

Estudio del crecimiento bacteriano *in vitro* en sustancias viscoelásticas

J. Bardavio¹
N. Miserachs²
P. Favà²
M. Ollé²
Y. Rodríguez²

¹Departamento de Oftalmología Hospital Sagrado Corazón Institut Català de Retina Barcelona
²General Lab. Barcelona

Resumen

Estudiamos el crecimiento de tres bacterias involucradas en infecciones intraoculares postoperatorias, en diluciones progresivamente menores de materiales viscoelásticos.

Las muestras de *S epidermidis*, *S aureus* y *P aeruginosa* se incubaron en diferentes diluciones de viscoelásticos así como en medio de cultivo convencional durante 24 horas. Posteriormente se cultivaron en medio de cultivo otras 24 horas.

Detectamos un crecimiento de *P aeruginosa* igual que en el medio control. *S aureus* disminuyó su crecimiento con respecto al control. *S epidermidis* no creció.

El crecimiento bacteriano en los materiales estudiados es posible. Parece razonable extraer cuidadosamente todo el viscoelástico del interior del ojo al finalizar una intervención de catarata.

Resum

Estudiem el creixement de tres bactèries involucrades en infeccions intraoculars postoperatories, en dilucions progressivament menors de materials viscoelàstics.

Les mostres de *S epidermidis*, *S aureus* i *P aeruginosa* es varen incubar a diferents dilucions de viscoelàstics així com en mitjà de cultiu convencional durant 24 hores. Posteriorment es varen cultivar en mitjà de cultiu unes altres 24 hores. Detectem un creixement de *P aeruginosa* igual que al mitjà control. *S aureus* va disminuir el seu creixement amb respecte al control. *S epidermidis* no va créixer.

El creixement bacterià als materials estudiats és possible. Sembla raonable extreure amb tot el viscoelàstic de l'interior de l'ull al finalitzar una intervenció de catarata.

Summary

A study was designed to detect bacterial growth in progressive twofold viscoelastic material dilutions.

S epidermidis, *S aureus* and *P aeruginosa* samples were prepared and incubated on the different viscoelastic dilutions and a control medium for 24 hours. Then the samples were plated and cultured for another 24 hours.

We detected equal growth of *P aeruginosa* in dilutions and control. *S aureus* kept growth in low dilutions but decreased it in high dilutions. *S epidermidis* did not grow.

Bacterial growth seems possible in viscoelastic materials, therefore, it is reasonable to carefully remove it at the end of an intraocular procedure.

Introducción

La endoftalmitis postoperatoria es una complicación poco frecuente de la cirugía de catarata pero puede resultar catastrófica. En una revisión del Bascom Palmer Eye Institute, realizada entre los años 1984 y 1989 sobre un total de 30.002 intervenciones intraoculares¹, la incidencia de endoftalmitis en cirugía de catarata

extracapsular con o sin implante de lente intraocular fue de 0,072%. La incidencia de reingreso por endoftalmitis tras cirugía de catarata tendió a disminuir, desde 0,12% hasta 0,08%, entre los años 1984 y 1986-87, según estudio llevado a cabo en EEUU que se realizó tomando una muestra aleatoria del 5% de todos los casos intervenidos bajo Medicare. Hasta 1984 los pacientes eran ingresados para su interven-

Correspondencia:

J. Bardavio

Departamento de Oftalmología Hospital Sagrado Corazón Institut Català de Retina Barcelona

E-mail: javier@bardavio.net

ción (por expresión nuclear o facoemulsificación), después de 1986 se realizaba el procedimiento de forma ambulatoria². Un estudio danés de ámbito nacional de las intervenciones entre 1985 y 1987 indicaba una probabilidad acumulada de reingreso por endoftalmitis del 0,18%³. Recientemente un estudio noruego de ámbito nacional recogió 111 casos de endoftalmitis postoperatorias (101 intervenidos mediante facoemulsificación) de las 71.190 intervenciones de catarata realizadas entre 1996 y 1998. La incidencia de endoftalmitis oscila entre 0,12 y 0,16% según sea el cultivo de la muestra intraocular obtenida en el momento del diagnóstico positivo o no⁴.

Estos estudios sugieren que el cambio hacia un sistema ambulatorio de cirugía intraocular, particularmente de catarata, podría haber reducido la incidencia de infecciones intraoculares postoperatorias. Sin embargo, no existe una evidencia clara de que la transición de cirugía extracapsular por expresión del núcleo a facoemulsificación haya mejorado la incidencia de infecciones.

Una revisión de todos los artículos publicados en Medline entre los años 1966 y 2000⁵ concluye que únicamente el uso de povidona yodada para limpiar el saco conjuntival y piel palpebral tiene una moderada relevancia clínica en la profilaxis de endoftalmitis. Ningún otro método de los tradicionalmente utilizados para reducir el riesgo de infección ha demostrado una influencia relevante.

Algunos estudios sugieren la posibilidad de que la entrada de gérmenes en la cámara anterior se produzca durante la intervención de catarata⁶⁻¹⁰, aunque el resultado positivo de los cultivos varía desde 0% a 46%. En otro estudio no se encontraron diferencias en la contaminación de la cámara anterior entre cirugía de pequeña y gran incisión⁸. Sin embargo, se ha observado que son los gérmenes de la flora conjuntival los que más frecuentemente provocan infecciones. Speaker, *et al.* demostraron que en un 82 % de los casos la flora conjuntival tomada con hemosteta era genéticamente idéntica a la aislada de la muestra vítrea en los casos de endoftalmitis¹¹.

En el Endophthalmitis Vitrectomy Study, de 420 pacientes que entraron a formar parte del estudio sólo 291 muestras de humor vítreo y/o acuoso fueron positivas. El 70% fueron micrococcos gram-positivos coagulasa-negativos y un 9,9% *S aureus*¹². El 71% de los microorganismos aislados en los cultivos de muestras intraoculares fueron idénticos a los tomados de la flora conjuntival.

Una probable vía de entrada de bacterias en cámara anterior durante cirugía de catarata es la adhesión

bacteriana a la lente intraocular¹³. Jensen, *et al.* hallaron, por microscopia electrónica, una masiva colonización del háptico de polimetilmetacrilato, de una lente intraocular extraída de un paciente que desarrolló endoftalmitis postoperatoria de forma tardía¹⁴. En una revisión que abarca un periodo de 10 años, Meyer, *et al.* encontraron una reducción de la incidencia de la endoftalmitis a 0,028% cuando se utilizaban inyectores de lentes intraoculares¹⁵.

El beneficio que se deriva de la utilización de una sustancia viscoelástica durante la intervención de cataratas es indiscutible. Assia, *et al.* midieron de forma experimental el tiempo necesario para retirar todo el material viscoelástico del ojo, utilizando la técnica de Miyake con un aparato de irrigación aspiración automático¹⁶. Encontraron que el tiempo necesario para retirar todo el Healon y Healon GV (hialuronato sódico 1% y 1,4% respectivamente) era de 25 segundos. El tiempo de retirada de Viscoat (Chondroitin sulfato 4% y hialuronato sódico 3%) era de 3,5 minutos, debido a su adherencia a la cápsula y superficie posterior de la lente. En cualquiera de los casos encontraron que pequeñas cantidades de viscoelástico permanecían en el interior del ojo con lo que cabe la posibilidad de que el material viscoelástico retenido pueda actuar como potencial medio de cultivo que podría favorecer el crecimiento bacteriano.

Objetivo

El propósito del presente estudio consiste en probar mediante técnicas convencionales de laboratorio la viabilidad de los distintas sustancias viscoelásticas de las que se dispone en el quirófano de oftalmología del Hospital Sagrado Corazón de Barcelona como potenciales medios de cultivo para distintas cepas bacterianas que forman parte de la flora conjuntival¹⁷ y que son responsables de gran parte de los casos de infección intraocular postoperatoria¹².

Material y métodos

Se han utilizado tres cepas bacterianas reconocidas como potencialmente causantes de endoftalmitis postoperatoria:

Pseudomonas aeruginosa, ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus*, ATCC 29216 de la "American Type Culture Collection"; *Staphylococcus epidermidis* aislado del cultivo de un paciente.

En la Tabla 1 se muestra la composición, concentración, origen, peso molecular (en millones de Daltons, M) y viscosidad (en centipoises, CPS) de los preparados viscoelásticos probados en el estudio. Se comprobó la esterilidad de los viscoelásticos.

El inóculo se obtuvo a partir de una suspensión de cada una de las cepas, en Caldo Triptosa (TSB) a una concentración 0,5 de Mac Farland diluida a su vez al 1/10 000 en TSB.

Teniendo en cuenta que el objetivo de este experimento es comprobar si el viscoelástico puede actuar como medio de cultivo, hemos realizado distintas diluciones: 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64 con solución salina estéril (NaCl al 0,85%) de las sustancias viscoelásticas y del Caldo Triptosa (TSB), obteniendo una cantidad total en cada tubo de 0,5 mL, que se han inoculado con 10 μ L de cada una de las cepas bacterianas diluidas.

Todas las diluciones inoculadas fueron incubadas a 35-37°C en atmósfera aeróbica. Después de 24 horas de incubación, se sembró 1 μ L de cada dilución sobre placa de Agar de Mac Conkey para las dilucio-

nes de TSB y de viscoelástico inoculadas con *Pseudomonas aeruginosa* y sobre placa de Agar Sangre para las diluciones inoculadas con *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Tras otras 24 horas de incubación a 35-37°C en atmósfera aeróbica se realizó un recuento de colonias en cada placa, obteniendo los resultados que se expresan a continuación.

Resultados

Los resultados se expresan en las celdas de las Tablas 2, 3 y 4 en número de colonias por mililitro.

Para *Pseudomonas aeruginosa*, se ha obtenido un crecimiento en todas las diluciones, si bien a igual dilución. Ningún viscoelástico presenta más crecimiento que la misma dilución del caldo control. Las diferencias de crecimiento no son significativas y por lo tanto el comportamiento de los distintos viscoelásticos es comparable al del caldo de cultivo (Tabla 2).

Producto	Fabricante	Composición	Concentración	Origen	Peso molecular	Viscosidad
Biolon	Tedec-Meiji Farma	Hialuronato Sódico	10 mg/ml	Fermentación bacteriana biotecnológica	3 M	100.000
Biolon Prime	Tedec - Meiji Farma	Hialuronato Sódico	12 mg/ml	Fermentación bacteriana biotecnológica	3 M	250.000
Healon GV	Pharmacia and Upjohn	Hialuronato Sódico	14 mg/ml	Cresta de gallo	3,5 M	456.000
Provisc	Alcon	Hialuronato Sódico	10 mg/ml	Fermentación bacteriana	2,98 M	41.000
Viscoat	Alcon	Condrotin Sulfato Hialuronato Sódico	4% CS 3%HS	Aleta de tiburón/ Fermentación bacteriana	Menos de 0,5 M ambos compuestos	82.000

Tedec-Meiji Farma Ctra. M-300, km 30,5. 28802 Alcala De Henares. Madrid; Pfizer Inc, 235 East 2nd Street New York, NY 10017 USA; Alcon, Laboratories, Inc. P.O.Box 6600, Fort Worth, Texas 76115 U.S.A.

Tabla 1. Composición, concentración, origen, peso molecular (en millones de Daltons, M) y viscosidad (en centipoises, CPS) de los preparados viscoelásticos probados en el estudio

Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
TSB (Control)	10 ⁶					
BIOLON	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ³	10 ⁵	10 ⁵
BIOLON Pr	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ³	10 ⁵	10 ⁵
HEALON GV	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
PROVISC	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶
VISCOAT	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶

TSB: caldo triptosa

Tabla 2. *Pseudomonas aeruginosa*. Resultado en número de colonias por mililitro

Tabla 3.
***Staphylococcus aureus*.**
Resultado en número de colonias por mililitro

Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
TSB (Control)	10 ⁶	10 ²	10 ³	10 ⁶	10 ²	10 ³
BIOLON	10 ⁶	10 ³				
BIOLON Pr	10 ⁶	10 ³	10 ³	10 ²	10 ³	10 ³
HEALON GV	10 ²	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁵
PROVISC	10 ⁶	10 ³	10 ³	10 ²	10 ³	10 ³
VISCOAT	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ³	10 ³

TSB: caldo triptosa

Tabla 4.
***Staphylococcus epidermidis*.**
Resultado en número de colonias por mililitro

Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
TSB (Control)	10 ⁶	10 ⁴	10 ²	NSC	NSC	NSC
BIOLON	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC
BIOLON Pr	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC
HEALON GV	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC
PROVISC	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC
VISCOAT	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC	NSC

TSB: caldo triptosa; NSC: no se observa crecimiento

Para *Staphylococcus aureus* encontramos crecimiento en todas las diluciones de manera que el comportamiento de los distintos viscoelásticos es comparable al del caldo control. Sólo el Healon GV parece retrasar el crecimiento a diluciones bajas del viscoelástico (Tabla 3).

Para *Staphylococcus epidermidis* no obtenemos crecimiento en ninguna dilución de las sustancias viscoelásticas. En los tubos de caldo control el crecimiento sólo aparece a concentraciones altas del caldo. De estos resultados podemos concluir que *Staphylococcus epidermidis* no crece, en nuestro estudio, en ninguna de las sustancias viscoelásticas. No se observa tampoco crecimiento alguno en el cultivo control de *S. epidermidis* a altas diluciones (1/16 a 1/64) (Tabla 4 y Figura 1).

Figura 1.
Sustancia viscoelástica
junto a jeringuilla
de inyección



Discusión

Es muy probable que la entrada de gérmenes residentes en la conjuntiva durante un acto quirúrgico intraocular sea la responsable de la aparición de infecciones intraoculares postoperatorias. La aparición clínica de síntomas y signos de endoftalmitis dependerá de la bacteria y del inóculo que a su vez están influidos por diferentes factores: el grado de asepsia del saco conjuntival, circunstancias relacionadas con el paciente y su capacidad de defensa, el traumatismo inducido por la intervención, el grado de esterilización del quirófano y del instrumental y, posiblemente, la cantidad de viscoelástico que pueda dejarse en el interior de la cámara anterior o posterior y del tiempo dedicado a irrigación-aspiración una vez introducida la lente.

En nuestro estudio pretendíamos averiguar si tres especies diferentes de bacterias podían crecer en un medio conteniendo diferentes concentraciones de hialuronato sódico y condroitin sulfato.

No hemos encontrado referencias en Medline sobre estudios en los que se cultivaran *S. aureus* o *P. aeruginosa* en diluciones de hialuronato. Nuestros resultados indican que es posible su crecimiento *in vitro* en condiciones de temperatura parecidas a las de un ojo humano. *Pseudomonas aeruginosa* mantiene un crecimiento similar en todas las diluciones de todos los productos en los que se cultivó, siendo significativa su capacidad de crecimiento y resistencia. Únicamente *S. aureus* no creció tanto como en el medio control al ser incubado en concentraciones

altas¹⁻² de Healon GV. Lo cual puede sugerir que altas concentraciones de hialuronato sódico podrían inhibir su crecimiento. Por otro lado, diluciones progresivas del medio reducen su crecimiento tanto en viscoelástico como en el medio de control.

No hemos detectado crecimiento de *S. epidermidis* en ninguna de las diluciones de viscoelástico ni tampoco en las diluciones más altas del grupo control.

Tampoco hemos sido capaces de establecer ninguna asociación entre crecimiento bacteriano y peso molecular, o viscosidad del producto.

Gallenga, *et al.*¹⁸ estudiaron el crecimiento de una cepa ATCC (American Type Culture Collection 12728) en diferentes preparados con hialuronato sódico (IAL, Biolon, Healon GV, Healon). El método de incubación, las diluciones y la concentración de la preparación inicial (0,5 Mc Farland) eran idénticas a las de nuestro estudio, pero la placa de siembra era Manitol Sal Agar (medio idóneo para el cultivo de *Stafilococcus* sp) y el periodo de incubación sobre la placa fue de 48 horas. El resultado de su estudio mostró un crecimiento aumentado del germen en diluciones bajas (concentraciones altas) de la bacteria en todos los productos probados. El número de colonias disminuía significativamente en diluciones bajas, pero existía crecimiento. Sus resultados se contraponen, sin embargo, con los de Elkins, *et al.*¹⁹, que concluyó que el aumento de la concentración de hialuronidato sódico reducía la facilidad de crecimiento de las bacterias. No obstante, no pudo establecer una relación entre viscosidad y crecimiento bacteriano.

Es posible que la cepa de *S. epidermidis* no tipificada utilizada en nuestro estudio fuera más lábil que la cepa usada en el estudio de Gallenga. Dicha posibilidad debería ser investigada en otro estudio en el que se compararía el crecimiento de ambas cepas frente a diferentes diluciones de hialuronidato sódico. También podría explicarse la diferencia en el resultado atendiendo al material de siembra y el periodo de incubación usado en cada estudio.

Costagliola *et al.*, estudiaron el crecimiento *in vitro* de 30 bacterias en un medio de agar-ácido hialurónico durante un máximo de 72 horas. Se observó crecimiento únicamente de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* y *S. viridans*. Concluyeron que *stafilococos* y *streptococos* producían las enzimas necesarias para sobrevivir en un medio semejante²⁰.

Mastropasqua estudió también el crecimiento de varias bacterias en Hidroxi Propil Metilcelulosa y concluyó que el crecimiento de *C. albicans* y *P. aeruginosa* era mayor. No observó cambios en el crecimiento de *S. aureus* y constató una disminución



Figura 2.
Algunos de los viscoelásticos utilizados en el estudio

importante del crecimiento de *S. epidermidis*, *P. acnes* y *P. mirabilis*²¹ (Figura 2).

Conclusión

Se ha comprobado el crecimiento *in vitro* de *S. aureus* y *P. aeruginosa* en sustancias viscoelásticas y podría ocurrir en el ojo humano tras una intervención intraocular. El crecimiento de *S. epidermidis* no se pudo demostrar en nuestro experimento pero se ha observado en estudios publicados anteriormente. Ante esta posibilidad parece razonable conceder gran importancia a la extracción cuidadosa de todo el material viscoelástico, introduciendo, si es necesario, la punta del irrigador-aspirador por detrás de la lente intraocular, al finalizar una intervención convencional de catarata.

Bibliografía

1. HM Kattan, HW Flynn, Jr, SC Pflugfelder, C Robertson, and RK Forster. Nosocomial endophthalmitis survey. Current incidence of infection after intraocular surgery. *Ophthalmology* 1991;98:227-38.
2. Javitt JC, Street DA, Tielsch JM, Wang Q, Kolb MM, Schien O, Sommer A, Bergner M, Steinberg EP. National outcomes of cataract extraction. Retinal detachment and endophthalmitis after outpatient cataract surgery. Cataract Patient Outcomes Research Team. *Ophthalmology* 1994 Jan;101(1):100-5; discussion 106.
3. Norregaard JC, Thoning H, Bernth-Petersen P, Andersen TF, Javitt JC, Anderson GF. Risk of endophthalmitis after cataract extraction: results from the International Cataract Surgery Outcomes study. *Br J Ophthalmol* 1997 Feb; 81(2):102-6.

4. Sandvig KU, Dannevig L Postoperative endophthalmitis: establishment and results of a national registry. *J Cataract Refract Surg* 2003 Jul; 29(7):1273-80.
5. Ciulla TA, Starr MB, Masket S. Bacterial endophthalmitis prophylaxis for cataract surgery: an evidence-based update. *Ophthalmology* 2002 Jan; 109(1):13-24.
6. Srinivasan R, Tiroumal S, Kanungo R, Natarajan MK Microbial contamination of the anterior chamber during phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 2002 Dec; 28(12):2173-6.
7. Leong JK, Shah R, McCluskey PJ, Benn RA, Taylor RF. Bacterial contamination of the anterior chamber during phacoemulsification cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 2002 May; 28(5):826-33.
8. Koc F, Akcam Z, Kuruoglu S, Oge I, Gunaydin M. Does surgical technique influence cataract surgery contamination? *Eur J Ophthalmol* 2001 Jan-Mar; 11(1):31-6.
9. John T, Sims M, Hoffmann C Intraocular bacterial contamination during sutureless, small incision, single-port phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg* 2000 Dec; 26(12):1786-91.
10. Srinivasan R, Reddy RA, Rene S, Kanungo R, Natarajan MK Bacterial contamination of anterior chamber during IOL surgery. *Indian J Ophthalmol* 1999 Sep; 47(3):185-9.
11. Speaker MG, Milch FA, Shah MK, et al. Role of external bacterial flora in the pathogenesis of acute postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology* 1991; 98:639-49.
12. Results of the Endophthalmitis Vitrectomy Study. A randomized trial of immediate vitrectomy and of intravenous antibiotics for the treatment of postoperative bacterial endophthalmitis. *Endophthalmitis Vitrectomy Study Group Arch Ophthalmol* 1995 Dec; 113(12):1479-96.
13. Lawin-Brussel CA, Refojo MF, Kenyon KR In vitro adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* to surface passivated poly (methyl methacrylate) intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg* 1992 Nov; 18(6):598-601.
14. Jansen B, Hartmann C, Schumacher-Perdreau F, Peters G Late onset endophthalmitis associated with intraocular lens: a case of molecularly proved *S. epidermidis* aetiology. *Br J Ophthalmol* 1991 Jul; 75(7):440-1.
15. Mayer E, Cadman D, Ewings P, Twomey JM, Gray RH, Claridge KG, Hakin KN, Bates AK. A 10 year retrospective survey of cataract surgery and endophthalmitis in a single eye unit: injectable lenses lower the incidence of endophthalmitis. *Br J Ophthalmol* 2003 Jul; 87(7):867-9.
16. Assia EI, Apple DJ, Lim ES, Morgan RC, Tsai JC Removal of viscoelastic materials after experimental cataract surgery in vitro. *J Cataract Refract Surg* 1992 Jan; 18(1):3-6.
17. Regis P, Kowalski, Melvin I. Roat. Normal Flora of the Human Conjunctiva and Eyelid Capitulo 41. *Duane's ophthalmology*.
18. Gallenga PE, Mastropasqua L, Carpineto P, Ciancaglini M, Falconio G, Catamo G, Costagliola C, Piccolomini R. In vitro *Staphylococcus epidermidis* growth in some Viscoelastic substances containing Sodium Hyaluronate. *Ophthalmologica* 1998; 212:184-7.
19. Elkins TE, Trentham L, McNeeley SG Jr, Ling FW, Prewitt J, Homsey CA, Malinak LR Potential for in vitro growth of common bacteria in solutions of 32% dextran 70 and 1.0% sodium carboxymethylcellulose. *Fertil Steril* 1985 Mar; 43(3):477-
20. Costagliola C, Del Prete A, Winkler NR, Carpineto P, Ciancaglini M, Piccolomini R, Mastropasqua L: The ability of bacteria to use Na-hyaluronate as a nutrient. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 1996; 74:566-8.
21. Mastropasqua L, Piccolomini R, Carpineto P, Ciancaglini M, Falconio G, Di Bonaventura G, Costagliola C, Gallenga PE: In vitro viability of external eye microbial flora in Hydroxy-Propyl- Methylcellulose. *Ophthalmologica* 1999; 213:265-8.