



ARTÍCULO ORIGINAL

Establecimiento de una reacción en cadena de la polimerasa para la detección de bacterias y hongos



Héctor Javier Pérez-Cano*

Centro de Investigación Biomédica, Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P., México D.F., México

Recibido el 20 de agosto de 2013; aceptado el 12 de diciembre de 2013

Disponible en Internet el 2 de abril de 2014

PALABRAS CLAVE

Reacción en cadena de la polimerasa;
Reacción en cadena de la polimerasa anidada;
Conjuntivitis bacteriana;
Queratitis bacteriana;
Queratitis fúngica;
Lentes de contacto

Resumen Los métodos de laboratorio utilizados para el diagnóstico de blefaritis, conjuntivitis y queratitis incluyen desde exámenes en fresco para búsqueda de parásitos, tinciones hasta cultivos microbiológicos que pueden durar hasta 2 semanas para obtener el resultado.

Objetivo: Implementar una PCR para la detección de hongos y bacterias grampositivas y gramnegativas utilizando un método reportado previamente y adaptado a las condiciones del laboratorio de biología molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P. (CIB-HOL) utilizando el termociclador Axygen/Maxygene.

Métodos: Se realizó una extracción de ADN de cultivos microbiológicos de bacterias grampositivas, gramnegativas y hongos. Se hicieron diluciones seriadas para determinar la sensibilidad del método. Se realizó PCR para hongos y bacterias. Se buscaron las condiciones en común para realizar la PCR en un solo paso.

Resultados: Utilizando las diluciones del ADN se obtuvo producto de amplificación utilizando una cantidad de 0.12 ng de ADN bacteriano y de 0.15 ng de ADN fúngico.

Conclusiones: La técnica de la PCR es una herramienta muy importante para la detección de ADN de bacterias y hongos causantes de infecciones oculares. Permite amplificar el material genético del agente etiológico y facilita su observación, obteniéndose los resultados en menor tiempo que con las técnicas convencionales.

© 2013 Sociedad Mexicana de Oftalmología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia: Centro de Investigación Biomédica, Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P., Ezequiel Montes n.º 135, Col. Tabacalera, Del. Cuauhtémoc, C.P. 06030, México, D.F.

Correo electrónico: drhectorpc@gmail.com

KEYWORDS

Polymerase chain reaction;
Nest polymerase chain reaction;
Bacterial conjunctivitis;
Bacterial keratitis;
Fungal keratitis;
Contact lens

Establishment of a polymerase chain reaction for detection of bacteria and fungi. Importance for the diagnosis of ocular infectious diseases

Abstract Laboratory methods used for the diagnosis of blepharitis, conjunctivitis and keratitis ranging from fresh examinations to search for parasites, gram stain and microbiological cultures, can last up to two weeks to get the result.

Objective: To implement a PCR for the detection of fungi and gram-positive and gram-negative bacteria using a previously reported method adapted to the molecular biology lab at Biomedical Research Center, Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P. (CIB-HOL), using the thermocycler Axygen/Maxygene.

Methods: DNA from microbial cultures of Gram positive, Gram negative and fungi were obtained for the PCR. Serial dilutions were performed to determine the sensitivity of the method. PCR was performed for fungi and bacteria. We searched for common conditions for PCR in one step
Results: When we used dilutions of DNA, the PCR was sensitive to 0.12 ng to DNA bacterial and 0.15 ng to DNA fungal.

Conclusions: The PCR technique is a very important molecular biology tool to detect DNA from bacteria and fungi responsible of the ocular infections. This method allows amplifying the genetic material of the etiologic agent and the results are obtained in less time than using conventional techniques.

© 2013 Sociedad Mexicana de Oftalmología. Published by Masson Doyma México S.A. All rights reserved.

Introducción

El ojo es el órgano responsable de la captación de la luz, que es el proceso inicial de la visión, y por su posición anatómica está constantemente expuesto a una variedad de patógenos. Sin embargo, cuenta con un sistema de producción de sustancias, entre ellas la lágrima que contiene una gran cantidad de compuestos químicos, como citocinas, enzimas, lípidos y electrólitos capaces de formar una barrera inmunológica para detener cualquier microorganismo que pudiera generar una infección¹. El origen de una infección ocular puede ser producto de un trauma, cirugía, uso de lentes de contacto y otras enfermedades en las cuales el sistema inmunológico se encuentra comprometido, facilitando el desarrollo de los agentes causales. Las infecciones oculares son producidas por bacterias, hongos, virus o parásitos. Existen muchos tipos de infecciones oculares, y entre las más comunes podemos mencionar la conjuntivitis, la queratitis y la blefaritis o inflamación crónica de los párpados, mayoritariamente producida por estafilococos²⁻⁴.

Las infecciones oculares son una causa importante de morbilidad ocular en todo el mundo, con potencial riesgo de pérdida de la visión e incluso de la integridad ocular. La severidad depende tanto de las condiciones subyacentes del paciente como de la patogenicidad del agente infeccioso^{3,5}. La conjuntivitis bacteriana, por ejemplo, se caracteriza por hiperemia conjuntival de inicio unilateral rápido acompañado de edema palpebral y secreción mucopurulenta. La infección a menudo se vuelve bilateral a los 2 días del inicio del padecimiento. Su incidencia es difícil de determinar debido a que la mayor parte de los pacientes no acuden a la ayuda profesional y se tratan empíricamente, lo que en ocasiones puede agravar la dolencia^{2,5}. Otro padecimiento importante que pone en riesgo la salud visual es la queratitis asociada al uso de lentes de contacto. Existen reportes en los que se señala que la incidencia

es de 30 a 60 por 10,000 ojos al año, o 1:200 a 1:500 usuarios por año⁵. Las bacterias que con mayor frecuencia producen queratitis asociada al uso de lentes de contacto son los bacilos gramnegativos, principalmente *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) y *Serratia marcescens*, aunque también puede estar involucrado *Proteus vulgaris* o *Proteus mirabilis*, así como bacterias grampositivas, entre ellas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (*S. epidermidis*), incluso levaduras del género *Candida* y amebas del género *Acanthamoeba* y en menor frecuencia los hongos filamentosos. La incidencia de queratitis en usuarios de lentes de contacto es muy baja, pero ocasionalmente los microorganismos pueden ser hallados en las soluciones y/o en los mismos lentes⁵⁻⁹.

Las cirugías oculares que involucran a la córnea tienen un cierto riesgo de infección por microorganismos que normalmente habitan en la superficie ocular. Se ha reportado que los microorganismos aislados con mayor frecuencia son bacterias grampositivas ocupando el primer lugar en frecuencia *S. epidermidis*, que proviene de la flora habitual de la superficie ocular^{5,10,11}.

Existen otras enfermedades que están relacionadas con el riesgo de infección ocular. Entre las enfermedades que involucran la alteración del epitelio corneal podemos mencionar las enfermedades autoinmunes como la orbitopatía tiroidea, el síndrome de Sjögren y el penfigoide, entre otras. Las enfermedades sistémicas como la diabetes mellitus, las collagenopatías, el síndrome metabólico o los padecimientos que involucran un sistema de inmunosupresión también predisponen al desarrollo de queratitis infecciosa debido a la disminución de la defensa humoral y/o celular^{5,12-14}.

En general, los microorganismos que han sido implicados como agentes causales de conjuntivitis, blefaritis y queratitis infecciosa son de origen bacteriano, predominando los grampositivos⁵. Los hongos representan alrededor del 5-30%

de los casos, y con respecto a los parásitos, los porcentajes reportados son menores y se les atribuye un 1-15%. El parásito más común que provoca blefaritis es *Demodex folliculorum* mientras que la queratitis parasitaria está asociada con *Acanthamoeba* sp.^{5,15,16}.

Los métodos de laboratorio utilizados para el diagnóstico de blefaritis, conjuntivitis y queratitis incluyen desde exámenes en fresco para búsqueda de parásitos y tinciones hasta cultivos microbiológicos que pueden durar hasta 2 semanas para obtener el resultado^{17,18}. La presencia de microorganismos puede estar en cantidades muy pequeñas y esto depende de la presentación clínica de la infección; por ejemplo, se pueden presentar desde abscesos corneales francos hasta formas más indolentes como la queratopatía cristalina en la que se puede encontrar un infiltrado intraestromal pero con una mínima respuesta inflamatoria y muestra insuficiente para realizar la microbiología clásica¹⁹⁻²³. Debido a esto, se han desarrollado métodos de biología molecular para el diagnóstico microbiológico²⁴⁻²⁶. Se ha utilizado la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) directa para virus, bacterias, hongos y parásitos; PCR anidada para identificación de bacterias; y PCR en tiempo real para todo tipo de microorganismos²⁷⁻³¹.

En el año 2000 Jaegger et al. y Carrol et al. describieron un método por PCR, para la detección de hongos y bacterias respectivamente, en muestras de fluidos oculares^{32,33}. Estos trabajos reportan una alta sensibilidad del método, algo muy importante en el diagnóstico de microbiología ocular debido a la escasa cantidad de material biológico que se puede obtener en una toma de muestra oftálmica, sin embargo, es necesario que cada laboratorio estandarice las condiciones de trabajo para la obtención de resultados satisfactorios. El objetivo del presente trabajo fue reproducir estas técnicas para la detección de hongos y bacterias obteniendo las condiciones adecuadas para hacerlo en un solo programa utilizando las mismas condiciones para la detección tanto de bacterias como de hongos; esto acortaría el tiempo de obtención de resultados que beneficiaría al paciente para obtener un resultado rápido y confiable. El trabajo se realizó en el laboratorio de biología molecular del Centro de Investigación Biomédica de La Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P. (CIB-HOL).

Material y métodos

Se obtuvieron muestras de cultivos microbiológicos de bacterias grampositivas (*S. epidermidis*), gramnegativas (*P. aeruginosa*) y hongos (*Candida* sp.) caracterizados previamente por observación microscópica, macroscópica y utilizando el sistema automatizado VITEK 2C (Laboratorio BioMerieux, Francia). Se realizó extracción de ADN utilizando un kit comercial (Puregene, Qiagen. Maryland, EE. UU.). La cuantificación del material genético se obtuvo por espectrofotometría utilizando el equipo NanoDrop 2000, Thermo Scientific. La PCR para hongos se llevó a cabo usando los oligonucleótidos 5'-CAGGGGAGGTAGTACAATAA-3' y 5'-ACAAATCACTCCACCAACTAAG-3' utilizando una temperatura de alineamiento (Tm) de 59°C; para la PCR de bacterias se utilizaron los oligonucleótidos 5'-TTGGAGAG-TTTGATCCTGGCTC-3' y 5'-ACGTCATCCCCACCTTCTC-3' con una Tm de 56°C. Para la PCR anidada se emplearon

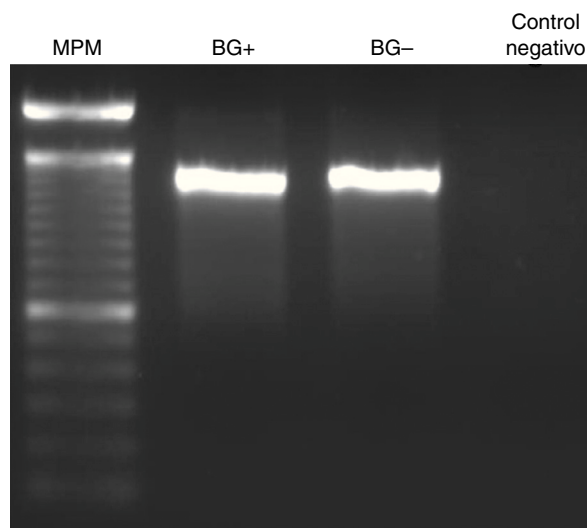


Figura 1 Gel de agarosa al 1.5% muestra el producto de PCR de bacterias grampositivas (BG+) y gramnegativas (BG-) de aproximadamente 1,300 pb. MPM: marcador de peso molecular.

los oligonucleótidos 5'-GGCGGCAKGCCTAAYACATGC-3', 5'-GACGACAGCCATGCASCACCTG 3' y 5'-GCGRCTCTGG-TCTGA-3' con Tm de 61.4°C. El programa de PCR en el termociclador Axygen/Maxygene para hongos y bacterias fue: 95°C/15 min, después 35 ciclos con las temperaturas 94°C/1 min Tm/1 min, 72°C/1 min; finalmente una temperatura de elongación de 72°C/10 min. Se realizó una PCR en gradiente de temperatura para obtener una Tm en común, de tal forma que fuera posible obtener en un solo programa las condiciones necesarias para la detección de hongos y bacterias, optimizando el método y acortando el tiempo de obtención de los resultados. Se realizaron diluciones seriadas 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000 para determinar la sensibilidad del método.

Para la PCR anidada se utilizaron los productos de amplificación obtenidos de la PCR para bacterias; las condiciones fueron: 95°C/10 min, después 32 ciclos con las temperaturas 94°C/30s, 61.4/1 min, 72°C/30s y finalmente una temperatura de elongación de 72°C/3 min. Todos los productos de PCR se identificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% utilizando las condiciones de 90 V durante 40 min y Gelred 10X para visualizarlo en un transiluminador UVP BioLite, con luz UV a 302 nm.

Resultados

De la suspensión bacteriana, la concentración de ADN obtenido fue de 4 ng/μl, mientras que para el ADN fúngico fue de 5 ng/μl; para la PCR se utilizaron 3 μl (12 ng) de ADN bacteriano y 3 μl (15 ng) de ADN fúngico. Se obtuvieron resultados satisfactorios utilizando la Tm reportada para cada PCR. El producto de PCR para bacterias fue de aproximadamente 1,300 pb, y el programa en el termociclador tuvo una duración de 3 h y 20 min (fig. 1). Para la PCR de hongos se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 700 pb y el tiempo del programa de corrida de la PCR en el termociclador fue de 3 h y 20 min (fig. 2). En la PCR en gradiente de temperatura, para realizar la PCR de hongos y

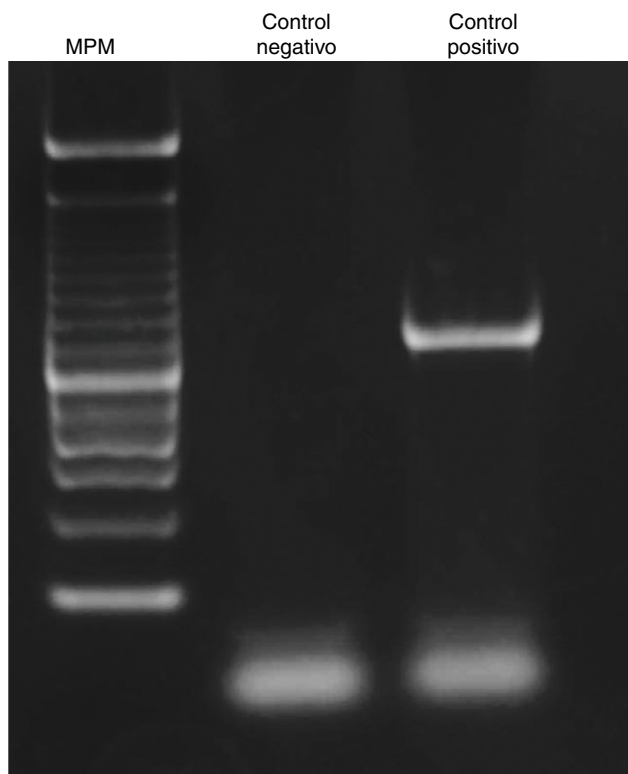


Figura 2 Gel de agarosa al 1.5% muestra el producto de PCR de hongos de aproximadamente 700 pb. MPM: marcador de peso molecular.

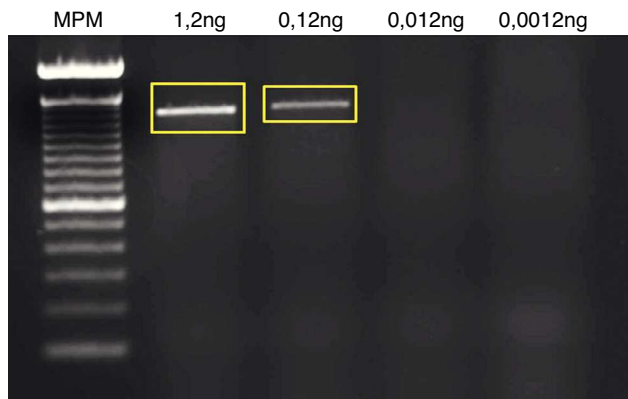


Figura 3 Gel de agarosa al 1.5% muestra el producto de PCR de bacterias utilizando diferentes cantidades de ADN. La reacción fue positiva hasta 0.12 ng de ADN bacteriano.

bacterias en una sola ejecución, las mejores condiciones fueron: 95 °C/10 min, 35 ciclos con las temperaturas 94 °C/1 min 56 °C/1 min, 72 °C/1 min y finalmente una temperatura de elongación de 72 °C/7 min con una duración de ejecución de 3 h y 10 min. Con la Tm de 56 °C se pudo amplificar tanto el ADN fúngico como el bacteriano.

Utilizando este programa, se realizó PCR de bacterias y hongos usando diluciones del ADN respectivo y se obtuvo producto de amplificación utilizando una cantidad de hasta 0.12 ng de ADN bacteriano (fig. 3) y 0.15 ng de ADN fúngico (fig. 4).

Finalmente, en la PCR anidada se obtuvo una sola banda de aproximadamente 1,000 pb para bacterias gramnegativas y 2 bandas para bacterias grampositivas, la primera de aproximadamente 1,050 pb y la segunda de alrededor de 400 pb (fig. 5).

Discusión e interpretación de resultados

La PCR es un método de biología molecular que permite amplificar el material genético de tal forma que una pequeña porción de ADN es suficiente para detectar la presencia de bacterias y hongos. En una muestra obtenida por raspado palpebral se obtiene una cantidad de 3 a 6 ng/μl de ADN compuesto de una mezcla donde el mayor porcentaje proviene de las células del sujeto, mientras que en un raspado corneal la cantidad de ADN que se obtiene es menor, de 1 a 3 ng/μl. En un paciente con infección ocular la cantidad de ADN obtenida sigue siendo la misma, pero el porcentaje de ADN proveniente de los microorganismos aumenta debido a la proliferación de los mismos en el sitio de la lesión, lo que hace posible su detección por PCR; utilizando los oligonucleótidos adecuados podemos amplificar e identificar si se trata de un hongo o una bacteria y, en caso de detectar un amplificado correspondiente a material genético bacteriano, es posible identificar si se trata de una bacteria grampositiva o gramnegativa usando la PCR anidada. Utilizando como base los trabajos de Jaegger et al. y Carrol et al.^{32,33} hemos logrado acortar el tiempo de duración de la PCR, obteniendo resultados en una sola ejecución utilizando una Tm en común para la detección de hongos y bacterias; esto es muy importante para el diagnóstico puesto que es un apoyo para la terapéutica oportuna y el restablecimiento de la salud del paciente.

Conclusiones

Las pruebas de microbiología comúnmente utilizadas pueden tardar de una a 2 semanas para obtener el resultado de apoyo al diagnóstico oftalmológico, en cambio, utilizando

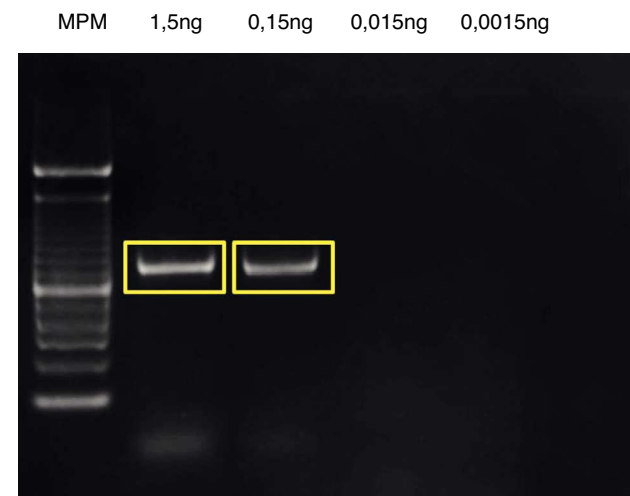


Figura 4 Gel de agarosa al 1.5% muestra el producto de PCR de hongos utilizando diferentes cantidades de ADN. La reacción fue positiva hasta 0.15 ng de ADN fúngico.

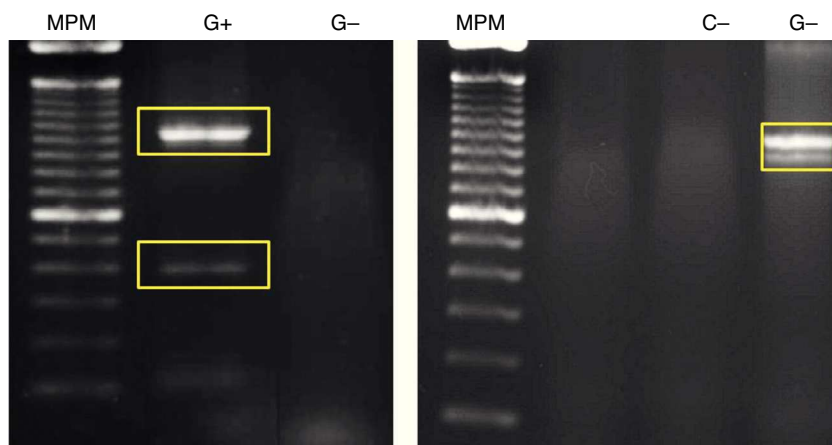


Figura 5 Gel de agarosa al 1.5% de la PCR anidada. En el gel 1 (panel izquierdo) se observan 2 bandas de amplificación que corresponden a bacterias grampositivas (G+). En el gel 2 (panel derecho) se observa una sola banda de amplificación que corresponde a bacterias gramnegativas (G-). La PCR se ejecutó con un control negativo (C-).

técnicas de biología molecular podemos acortar ese tiempo lo cual es benéfico para el paciente que sufre de un evento clínico infeccioso pues para llevar a cabo un tratamiento eficaz y oportuno es necesario encontrar la causa. La técnica de PCR es una herramienta muy importante para la detección de ADN de bacterias grampositivas, gramnegativas y hongos causantes de infecciones oftalmológicas. Permite amplificar el material genético del agente etiológico y facilita su observación, obteniéndose los resultados en menor tiempo que utilizando las técnicas convencionales. Jaegger et al. y Carrol et al. fueron los pioneros en el desarrollo de una técnica de biología molecular para la detección de hongos y bacterias en fluidos oculares. Es muy importante que cada laboratorio establezca sus propias condiciones de trabajo y que se verifique tanto la reproducibilidad como la sensibilidad del método. En este trabajo pudimos establecer la PCR para la detección de bacterias y hongos utilizando una Tm en común que evita hacer 2 ejecuciones y acortar el tiempo en la obtención de resultados, optimizando la técnica ya reportada.

Financiamiento

Los autores no recibieron patrocinio para llevar a cabo este artículo.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos

Al Dr. Víctor Bautista de Lucio por la donación de material biológico.

A la Fundación Nacional Monte de Piedad.

Bibliografía

- Forrester JV, Xu H. Good news-bad news: The Yin and Yang of immune privilege in the eye. *Front Immunol.* 2012;3:1-18.
- Epling J. Bacterial conjunctivitis. *Clin Evid (Online).* 2010;03:704.
- Passos RM, Cariello AJ, Yu MC, et al. Microbial keratitis in the elderly: A 32 year review. *Arq Bras Oftalmol.* 2010;73:315-9.
- Pinna A, Zanetti S, Sotgiu M, et al. Identification and antibiotic susceptibility of coagulase negative staphylococci isolated in corneal/external infections. *Br J Ophthalmol.* 1999;83:771-3.
- Nicola F. Queratitis infecciosa no viral: factores predisponentes, agentes etiológicos y diagnóstico de laboratorio. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37:229-39.
- Dutta D, Cole N, Willcox M. Factors influencing bacterial adhesion to contact lenses. *Mol Vis.* 2012;18:14-21.
- Castiblanco D, Rodriguez MF, Mayrga CM. Bacilos gram negativos, contaminantes más prevalentes en lentes de contacto. *Cienc Tecl Sal Vis Oc.* 2007;9:57-66.
- Siddiqui R, Khan NA. Biology and pathogenesis of Acanthamoeba. *Parasit Vectors.* 2012;10:1-13.
- Verghese S. Post traumatic fungal keratitis caused by *Acremonium recifei*. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010;53:587-8.
- Tanuj D, Mayank S, Namrata S, et al. Hyeropic shift after LASIK induced diffuse lamellar keratitis. *Ophthalmology.* 2006;6:19.
- Wilson SE, Ambrosio Jr R. Sporadic diffuse lamellar keratitis (DLK) after LASIK. *Cornea.* 2002;21:560-3.
- Pérez-Moreiras JV, Coloma-Bockos JE, Prada-Sanchez MC. Orbitopatía tiroidea (fisiopatología, diagnóstico y tratamiento. *Arch Soc Esp Ophthalmol.* 2003;78:407-31.
- Juri MC, Fernandez-Romero DS, Devoto MH, et al. Tratamiento sistémico del penfigoide cicatrizal ocular. *Medicina (B Aires).* 2012;72:103-8.
- Snow M. Una ojeada a la queratitis infecciosa. *Nursing.* 2008;26:51-2.
- Tewari A, Sood N, Vegad MM, et al. Epidemiological and microbiological profile of infective keratitis in Ahmedabad. *Indian J Ophthalmol.* 2012;60:267-72.
- Meyer-Rüsenberg B, Loderstädt U, Richard G, et al. Epidemic keratoconjunctivitis: The current situation and recommendations for prevention and treatment. *Dtsch Arztebl Int.* 2011;108:475-80.
- Oklík WK, Willett HP, Amos DB, et al., editores. *Zinsser microbiología.* 20.ª ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 1994.

18. Biswas BB, Basu PS, Pal MK. Gram staining and its molecular mechanism. *Int Rev Cytol.* 1970;29:1–27.
19. Wilhelmus KR, Robinson NM. Infectious crystalline keratopathy caused by *Candida albicans*. *Am J Ophthalmol.* 1991;112:322–5.
20. Groden LR, Pascucci SE, Brinser JH. *Haemophilus aphrophilus* as a cause of crystalline keratopathy. *Am J Ophthalmol.* 1987;104:89–90.
21. Touzeau O, Bourcier T, Borderie VM, et al. Recurrent infectious crystalline keratopathy caused by different organisms in two successive corneal grafts in the same patient. *Br J Ophthalmol.* 2003;8:1053.
22. Reiss GR, Campbell RJ, Bourne WN. Infectious crystalline keratopathy. *Surv Ophthalmol.* 1986;31:69–72.
23. Tang YW, Procop GW, Persing DH. Molecular diagnostics of infectious diseases. *Clin Chem.* 1997;43:2021–38.
24. Guzman DA. Importancia del laboratorio en el diagnóstico de las micosis invasoras. *Rev Chil Infect.* 2004;21:39–47.
25. Matthews RC, Burnie JP. Clinical applications of molecular biology to diagnostic microbiology. *J Clin Pathol.* 1992;45:465–7.
26. Lee SE, Hong SH, Lee SH, et al. Detection of ocular *Toxoplasma gondii* infection in chronic irregular recurrent uveitis by PCR. *Korean J Parasitol.* 2012;50:229–31.
27. Goldschmidt P, Degorge S, Che Sarría P, et al. New strategy for rapid diagnosis and characterization of fungal infections: The sample of corneal scrapings. *PLoS One.* 2012;7:e37660.
28. Sharma S. Diagnosis of infectious diseases of the eye. *Eye (Lond).* 2012;26:177–84.
29. Bispo PJ, Höfling-Lima AL, Pignatari AC. Molecular biology applied to the laboratory diagnosis of bacterial endophthalmitis. *Arq Bras Oftalmol.* 2009;72:734–40.
30. Kamimura A, Takata MI, Fernandes AC, et al. Molecular detection of herpes simplex by polymerase chain reaction in patients with typical and atypical herpetic keratitis. *Arq Bras Oftalmol.* 2008;71:827–30.
31. Gupta N, Tandon R. Investigative modalities in infectious keratitis. *Indian J Ophthalmol.* 2008;56:209–13.
32. Jaeger EE, Carrol NM, Choudhury S, et al. Rapid detection and identification of *Candida*, *Aspergillus* and *Fusarium* species in ocular samples using nested PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2902–8.
33. Carrol NM, Jaeger EE, Choudhury S, et al. Detection of and discrimination between gram-positive and gram-negative bacteria in intraocular samples by using nested PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:1753–7.