulectomy via anterior approach to treat chronic postoperative endophthalmitis. *Int J Ophthalmol.* 6:103-105.
- Gunarajah DR, Samman N.** (2013) Biomaterials for repair of orbital floor blowout fractures: a systematic review. *J Oral Maxillofac Surg.* 71:550-570.
- Gündüz A, Gündüz A, Cumurcu T, Seyrek A.** (2008) Conjunctival flora in Behçet patients. *Can J Ophthalmol.* 43:476-479.
- Guyton JS.** (1948) Enucleation and Allied Procedures: A Review, and Description of a New Operation. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 46: 472–527.

Helveston EM, Wilson DL. (1975) A suture-reinforced scleral sling. Technique for suspension of the ptotic upper lid. *Arch Ophthalmol.* 93:643-645.

Henderson JW, Belau PG. (1964) Insertion of a plastic intracorneal lens: report of case. *Mayo Clin Proc.* 39:772-774.

Hersh D, Martin FJ, Rowe N. (2006) Comparison of silastic and banked fascia lata in pediatric frontalis suspension. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus.* 43:212-218.

Hirai K, Takano Y, Uchio E, Kadonosono K. (2012) Clinical evaluation of the therapeutic effects of atelocollagen absorbable punctal plugs. *Clin Ophthalmol.* 6:133-138.

Hornblass A, Biesman BS, Eviatar JA. (1995) Current techniques of enucleation: a survey of 5,439 intraorbital implants and a review of the literature. *Ophthalm Plast Reconstr Surg.* 11:77-86.

Hsu HY, Lind JT, Tseng L, Miller D. (2013) Ocular flora and their antibiotic resistance patterns in the midwest: a prospective study of patients undergoing cataract surgery. *Am J Ophthalmol.* 155:36-44.

Hugh R, Ellis MA. The neotype strain for *Staphylococcus epidermidis* (Winslow and Winslow 1908) Evans 1916. (1968) *Int J Syst Bacteriol.* 18:231-9.

Hurwitz JJ, Pavlin CJ, Rhemtulla el-K. (2004) Identification of retained intracanalicular plugs with ultrasound biomicroscopy. *Can J Ophthalmol.* 39:533-537.

Iliff NT. (1991) The ophthalmic implications of the correction of late enophthalmos following severe midfacial trauma. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 89:477-548.

Isenberg SJ, Apt L, Yoshimori R, McCarty JW, Alvarez SR. (1988) Source of the conjunctival bacterial flora at birth and implications for ophthalmia neonatorum prophylaxis. *Am J Ophthalmol.* 106:458-462.

Iskeleli G, Bahar H, Eroglu E, Torun MM, Ozkan S. (2005) Microbial changes in conjunctival flora with 30-day continuous-wear silicone hydrogel contact lenses. *Eye Contact Lens.* 31:124-126.

Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanaukee P, Koivula T. (1991) A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics.* 88:90-7.

Iyer MN, Wirostko WJ, Kim SH, Simons KB. (2005) *Staphylococcus hominis* endophthalmitis associated with a capsular hypopyon. *Am J Ophthalmol.* 139:930-2.

Izano EA, Amarante MA, Kher WB, Kaplan JB. (2008) Differential roles of poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide and extracellular DNA in *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 74:470-476.

- John T, Kopstein AB, John OC, Lai CI, Carey RB.** (2001) In vitro adherence of Staphylococcus epidermidis to silicone punctal plugs and collagen implants. *J Cataract Refract Surg.* 27:1298-1302.
- Jones LT.** (1962) The cure of epiphora due to canalicular disorders, trauma and surgical failures on the lacrimal passages. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 66:506-524.
- Juma NA, Forsythe SJ.** (2015) Microbial biofilm development on neonatal enteral feeding tubes. *Adv Exp Med Biol.* 830:113-121.
- Junceda Avelló JM, Junceda Moreno JM, Suárez Suárez E.** (1998) Los cambios terapéuticos en la oftalmología a lo largo de 200 años. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 73: 601-603.
- Kaido M, Ishida R, Dogru M, Tsubota K.** (2013) Comparison of retention rates and complications of 2 different types of silicon lacrimal punctal plugs in the treatment of dry eye disease. *Am J Ophthalmol.* 155:648-653.
- Kajla G, Rohatgi J, Dhaliwal U.** (2014) Use of subjective and objective criteria to categorise visual disability. *Indian J Ophthalmol.* 62:400-406.
- Kakizaki H, Zako M, Iwaki M.** (2007) Lower eyelid lengthening surgery targeting the posterior layer of the lower eyelid retractors via a transcutaneous approach. *Clin Ophthalmol.* 1:141-147.
- Kanski JJ.** (2002) Trastornos de la conjuntiva. En: *Oftalmología clínica 4ª Edición*, pp.69. Ed.: Elsevier España, Madrid, España.
- Karesh JW, Dresner SC.** (1994) High-density porous polyethylene (Medpor) as a successful anophthalmic socket implant. *Ophthalmology.* 101:1688-1695.
- Karesh JW.** (1998) Biomaterials in ophthalmic plastic and reconstructive surgery. *Curr Opin Ophthalmol.* 9:66-74.
- Katsikogianni M, Missirlis YF.** (2004) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater.* 8:37-57.
- Keselman HJ, Leventhal L.** (1974) Concerning the statistical procedures enumerated by Gentile et al.: another perspective. *J Appl Behav Anal.* 7:643-645.
- Kim SE, Lee SJ, Lee SY, Yoon JS.** (2012) Clinical significance of microbial growth on the surfaces of silicone tubes removed from dacryocystorhinostomy patients. *Am J Ophthalmol.* 153:253-257.
- Kim SJ, Toma HS, Midha NK, Cherney EF, Recchia FM, Doherty TJ.** (2010) Antibiotic resistance of conjunctiva and nasopharynx evaluation study: a prospective study of patients undergoing intravitreal injections. *Ophthalmology.* 117:2372-2378.

- Kiremitci-Gumusderelioglu M, Pesmen A.** (1996) Microbial adhesion to ionogenic PHEMA, PU and PP implants. *Biomaterials*. 17:443-449.
- Kloos WE, Musselwhite MS.** (1975) Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. *Appl Microbiol*. 30:381-5.
- Klotz SA, Penn CC, Negvesky GJ, Butrus SI.** (2000) Fungal and parasitic infections of the eye. *Clin Microbiol Rev*. 13:662-685.
- Knauer T, Schlüter G.** (2010) 175 years of German eye prostheses. En: *Kunstaugen - Augenkunst*, pp. 20-24. Eds: Schlüter G. Museum für Glaskunst, Lauscha, Germany.
- Knox KW.** (1963) Isolation of group specific products from *Lactobacillus casei* and *L.casei* var.*rhamnosus*. *J Gen Microbiol*. 31:59-72.
- Ko GY, Song HY, Seo TS, Kim TH, Sung KB, Yoon HK.** (2003) Obstruction of the lacrimal system: treatment with a covered, retrievable, expandable nitinol stent versus a lacrimal polyurethane stent. *Radiology*. 227:270-226.
- Kolenbrander PE, Palmer RJ Jr, Periasamy S, Jakubovics NS.** (2010) Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nat Rev Microbiol*. 8:471-480.
- Kolling GL, Matthews KR.** (1999) Export of virulence genes and Shiga toxin by membrane vesicles of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol*. 65:1843-1848.
- Kompella UB, Kadam RS, Lee VH.** (2010) Recent advances in ophthalmic drug delivery. *Ther Deliv*. 1:435-456.
- Kong HH.** (2011) Skin microbiome: genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. *Trends Mol Med*. 17:320-328.
- Kontio R, Suuronen R, Salonen O, Paukku P, Konttinen YT, Lindqvist C.** (2001) Effectiveness of operative treatment of internal orbital wall fracture with polydioxanone implant. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 30:278-285.
- Koreishi AF, Schechter BA, Karp CL.** (2006) Ocular infections caused by *Providencia rettgeri*. *Ophthalmology*. 113:1463-1466.
- Kornilaeva G.G.** (2003) Secondary glaucoma: Surgical treatment based on the idea of cyclodialysis operation and its modifications. *Regenerative surgery*.
- Kowalski RP, Kowalski TA, Shanks RM, Romanowski EG, Karenchak LM, Mah FS.** (2013) In vitro comparison of combination and monotherapy for the empiric and optimal coverage of bacterial keratitis based on incidence of infection. *Cornea*. 32:830-834.

- Krupin T, Podos SM, Becker B, Newkirk JB.** (1976) Valve implants in filtering surgery. *Am J Ophthalmol.* 81:232-235.
- Kubota H, Senda S, Nomura N, Tokuda H, Uchiyama H.** (2008) Biofilm formation by lactic acid bacteria and resistance to environmental stress. *J Biosci Bioeng.* 106:381-386.
- Kurihara K, Kojima T, Marumo E.** (1984) Frontalis suspension for blepharoptosis using palmaris longus tendon. *Ann Plast Surg.* 13:274-278.
- Kusbeci T, Kusbeci OY, Aktepe OC, Yavas G, Ermis SS.** (2009) Conjunctival flora in patients with Parkinson's disease. *Curr Eye Res.* 34:251-256.
- Lacey N, Kavanagh K, Tseng SC.** (2009) Under the lash: Demodex mites in human diseases. *Biochem (Lond).* 31:2-6.
- Lee SH, Mannis MJ, Shapiro B, Li JY, Polage C, Smith W.** (2013) Evaluation of microbial flora in eyes with a Boston type 1 Keratoprosthesis. *Cornea.*32:1537-9.
- Lee SH, Oh DH, Jung JY, Kim JC, Jeon CO.** (2012) Comparative ocular microbial communities in humans with and without blepharitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53:5585-5593.
- Leitch EC, Harmis NY, Corrigan KM, Willcox MD.** (1998) Identification and enumeration of staphylococci from the eye during soft contact lens wear. *Optom Vis Sci.* 75:258-265.
- Lemley CA, Han DP.** (2007) Endophthalmitis: a review of current evaluation and management. *Retina.* 27:662-680.
- Leone CR Jr, Shore JW, Van Germert JV.** (1981) Silicone rod frontalis sling for the correction of blepharoptosis. *Ophthalmic Surg.* 12: 881-887.
- Leske MC, Heijl A, Hyman L, Bengtsson B, Komaroff E.** (2004) Factors for progression and glaucoma treatment: the Early Manifest Glaucoma Trial. *Curr Opin Ophthalmol.* 15:102-106.
- Levine RE.** (1999) The enhanced palpebral spring. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery.* 6:152–156.
- Li T, Shen J, Duffy MT.** (2001) Exposure rates of wrapped and unwrapped orbital implants following enucleation. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 17:431-435.
- Liang X, Lin Y, Wang Z, Lin L, Zeng S, Liu Z, Li N, Wang Z, Liu Y.** (2012) A modified bicanalicular intubation procedure to repair canalicular lacerations using silicone tubes. *Eye (Lond).* 26:1542-1547.

- Lichtinger A, Yeung SN, Kim P, Amiran MD, Iovieno A, Elbaz U, Ku JY, Wolff R, Rootman DS, Slomovic AR.** (2012) Shifting trends in bacterial keratitis in Toronto: an 11-year review. *Ophthalmology*. 119:1785-1790.
- Lim C, Martin P, Benger R, Kourt G, Ghabrial R.** (2004) Lacrimal canalicular bypass surgery with the Lester Jones tube. *Am J Ophthalmol*. 137:101-108.
- Liu J, Li J, Huo J and Xie H.** (2011) Identification and quantitation of conjunctival aerobic bacterial flora from healthy residents at different ages in Southwest China. *African Journal of Microbiology Research*. 5: 192-197.
- Lodder A, Kamath MV, Upton AR, Armstrong D.** (2010) Evaluation of the efficacy and performance of medical implants: a review. *J Long Term Eff Med Implants*. 20: 173-185.
- López-Sánchez E, España Gregori E, Roda Marzal V, Bueno I, Francés Muñoz E, Menezo JL.** (2001) Conjunctival microbiological study in corneo-scleral prosthesis users. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 76:669-672.
- Low D, Hayes C.** (2012) Contact-dependent communication mechanisms in bacteria. Disponible en:
<http://www.iom.edu/~media/Files/Activity%20Files/PublicHealth/MicrobialThreats/2012-MAR-06/Presentations/16%20Low.pdf>
- Lu HM, Motley ST, Lory S.** (1997) Interactions of the components of the general secretion pathway: role of *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin subunits in complex formation and extracellular protein secretion. *Mol Microbiol*. 25:247-259.
- Lucci LM, Höfling-Lima AL, Erwenne CM, Toledo Cassano EM.** (2007) Artificial eye amplitudes and characteristics in enucleated socket with porous polyethylene spherical and quad-motility implant. *Arq Bras Oftalmol*. 70:831-838.
- Lunardelli P, Aoki L, Jervásio AC, Zagui RM, Matayoshi S.** (2008) Nasolacrimal stent implantation: report of a case. *Arq Bras Oftalmol*. 71:110-114.
- Ma JJ, Graney JM, Dohlman CH.** (2005) Repeat penetrating keratoplasty versus the Boston keratoprosthesis in graft failure. *Int Ophthalmol Clin*. 45:49-59.
- Mac I, Soltau JB.** (2003) Glaucoma-filtering bleb infections. *Curr Opin Ophthalmol*. 14:91-94.
- Macivor J.** (1950) The management of chronic inflammation of the orbital socket. *Am J Ophthalmol*. 33:1573-1578.
- Malot J, Combe C, Savary P, Moss A, Ligeon-Ligeonnet P, Hida H.** (2010) Direct cost of cataract surgery in public hospital. *Ann Pharm Fr*. 68:380-387.
- Marcovich A, Levartovsky S.** (1994) *Acinetobacter* exposure keratitis. *Br J Ophthalmol*. 78:489-90.

Martin DH. (2012) The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci.* 343:2-9.

Martínez-Granero F, Navazo A, Barahona E, Redondo-Nieto M, González de Heredia E, Baena I, Martín-Martín I, Rivilla R, Martín M. (2014) Identification of flgZ as a flagellar gene encoding a PilZ domain protein that regulates swimming motility and biofilm formation in *Pseudomonas*. *PLoS One.* 9:e87608.

Martínez-Rodríguez E, Paz-Jiménez J. (1995) Manejo en la cirugía de trasplantes. Eds: Universidad de Oviedo, Oviedo, España.

Martins EN, Alvarenga LS, Höfling-Lima AL, Freitas D, Zorat-Yu MC, Farah ME, Mannis MJ. (2004) Aerobic bacterial conjunctival flora in diabetic patients. *Cornea.* 23:136-142.

Mashburn-Warren LM, Whiteley M. (2006) Special delivery: vesicle trafficking in prokaryotes. *Mol Microbiol.* 61:839-846.

Mavrikakis I, Francis N, Poitelea C, Parkin B, Brittain P, Olver J. (2009) Medpor lower eyelid spacer: does it biointegrate? *Orbit.* 28:58-62.

Mawn LA, Jordan DR, Gilberg S. (1998) Scanning electron microscopic examination of porous orbital implants. *Can J Ophthalmol.* 33:203-209.

McAllister EW, Carey LC, Brady PG, Heller R, Kovacs SG. (1993) The role of polymeric surface smoothness of biliary stents in bacterial adherence, biofilm deposition, and stent occlusion. *Gastrointest Endosc.* 39:422-425.

McCabe C. (2009) Plugs Reduce Dry-Eye Symptoms, Improve Vision. Review of Ophthalmology Online. Disponible en:
<http://www.revophth.com/content/d/features/i/1210/c/22809/>

McClellan KA. (1997) Mucosal defense of the outer eye. *Surv Ophthalmol.* 42:233-246.

McNatt J, Allen SD, Wilson LA, Dowell VR Jr. (1978) Anaerobic flora of the normal human conjunctival sac. *Arch Ophthalmol.* 96:1448-1450.

Mehrotra AS, Rai ST. (1975) Canaliculus repair by a simplified method. *Indian J Ophthalmol.* 23:30-32.

Mehta P, Patel P, Olver JM. (2004) Functional results and complications of Mersilene mesh use for frontalis suspension ptosis surgery. *Br J Ophthalmol.* 88:361-364.

Merritt K, Gaind A, Anderson JM. (1998) Detection of bacterial adherence on biomedical polymers. *J Biomed Mater Res.* 39:415-422.

- Migita K, Eguchi K, aoyagi T, Tsukada T, Tsuboi M, Kawabe Y, Nagataki S.** (1996) The effects of the immunosuppressant rapamycin on the growth of rheumatoid arthritis (RA) synovial fibroblast. *Clin Exp Immunol.* 104:86-91.
- Miller MB, Bassler BL.** (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 55:165-199.
- Miller SD, Smith RE, Dippe DW, Lacey DR, Abel M.** (1976) Bacteriology of the socket in patients with prostheses. *Can J Ophthalmol.* 11:126-129.
- Missaghi B, Barkema HW, Madsen KL, Ghosh S.** (2014) Perturbation of the human microbiome as a contributor to inflammatory bowel disease. *Pathogens.* 3:510-527.
- Mitsui Y, Hanabusa J.** (1955) Corneal infections after cortisone therapy. *Br J Ophthalmol.* 39:244-250.
- Moloney TP, Park J.** (2014) Microbiological isolates and antibiotic sensitivities in culture-proven endophthalmitis: a 15-year review. *Br J Ophthalmol.* 98:1492-7.
- Molteno AC.** (1969) New implant for drainage in glaucoma. Clinical trial. *Br J Ophthalmol.* 53:606-615.
- Mombaerts I, Colla B.** (2007) Modified Jones' lacrimal bypass surgery with an angled extended Jones' tube. *Ophthalmology.* 114:1403-1408.
- Monteagudo, A.** (2010) Selección *in vitro* de microorganismos con potencial probiótico. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Morán A, Gutiérrez S, Martínez-Blanco H, Ferrero MA, Monteagudo-Mera A, Rodríguez-Aparicio LB.** (2014) Non-toxic plant metabolites regulate *Staphylococcus* viability and biofilm formation: a natural therapeutic strategy useful in the treatment and prevention of skin infections. *Biofouling.* 30:1175-1182.
- Morel-Fatio D, Lalardrie JP.** (1964) Palliative surgical treatment of facial paralysis: The palpebral spring. *Plast Reconstr Surg.* 33:446-456.
- Moreno NP, Moreno RD, Sousa LB.** (2014) Aerobic bacterial microbiota of the conjunctiva in diabetic patients with normal and altered glycosylated hemoglobin levels in two regions in Brazil. *Arq Bras Oftalmol.* 77:351-354.
- Morgan JF.** (1979) Complications associated with contact lens solutions. *Ophthalmology.* 86:1107-1119.
- Morgan JF, Hill JC.** (1964) Silicone fluid as a lubricant for artificial eyes. *Am J Ophthalmol.* 58:767-774.
- Morgan R, Kohn S, Hwang SH, Hassett DJ, Sauer K.** (2006) BdlA, a chemotaxis regulator essential for biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 188:7335-7343.

- Morrison AD, Sanderson RC, Moos KF.** (1995) The use of silastic as an orbital implant for reconstruction of orbital wall defects: review of 311 cases treated over 20 years. *J Oral Maxillofac Surg.* 53:412-417.
- Morton AD, Nelson C, Ikada Y, Elnor VM.** (2000) Porous polyethylene as a spacer graft in the treatment of lower eyelid retraction. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 16:146-155.
- Moshfeghi DM, Moshfeghi AA, Finger PT.** (2000) Enucleation. *Surv Ophthalmol.* 44:277-301.
- Mukherji S, Aralikatti A, Sandramouli S, Ilango B.** (2008) A case of lower lid ulcer secondary to reverse migration of silicone punctal plug. *Orbit.* 27:374-376.
- Muñoz-Gutierrez G, Alvarez de Toledo J, Barraquer RI, Vera L, Couto Valeria R, Nadal J, de la Paz MF.** (2013) Post-surgical visual outcome and complications in Boston type 1 keratoprosthesis. *Arch Soc Esp Oftalmol.* 88:56-63.
- Murray CK, Hospenthal DR.** (2005) Treatment of multidrug resistant *Acinetobacter*. *Curr Opin Infect Dis.* 18:502-6.
- Nakamura H, Hachiya N, Tojo T.** (1978) Second acriflavine sensitivity mutation, *acrB*, in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 134:1184-1187.
- Namnyak SS, Blair AL, Hughes DF, McElhinney P, Donnelly MR, Corey J.** (1992) Fatal lung abscess due to *Lactobacillus casei* ss *rhamnosus*. *Thorax.* 47:666-7.
- Namvar AE, Bastarahang S, Abbasi N, Ghehi GS, Farhadbakhtiarian S, Arezi P, Hosseini M, Baravati SZ, Jokar Z, Chermahin SG.** (2014) Clinical characteristics of *Staphylococcus epidermidis*: a systematic review. *GMS Hyg Infect Control.* 9:Doc23.
- Navasa, N.** (2009) Polímeros capsulares bacterianos en *E. coli* K92: ácido colánico y ácido polisialico. Tesis Doctoral. Universidad de León.
- Nerad JA.** (2010) Techniques in ophthalmic plastic surgery. Eds: Gabbedy R, Nash S. Elsevier.
- Nichamin LD.** (2009) Glaukos iStent Trabecular Micro-Bypass. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 16:138-140.
- Noble WC, Valkenburg HA, Wolters CH.** (1967) Carriage of *Staphylococcus aureus* in random samples of a normal population. *J Hyg (Lond).* 65:567-73.
- Norton BJ, Strube MJ.** (1985) Guide for the interpretation of one-way analysis of variance. *Phys Ther.* 65:1888-1892.
- Nunery WR, Heinz GW, Bonnin JM, Martin RT, Cepela MA.** (1993) Exposure rate of hydroxyapatite spheres in the anophthalmic socket: histopathologic correlation and comparison with silicone sphere implants. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 9:96-104.

- Oduwole KO, Glynn AA, Molony DC, Murray D, Rowe S, Holland LM, McCormack DJ, O'Gara JP.** (2010) Anti-biofilm activity of sub-inhibitory povidone-iodine concentrations against *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. *J Orthop Res.* 28:1252-1256.
- O'Hara AM, Shanahan F.** (2006) The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 7:688-693.
- Olson R, Donnenfeld E, Bucci FA Jr, Price FW Jr, Raizman M, Solomon K, et al.** (2010) Methicillin resistance of *Staphylococcus* species among health care and nonhealth care workers undergoing cataract surgery. *Clin Ophthalmol.* 10;4:1505-1514.
- O'Neill ME, Mathews KL.** (2002) Levene tests of homogeneity of variance for general block and treatment designs. *Biometrics.* 58:216-224.
- Ono M, Nikaido T, Ikeda M, Imai S, Hanada N, Tagami J, Matin K.** (2007) Surface properties of resin composite materials relative to biofilm formation. *Dent Mater J.* 26:613-622.
- Ortiz Marrón H, Vaamonde Martín RJ, Zorrilla Torrás B, Arrieta Blanco F, Casado López M, Medrano Albero MJ.** (2011) Prevalence, degree of control and treatment of hypertension in the adult population of Madrid, Spain. *Rev Esp Salud Publica.* 85:329-338.
- Owji N, Khalili MR.** (2009) Normalization of conjunctival flora after dacryocystorhinostomy. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 25:136-138.
- Palmer J, Flint S, Brooks J.** (2007) Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 34:577-588.
- Parsa K, Schaudinn C, Gorur A, Sedghizadeh PP, Johnson T, Tse DT, Costerton JW.** (2010) Demonstration of bacterial biofilms in culture-negative silicone stent and jones tube. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 26:426-430.
- Patillon JC, Rouse C, Gauthier C, Guyot J, Barbier A, Royer J, Michel-Briand Y.** (1978) Bacterial flora of the conjunctiva in enucleated subjects. *Bull Soc Ophtalmol Fr.* 78:781-787.
- Payr E.** (1909) Plastik mittels freier Faszientransplantation bei Ptosis. *Dtsch Med Wochenschr.* 35: 822 (German).
- Perkins RE, Kundsinn RB, Pratt MV, Abrahamsen I, Leibowitz HM.** (1975) Bacteriology of normal and infected conjunctiva. *J Clin Microbiol.* 1:147-149.
- Pesci EC, Pearson JP, Seed PC, Iglewski BH.** (1997) Regulation of las and rhl quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 179:3127-3132.
- Petrova OE, Sauer K.** (2012) Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *J Bacteriol.* 194:2413-2425.

- Piccone MR.** (2000) A new technique for retrieval or repositioning of damaged or migrated silicone punctal plugs. *Ophthalmic Surg Lasers.* 31:351-352.
- Pine K, Sloan B, Stewart J, Jacobs RJ.** (2012) A survey of prosthetic eye wearers to investigate mucoid discharge. *Clin Ophthalmol.* 6:707-713.
- Pine KR, Sloan B, Stewart J, Jacobs RJ.** (2013) The response of the anophthalmic socket to prosthetic eye wear. *Clin Exp Optom.* 96:388-393.
- Pongprayoon C.** (2008) Outcome of porous implants: incidence of complications, management, and morbidity. *J Med Assoc Thai.* 91:S81-85.
- Post JC.** (2001) Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. *Laryngoscope.* 111:2083-2094.
- Potter JK, Malmquist M, Ellis E 3rd.** (2012) Biomaterials for reconstruction of the internal orbit. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 24:609-627.
- Potthoff E, Ossola D, Zambelli T, Vorholt JA.** (2015) Bacterial adhesion force quantification by fluidic force microscopy. *Nanoscale.* 7:4070-4079.
- Prada MC, Pérez JV, Toledano N.** (2002) Complicaciones post-operatorias en la reconstrucción de cavidades orbitarias. Exposición, extrusión, migración e infección del implante orbitario. En: *Manejo de la cavidad anoftálmica*, pp.127-136. Eds: Toledano N, Prada MC. Memory Chip, Madrid, España.
- Prat J.** (2002a) Implantes orbitarios. En: *Manejo de la cavidad anoftálmica*, pp.77-99. Eds: Toledano N, Prada MC. Memory Chip, Madrid, España.
- Prat J.** (2002b) Evisceración ocular con colgajos esclerales. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.
- Puskas A, Greenberg EP, Kaplan S, Schaefer AL.** (1997) A quorum-sensing system in the free-living photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol.* 179:7530-7537.
- Ramos-Esteban JC, Bamba S, Jeng BH.** (2008) Treatment of multidrug-resistant *Flavobacterium indologenes* keratitis with trimethoprim-sulfamethoxazole. *Cornea.* 27:1074-1076.
- Rezaei KA, Abrams GW.** (2005) The History of Retinal Detachment Surgery. En: *Primary Retinal Detachment. Options for Repair.* Eds: Kreissig I. Springer.
- Roman F.** (1994) The history of artificial eyes. *Br J Ophthalmol.* 78: 222.
- Rose GE, Sigurdsson H, Collin R.** (1990) The volume-deficient orbit: clinical characteristics, surgical management, and results after extraperiorbital implantation of Silastic block. *Br J Ophthalmol.* 74:545-550.

- Roush W.** (1995) Envisioning an artificial retina. *Science*. 268:637-638.
- Ruedemann AD.** (1945) Plastic Eye Implant. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 43:304-12.
- Rumelt S, Remulla H, Rubin PA.** (1997) Silicone punctal plug migration resulting in dacryocystitis and canaliculitis. *Cornea*. 16:377-379.
- Rusiecka-Ziółkowska J, Nokiel M, Fleischer M.** (2014) Demodex - an old pathogen or a new one? *Adv Clin Exp Med*. 23:295-298.
- Sajjadi SMS, Casanova M, Costantini L, Lorentz KO.** (2008) Sistan and Baluchistan Project: Short reports on the tenth campaign of excavations at Shahr-i Sokhta. *British Institute of Persian Studies*. 46: 307-334.
- Sami DA, Young SR.** (2010) Orbital enucleation implants: biomaterials and design. En: *Biomaterials and Regenerative Medicine in Ophthalmology*, pp.433-472. Eds: Chirila T. TJ International Limited, Cornwall, UK.
- Samimi DB, Bielory BP, Miller D, Johnson TE.** (2013) Microbiologic trends and biofilm growth on explanted periorbital biomaterials: a 30-year review. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 29:376-81.
- Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirotaki S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K** (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J Clin Microbiol*. 48:765-769.
- Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG.** (2002) *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol*. 184:1140-1154.
- Sauer K, Cullen MC, Rickard AH, Zeef LA, Davies DG, Gilbert P.** (2004) Characterization of nutrient-induced dispersion in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm. *J Bacteriol*. 186:7312-7326.
- Saunders RA, Grice CM.** (1991) Early correction of severe congenital ptosis. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus*. 28: 271-273.
- Schaefer F, Bruttin O, Zografos L, Guex-Crosier Y.** (2001) Bacterial keratitis: a prospective clinical and microbiological study. *Br J Ophthalmol*. 85:842-847.
- Schittkowski MP, Guthoff RF.** (2006) Injectable self inflating hydrogel pellet expanders for the treatment of orbital volume deficiency in congenital microphthalmos: preliminary results with a new therapeutic approach. *Br J Ophthalmol*. 90:1173-1177.
- Schmitz S, Dick HB, Krummenauer F, Pfeiffer N.** (1999) Endophthalmitis in cataract surgery: results of a German survey. *Ophthalmology*. 106:1869-1877.
- Sekhar GC, Dortzbach RK, Gonnering RS, Lemke BN.** (1991) Problems associated with conjunctivodacryocystorhinostomy. *Am J Ophthalmol*. 112:502-506.

- Shi L, Ardehali R, Caldwell KD, Valint P.** (2000) Mucin coating on polymeric material surfaces to suppress bacterial adhesion. *Col Surf B: Biointerf* 17: 229-239.
- Shida T, Koseki H, Yoda I, Horiuchi H, Sakoda H, Osaki M.** (2013) Adherence ability of *Staphylococcus epidermidis* on prosthetic biomaterials: an in vitro study. *Int J Nanomedicine*. 8:3955-3961.
- Shimizu K, Kobayakawa S, Tsuji A, Tochikubo T.** (2006) Biofilm formation on hydrophilic intraocular lens material. *Curr Eye Res*. 31:989-997.
- Silvério J, Sugano DM, Lucci LM, Rehder JR.** (2009) Frontalis suspension with polytetrafluorethylene for the treatment of blepharoptosis. *Arq Bras Oftalmol*. 72:79-83.
- Singer TR, Isenberg SJ, Apt L.** (1988) Conjunctival anaerobic and aerobic bacterial flora in paediatric versus adult subjects. *Br J Ophthalmol*. 72:448-451.
- Skaat A, Sagiv O, Kinori M, Simon GJ, Goldenfeld M, Melamed S.** (2014) Gold Micro-Shunt Implants Versus Ahmed Glaucoma Valve: Long-term Outcomes of a Prospective Randomized Clinical Trial. *J Glaucoma*. Oct 14. [Epub ahead of print]
- Smellie GD.** (1966) Restoration of the blinking reflex in facial palsy by a simple lid-load operation. *Br J Plast Surg*. 19:279-283.
- Smit TJ, Koornneef L, Zonneveld FW, Groet E, Otto AJ.** (1991) Management of acquired anophthalmos: A historical review. *Orbit*. 10: 63-76.
- Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ.** (1996) Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell*. 85:229-236.
- Soll DB.** (1971) A new type of evisceration implant. *Am J Ophthalmol*. 71:763-764.
- Son J, Kim CS, Yang J.** (2012) Comparison of experimental porous silicone implants and porous silicone implants. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 250:879-885.
- Song HY, Ahn HS, Park CK, Kwon SH, Kim CS, Choi KC.** (1993) Complete obstruction of the nasolacrimal system. Part II. Treatment with expandable metallic stents. *Radiology*. 186:372-376.
- Song HY, Jin YH, Kim JH, Huh SJ, Kim YH, Kim TH, Sung KB.** (1995) Nonsurgical placement of a nasolacrimal polyurethane stent. *Radiology*. 194:233-237.
- Song HY, Jin YH, Kim JH, Sung KB, Han YM, Cho NC.** (1994) Nasolacrimal duct obstruction treated nonsurgically with use of plastic stents. *Radiology*. 190:535-539.
- Speaker MG, Milch FA, Shah MK, Eisner W, Kreiswirth BN.** (1991) Role of external bacterial flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology*. 98:639-649.

- Stevens WG, Apfelberg DB, Stoker DA, Schantz SA.** (2003) The endotine: a new biodegradable fixation device for endoscopic forehead lifts. *Aesthet Surg J.* 23:103-107.
- Stewart PS.** (1996) Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother.* 40: 2517–2522.
- Stewart PS, Raquepas JB.** (1995) Implications of Reaction-Diffusion Theory for the Disinfection of Microbial Biofilms by Reactive Antimicrobial Agents *Chemical Engineering Science.* 50:3099-3104.
- Strampelli B, Valvo A, Tusa E.** (1965) Osteo-odonto-keratoprosthesis in a case treated for anchylobepharon and total simbleraphon. *Ann Ottalmol Clin Ocul.* 91:462-479.
- Sugita J, Yokoi N, Fullwood NJ, Quantock AJ, Takada Y, Nakamura Y, Kinoshita S.** (2001) The detection of bacteria and bacterial biofilms in punctal plug holes. *Cornea.* 20:362-365.
- Suto C, Morinaga M, Yagi T, Tsuji C, Toshida H.** (2012) Conjunctival sac bacterial flora isolated prior to cataract surgery. *Infect Drug Resist.* 5:37-41.
- Ta CN, Shine WE, McCulley JP, Pandya A, Trattler W, Norbury JW.** (2003) Effects of minocycline on the ocular flora of patients with acne rosacea or seborrheic blepharitis. *Cornea.* 22:545-548.
- Tabbara KF.** (2007) *Aspergillus fumigatus* colonization of punctal plugs. *Am J Ophthalmol.* 143:180-181.
- Takahashi Y, Iwaki M, Nakamura Y, Kakizaki H.** (2013) Dacryoendoscopic findings of intracanalicular punctal plug migration with or without canaliculitis. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 29:e128-30.
- Takemura M, Yokoi N, Nakamura Y, Komuro A, Sugita J, Kinoshita S.** (2002) Canaliculitis caused by *Actinomyces* in a case of dry eye with punctal plug occlusion. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi.* 106:416-419.
- Tan J, Olver J, Wright M, Maini R, Neoh C, Dickinson AJ.** (2004) The use of porous polyethylene (Medpor) lower eyelid spacers in lid heightening and stabilisation. *Br J Ophthalmol.* 88:1197-1200.
- Taylor RL, Verran J, Lees GC, Ward AJ.** (1998) The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. *J Mater Sci Mater Med.* 9:17-22.
- Tegoulia VA, Cooper SL.** (2002) *Staphylococcus aureus* adhesion to self-assembled monolayers: effect of surface chemistry and fibrinogen presence. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* 24:217–228.

- Teughels W, Van Assche N, Sliepen I, Quirynen M.** (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.* 2:68-81.
- Thiel HJ, Schumacher U.** (1994) Normal flora of the human conjunctiva: examination of 135 persons of various ages. *Klin Monbl Augenheilkd.* 205:348-357.
- Thormann KM, Duttler S, Saville RM, Hyodo M, Shukla S, Hayakawa Y, Spormann AM.** (2006) Control of formation and cellular detachment from *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms by cyclic di-GMP. *J Bacteriol.* 188:2681-2691.
- Thygeson P, Kimura SJ.** (1963) Chronic conjunctivitis. *Trans Am Acad Ophthalmol Otolaryngol.* 67:494-517.
- Tillett CW, Tillett GM.** (1966) Silicone sling in the correction of ptosis. *Am J Ophthalmol.* 62:521-523.
- Toledano N, García B, Nogueira A.** (2002) Manejo del enoftalmos en la cavidad anoftálmica. En: Manejo de la cavidad anoftálmica, pp.143-150. Eds: Toledano N, Prada MC. Memory Chip, Madrid, España.
- Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA.** (2003) Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology.* 149:3473-3484.
- Torres AG, Perna NT, Burland V, Ruknudin A, Blattner FR, Kaper JB.** (2002) Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 45:951-66.
- Toutain CM, Zegans ME, O'Toole GA.** (2005) Evidence for two flagellar stators and their role in the motility of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 187:771-777.
- Traverso CE, De Feo F, Messas-Kaplan A, Denis P, Levartovsky S, Sellem E, Badalà F, Zagorski Z, Bron A, Gandolfi S, Belkin M.** (2005) Long term effect on IOP of a stainless steel glaucoma drainage implant (Ex-PRESS) in combined surgery with phacoemulsification. *Br J Ophthalmol.* 89:425-429.
- Trester W.** (2010) The French eye prosthesis. En: *Kunstaugen - Augenkunst*, pp. 20-24. Eds: Schlüter G. Museum für Glaskunst, Lauscha, Germany.
- Troutman RC.** (1954) Five-year survey on use of a magnetic implant for improving cosmetic result of enucleation. *AMA Arch Ophthalmol.* 52:58-62.
- Troyano JA, Romo A.** (2009) Enoftalmos en la cavidad anoftálmica. *Boletín de la Soc. Oft. de Madrid* nº 49.
- Vagefi MR, McMullan TF, Burroughs JR, Georgescu D, McCann JD, Anderson RL.** (2011) Orbital augmentation with injectable calcium hydroxylapatite for correction

of postenucleation/evisceration socket syndrome. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 27:90-94.

Valenton MJ, Okumoto M. (1973) Toxin-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* (albus). Isolates from patients with staphylococcal blepharconjunctivitis. *Arch Ophthalmol.* 89:186-9.

Vasquez RJ, Linberg JV. (1989) The anophthalmic socket and the prosthetic eye. A clinical and bacteriologic study. *Ophthal Plast Reconstr Surg.* 5:277-280.

Vézina C, Kudelski A, Sehgal SN. (1975) Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo).* 28:721-726.

Viswanathan P, Sagoo MS, Olver JM. (2007) UK national survey of enucleation, evisceration and orbital implant trends. *Br J Ophthalmol.* 91:616-619.

Wagenblast J, Baghi M, Helbig M, Arnoldner C, Bisdas S, Gstöttner W, Hambek M, May A. (2008) Craniofacial reconstructions with bone-anchored epithesis in head and neck cancer patients--a valid way back to self-perception and social reintegration. *Anticancer Res.*28: 2349-2352.

Wang R, Kalchayanand N, Schmidt JW, Harhay DM. (2013) Mixed biofilm formation by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium enhanced bacterial resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances. *J Food Prot.* 76:1513-1522.

Wardman S. (1944) Plastic eyes. *Br J Ophthalmol.* 28: 149–150.

Weidler WB. (1917) Explosion of the Snellen Eye in the Orbit. Report a Case. *The Ophthalmic Record.* 26: 19-21.

Wiens JR, Vasil AI, Schurr MJ, Vasil ML. (2014) Iron-regulated expression of alginate production, mucoid phenotype, and biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *MBio.* 5:e01010-13.

Wilson MR, Mendis U, Paliwal A, Haynatzka V. (2003) Long-term follow-up of primary glaucoma surgery with Ahmed glaucoma valve implant versus trabeculectomy. *Am J Ophthalmol.* 136:464-470.

Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL. (2008) *Cocos Gram positivos: Parte I Estafilococos y cocos relacionados.* En: Koneman: Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color, pp. 594-595. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina.

Winslow CEA, Winslow AR. (1908). *The Systematic relationships of the Coccaceae.* pp. 1-300. Eds: John Wiley and Sons, New York.

- Winward KE, Pflugfelder SC, Flynn HW Jr, Roussel TJ, Davis JL.** (1993) Postoperative Propionibacterium endophthalmitis. Treatment strategies and long-term results. *Ophthalmology*. 100:447-451.
- Wong JF, Soparkar CN, Patrinely JR.** (2001) Correction of lower eyelid retraction with high density porous polyethylene: The Medpor((R)) Lower Eyelid Spacer. *Orbit*. 20:217-225.
- Woodyard LL, Bowersocka TL, Turekb JJ, McCabec GP, Defordd J.** (1996) A comparison of the effects of several silver-treated intravenous catheters on the survival of staphylococci in suspension and their adhesion to the catheter surface. *Journal of Controlled Release*. 40:23–30.
- Wozniak DJ, Wyckoff TJ, Starkey M, Keyser R, Azadi P, O'Toole GA, Parsek MR.** (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:7907-7912.
- Wu H, Moser C, Wang HZ, Høiby N, Song ZJ.** (2015) Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int J Oral Sci*. 7:1-7.
- Yang L, Pei Z.** (2006) Bacteria, inflammation, and colon cancer. *World J Gastroenterol*. 12:6741-6746.
- Yang WJ, Yang YN, Cao J, Man ZH, Yuan J, Xiao X, Xing YQ.** (2015) Risk Factors for Dry Eye Syndrome: A Retrospective Case-Control Study. *Optom Vis Sci*. 2015 Mar 10. [Epub ahead of print]
- Yokoi N, Okada K, Sugita J, Kinoshita S.** (2000) Acute conjunctivitis associated with biofilm formation on a punctal plug. *Jpn J Ophthalmol*. 44:559-560.
- Zegans ME, Becker HI, Budzik J, O'Toole G.** (2002) The role of bacterial biofilms in ocular infections. *DNA Cell Biol*. 21:415-420.
- Zhang Y, Liu ZR, Chen H, Fan YC, Duo J, Zheng H, Wang GJ, Li YC, Jiachu DB, Zewang GM.** (2013) Comparison on conjunctival sac bacterial flora of the seniors with dry eye in Ganzi autonomous prefecture. *Int J Ophthalmol*. 6:452-457.
- Zhivotovskii DS.** (1967) Drainage of the anterior chamber of the eye with a plastic tube in the surgical treatment of glaucoma. *Oftalmol Zh*. 22:382-384.
- Zhu Y, Dashper SG, Chen YY, Crawford S, Slakeski N, Reynolds EC.** (2013) *Porphyromonas gingivalis* and *Treponema denticola* synergistic polymicrobial biofilm development. *PLoS One*. 8:e71727.

