

Técnicas de biología molecular para detección del Herpes Simplex virus-1 en pacientes con queratitis herpética

Dra., M en C. Alejandra Sánchez-Navarro Palazuelos*, Dr. Raúl Suárez Sánchez *, DC Rubén López-Revilla**,
DC Juan Carlos Cancino ***, DC Miguel Ángel Reyes López ***

RESUMEN

Objetivo: Detectar el genoma y antígenos del Herpes Simplex Virus-1 en muestras oculares de pacientes con queratitis herpética.

Método: Se analizaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR genoma) y ELISA (HERPCHEK antígenos), muestras de lágrima y raspado corneal de pacientes con diagnóstico clínico de queratitis herpética epitelial o estromal.

Resultados: Incluimos 41 pacientes con diagnóstico de queratitis herpética y 5 controles sanos. Detectamos presencia de antígenos y genoma del HSV en 100% de casos con queratitis herpética epitelial (9 casos), en estromales (20 casos) no se detectó el DNA, a excepción de un caso de estromal necrotizante donde la muestra de lágrima y raspado de córnea presentaron sólo genoma. Doce pacientes se clasificaron como queratitis herpéticas dudosas, 10 presentaban actividad inflamatoria y sólo en 40% de ellos se detectó genoma y antígenos del Herpes Simplex Virus.

Conclusiones: En caso de sospecha de queratitis herpética epitelial con actividad inflamatoria sugerimos confirmar la presencia del HSV-1 mediante PCR, debido a mayor sensibilidad y rapidez en comparación con el ELISA. Sugerimos correlacionar los resultados encontrados por ELISA y PCR con el posible estado de replicación del virus como guía para tratamiento. En queratitis estromal sin datos de actividad no se logró detectar el genoma o los antígenos del virus.

Palabras clave: Queratitis herpética epitelial, queratitis herpética estromal, reacción en cadena de la polimerasa y HERPCHEK

SUMMARY

Objective: To detect the genome and Herpes Simplex virus-1 antigens in ocular samples of patients with herpetic keratitis. **Materials and methods:** We analyzed by polymerase chain reaction (PCR-genome) and ELISA (HERPCHEK to detect capsid antibodies) tear and corneal samples from patients with epithelial or stromal herpetic keratitis.

Results: We included 41 patients with the presuntive diagnosis of ocular herpetic disease and 5 controls without herpes. We detected the presence of genome and antigens of HSV in 100% of cases with epithelial keratitis (9 patients), there was a complete absence of HSV genome and antigens in all samples of stromal keratitis, except in one case with the diagnosis of necrotizing stromal keratitis we found the genome. 12 patients were classified as doubtful herpetic keratitis and we detected the HSV in 40% of cases with active inflammation.

Conclusions: In epithelial herpetic keratitis, we suggest that the presence of Herpes Simplex-1 be confirmed with PCR, given the superior sensitivity and practical approach when compared to the antigenic immunologic reaction. Also correlate the results of the PCR and ELISA with the replicative state of the virus. In the inactive stromal keratitis cases, neither the viral genome nor the antigens against the virus were detected.

Key words: Herpes Simplex virus-1, herpetic keratitis, PCR, HERPCHEK.

* Servicio de Córnea y Cirugía Refractiva del Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana". Chimalpopoca 14, Colonia Obrera CP.06800 México, D.F. Email: Pakika@hotmail.com . Teléfono 55-88-46-00 y 55-43-94-53

** Laboratorio de Genética y Biología celular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Departamento de Biología Molecular de IPICYT.

*** Investigador adjunto del departamento de microbiología molecular del Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana.

INTRODUCCIÓN

El HSV-1 pertenece a la familia Herpesviridae, y los humanos son el único hospedero y reservorio natural del virus (1, 2). El primer contacto ocurre entre los 6 meses y los 5 años de edad y es subclínico en 90% de los casos (3-5). Liesegang y colaboradores reportaron, en el estudio comunitario del herpes simple ocular realizado en Minnesota, EUA, que el primer cuadro de herpes ocular aparece en promedio en la tercera década de la vida y menos de 50% presenta antecedentes patológicos de enfermedad ocular herpética previa (6-9).

En los casos recurrentes, la primera estructura ocular involucrada es la superficie corneal lo que produce una queratitis (principal causa de ceguera infecciosa en los países desarrollados), seguido de conjuntiva y párpados. El riesgo de recurrencia después del primer episodio de herpes ocular es, a un año, de 10%, a dos años de 23% y a 10 años de 50% (10, 11).

La infección ocular recurrente es causada por la reactivación del herpes en el ganglio trigeminal, para viajar por sus terminaciones nerviosas hasta el epitelio corneal en donde establece un patrón de replicación activa y produce un cuadro de queratitis de tipo epitelial o estromal, lo que representa una de las enfermedades más desafiantes desde el punto de vista del diagnóstico y tratamiento (6, 7).

Holland estableció la clasificación de la queratitis herpética basada en su anatomía y fisiopatología en cuatro categorías (8).

La primera incluye la afección del epitelio corneal de donde destacan la úlcera dendrítica y geográfica, las cuales pueden ser confundidas clínicamente con lesiones pseudo-dendríticas causadas por abrasiones corneales, herpes zoster, acanthamoeba o úlceras bacterianas.

La segunda categoría engloba las alteraciones del estroma corneal (48% son producto de la recurrencia), el cual puede afectarse de manera primaria en el caso de la queratitis necrotizante y la inmune o de manera secundaria como secuela de una queratitis epitelial o queratopatía neurotrófica (8, 9).

La queratitis estromal necrotizante (QEN) resulta de la invasión directa del estroma por el virus y simula una queratitis bacteriana severa (10, 11). La queratitis estromal inmune ocurre en 20% de los casos recurrentes; se cree es una reacción de hipersensibilidad retardada ante antígenos herpéticos retenidos en el estroma, lo que conlleva a inflamación constante de bajo grado, que progresa a cicatrización y neovascularización estromal.

La fuente de los antígenos ha sido debatida, se han hecho estudios de los infiltrados estromales en busca de su origen. Con microscopía electrónica se han observado partículas virales, incompletas o dañadas, en estos depósitos (11). Sin embargo, el virus usualmente no se recupera directamente de homogenizados corneales.

Otro subtipo de queratitis estromal, es la endotelitis o queratitis disciforme, producto de una reacción inflamatoria a nivel del endotelio que resulta en su descompensación y edema corneal permanente. El mecanismo etiopatogénico es similar al anterior, una reacción inmunológica en contra de antígenos retenidos en el estroma aunque el papel del virus vivo como causa de la infección no se descarta (8-13).

Se ha observado que en muchas ocasiones la enfermedad ocular herpética puede compartir datos clínicos similares a los de otras enfermedades oculares de causa infecciosa y la clínica resulta ser insuficiente para la confirmación del diagnóstico o conocer el estado de replicación viral.

Esta confusión en el diagnóstico clínico nos lleva a la búsqueda de herramientas alternativas. Actualmente, el método estándar utilizado para la confirmación de la presencia del HSV en todas estas lesiones que no han sido tratadas, es el aislamiento de los viriones en cultivo de tejido, donde el efecto citopático confirma la presencia del virus, pero los resultados se obtienen en 2 o 5 días después de haber realizado el inóculo (3, 4).

Por otra parte, existen nuevas herramientas de biología molecular que han demostrado ser más sensibles, rápidas, específicas y baratas en comparación con el cultivo celular. No requieren de células intactas o partículas virales viables para su detección como es el caso del inmunoensayo enzimático (disponible en un "kit" comercial llamado HERPCHEK) o la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), lo que las hace ideales para ser empleadas en la práctica clínica (14-19).

Con lo anterior, creemos que la prueba de PCR asociada con la de ELISA pueden determinar la presencia o ausencia del HSV-1 y saber si está en fase activa o no de replicación.

Los objetivos del estudio fueron, entre otros, detectar la presencia de antígenos (ELISA) y del genoma (PCR) del HSV-1 en muestras oculares de pacientes con sospecha de queratitis herpética epitelial o estromal, correlacionar los resultados encontrados en el laboratorio y en la clínica para determinar el posible estado de replicación viral y comparar la utilidad de la lágrima como el del raspado corneal para lograr nuestro objetivo.

Se incluyeron pacientes del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana con sospecha clínica de queratitis herpética epitelial o estromal que no estuvieran recibiendo tratamiento con antivirales. Se excluyeron pacientes poco cooperadores, así como pacientes con diagnóstico comprobado de queratitis de otras etiologías como bacterianas o inmunes.

MÉTODO

Estudio prospectivo, longitudinal y experimental, aprobado por el Comité de Investigación del "Instituto de Oftalmología Fundación Conde de Valenciana". Incluimos 46 pacientes y se clasificaron de la siguiente manera: 5 controles negativos, libres de herpes ocular, 9 con queratitis epitelial, todos con datos de actividad inflamatoria (úlceras dendríticas o geográficas), 20 se catalogaron como estromales (disciforme o intersticial), sólo un paciente presentaba una necrotizante con actividad importante y 12 fueron sospechosos de herpes epitelial o corneal, de los cuales 10 presentaban inflamación.

Se recolectaron muestras de lágrima (capilares) y/o raspado corneal (espátula de Kimura) en los pacientes con diagnóstico de queratitis herpética epitelial y estromal (se tomó el botón corneal en caso de haberse transplantado) y se almacenaron a 4°C hasta su utilización para PCR o ELISA según el caso.

PCR: Reacción de polimerización en cadena

Previo extracción de DNA (QIAamp DNA mini Kit), se procedió a realizar la técnica de PCR utilizando dos pares de iniciadores en busca del gen de la Timidina Cinasa del HSV-1. Uno denominado "universal" con la secuencia 5'-TTA TTG CCG TCA TAG CGC GG-3' y 5'-GGC GAC CTG TAT AAC GTG TT-3', que proporciona un producto de 272pb y el otro denominado "específico" con la secuencia 5'- AAT CGC GAA CAT CTA CAC CAC-3' y 5'- AAA GCT GTC CCC AAT CCT CCC-3', que da un producto de 500pb. Todas las reacciones se procesaron en regulador 1X del PCR (Tris-HC 10mM, pH 8.3, KCl 50 mM) conteniendo 1 µL de cada iniciador (20 µg/µL), 1 µL de la solución «stock» de los 4 dNTP's (10 mM), 1.5 µL de MgCl₂ (25 µM), 0.3 µL de Taq DNA polimerasa recombinante (Life Technologies) en un volumen total de 25 µL.

Se llevaron a cabo los siguientes ciclos de reacción para amplificar la secuencia denominada "universal": 94°C por 5 min., 40 ciclos de 94°C por 30 seg., 56.5°C por 30 seg., 72°C por 1 min. y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Para la secuencia "específica" se realizaron ciclos de: 94°C por 5 min., 40 ciclos de 95°C por 30 seg., 62°C por 1 min., 72°C por 30 seg, una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de reacción se cargaron en un gel de agarosa al 3% para llevar a cabo la electroforesis con un poder de 100V por 30 minutos.

ELISA: Prueba para la detección de antígenos de HSV

Es una prueba directa para la detección en general de antígenos de HSV, se basa en un anticuerpo policlonal de conejo anti-HSV para la captura de antígenos de HSV, contenidos en la muestra clínica. Una vez inmovilizado el antígeno se coloca un segundo anticuerpo monoclonal biotinilado de ratón. La cantidad de anticuerpo biotinilado unido al antígeno se mide por la reacción que se presenta al unirlo con el complejo de peroxidasa de rábano-estreptavidina, que cataliza la conversión de un sustrato cromogénico en un producto que produce color, el cual es leído en un espectrofotómetro con un filtro de referencia de 620 nm con una sensibilidad de 95.6%.

RESULTADOS

PCR: Reacción de polimerización en cadena

Como control positivo se empleó el DNA de la cepa McIntire de HSV-1. Como control negativo se utilizó una reacción con únicamente los reactivos necesarios para el PCR, excepto DNA molde. Se estandarizó la técnica de PCR universal y específica (figura 1), y se compararon los resultados de los controles contra muestras de DNA obtenidas de bacterias, plasma humano y lágrima y córnea de pacientes sanos (figura 2).

Tanto la PCR denominada "Universal" como la "Específica" lograron la detección del genoma del HSV-1 en las mismas muestras, en los casos de queratitis epitelial se detectó el genoma en 100% de las muestras de raspado corneal y en 73.21% de lágrima.

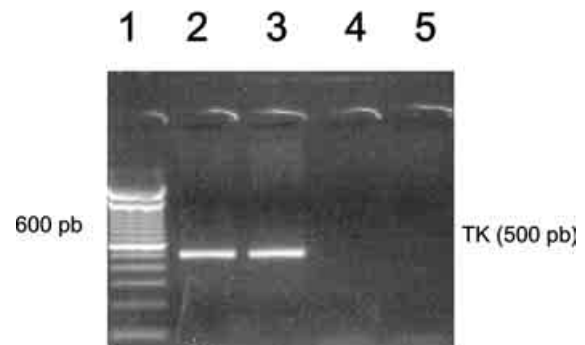


Fig. 1. Reacción de PCR para la secuencia denominada específica de HSV-1. Electroforesis de los productos de amplificación. (1) Marcador de peso molecular de 100pb. (2,3) Mezcla con DNA del control +. (4,5) Mezcla con DNA del control negativo, el cual cuenta con todos los reactivos para la reacción de PCR, excepto un DNA molde.

Los pacientes catalogados como estromales (intersticiales o disciformes) sin datos de actividad no presentaron genoma del HSV. De los 12 pacientes catalogados como sospechosos de herpes ocular, sólo 40% de las muestras de lágrima y córnea fueron positivas, en el resto no hubo detección. Sólo el caso de queratitis estromal necrotizante con datos de inflamación y necrosis activa presentó el genoma del HSV-1 en lágrima y córnea.

ELISA: Prueba para la detección de antígenos de HSV

Sólo se logró la detección de antígenos del HSV en 100% de las muestras de raspado corneal de pacientes con diagnóstico de queratitis epitelial, el resto de las muestras analizadas, lágrima de QHE y todos los casos estromales, fueron negativos. Por otra parte, se detectaron los antígenos del HSV en 40% de muestras de lágrima y córnea de pa-

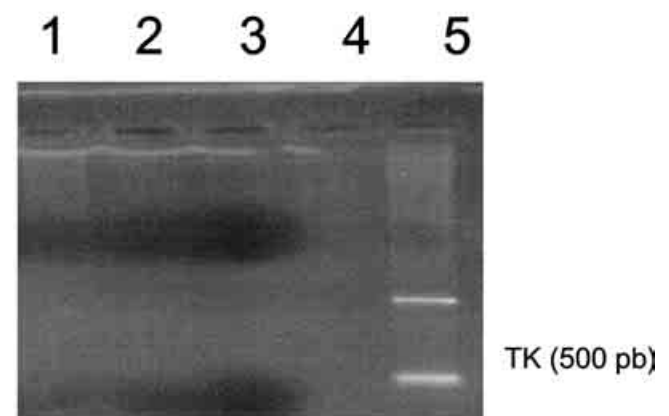


Fig. 2. PCR "Específica" para controles negativos con DNA. Electroforesis de los productos de amplificación. (1) DNA de bacteria gram positivo. (2) DNA de célula humana. (3,4) Extracción de DNA a partir de muestras de lágrima y de raspado de córnea de un paciente con diagnóstico de queratitis herpética epitelial que recibió tratamiento con antivirales. (5) Mezcla con DNA del control +.

cientes con diagnóstico de sospecha de herpes ocular con datos de inflamación.

DISCUSIÓN

Las enfermedades oculares causadas por microorganismos (bacterias, hongos, parásitos y virus) pueden convertirse en un reto diagnóstico y de tratamiento, principalmente en el caso de las partículas virales, en donde el diagnóstico con los métodos convencionales (cultivo) es mucho más tardado y poco sensible, lo que se traduce muchas veces en un tratamiento específico tardío y un pronóstico visual fatal.

El virus del herpes simple, representa el principal ejemplo de agente infeccioso causante de un espectro muy amplio de enfermedad ocular, que en la actualidad representa la causa infecciosa principal de ceguera en los países desarrollados.

En lo anterior se fundamenta nuestro trabajo, con el cual logramos implementar nuevas herramientas de biología molecular como el PCR y el inmunoensayo enzimático para la detección oportuna y rápida de pequeñas cantidades de partículas virales contenidas en muestras oculares, que a veces resultan ser insignificantes.

CONCLUSIONES

Con los resultados anteriores, podemos suponer que más de 70% de los pacientes que sean catalogados en la clínica como queratitis herpética epitelial con datos de actividad inflamatoria, es decir, la presencia de algún defecto epitelial sugestivo de herpes, serán portadores del genoma y antígenos del HSV-1 en muestras de lágrima o córnea; pero principalmente y con mayor sensibilidad en las muestras de raspado corneal. Además, se observa que en estos pacientes se logra correlacionar el estado de inflamación activa con la presencia de un virus en fase de replicación.

Por otra parte, los pacientes con diagnóstico de queratitis herpética estromal de tipo disciforme o intersticial, no presentaron genoma y/o antígenos del HSV-1 en muestras de lágrima y córnea (en la mayoría de los casos se analizó todo el botón corneal).

Coincidimos con la literatura mundial en donde se establece que la gran mayoría de estos casos son producidos por una reacción de hipersensibilidad retardada mediada por linfocitos T ante antígenos de HSV retenidos en el estroma, aunque no encontramos ninguno.

Planeamos realizar microscopia electrónica de córneas con este diagnóstico en busca de las partículas virales embebidas en el estroma.

REFERENCIAS

1. Roizman B, Sears A. Herpes Simplex viruses and their replication. En: B.N. Fields, D.M. Knipe, editors. *Fields Virology*. 3ed. Philadelphia: Lippincott – Raven Press, 1996. p. 2231-2278.
2. Wagner E. Herpes Simplex virus research. Disponible en: URL: <http://darwin.bio.uci.edu/faculty/wagner/movieindex.html>.
3. CDI, Herpes simplex viral infections (monografía en CD-ROM). Kaufman H, Barron B, McDonald M. 2ed. EUA. 1999.
4. McLeod S. Viral Keratitis. Yanoff M, Duker J. editors. *Ophthalmology*. 1ed. Mosby Press, 1998. p.9.1-9.10.
5. CDI, Herpes Simplex Keratitis (monografía en CD-ROM). Duane's P, O'Day D. *Duane's Ophthalmology*, Vol.4, Cap. 19. 2000.
6. Kaye S, Lynas C, Patterson A, Risk J, McCarthy K, Hart C. Evidence for herpes simplex viral latency in the human cornea. *Br J Ophthalmol* 1991; 75:195-200.
7. Streilein W, Reza Dana, Ksander B. Immunity causing blindness: five different paths to herpes stromal keratitis. *Immunology Today* 1997; 18 (9): 443-449.
8. Holland E, Schwartz G. Clasificación y tratamiento de la queratitis por virus del Herpes Simplex. En: *Signos clínicos en oftalmología*, Stein R (ed.). Texas, 1999.
9. Liesegang T. Classification of herpes simplex virus keratitis and anterior uveitis. *Cornea* 1999; 18(2):127-143.
10. Holbach L, Font R, Naumann G. Herpes Simplex stromal and endothelial keratitis. *Ophthalmology* 1990; 97:722-728.
11. Meyers-Elliott R, Pettit T, Maxwell A. Viral Antigens in the human ring of herpes stromal keratitis. *Arch Ophthalmol* 1980; 98:897-904.
12. Robert PY, Traccard I, Adenis JP, Denis F, Ranger-Rogez S. Multiplex detection of herpesviruses in tear fluid using the "stair primers" pcr method: Prospective study of 93 patients. *J Med Virol* 2002; 66 (4):506-11.
13. Vinagre C, Martínez MJ, Vogel M, Traipe L, Stoppel J, Squella O. Role of Herpes Simplex virus in the immune stromal keratitis. *Rev Med Chil* 2001; 129(3):259.
14. NENTM Life Science Products. HERPCHEK® Prueba antigénica directa del virus herpes simplex(HSV). Catalog Number. NEA106. Manual de Instrucciones. Patente U.S. 4,228,237.
15. Kaye S, Baker K, Bonshek R, Maseruka H, y cols. Human Herpesviruses in the cornea. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:563-571.
16. Kaye SB, Shimeld C, Grinfeld E, Maitland N y cols. Non-traumatic acquisition of herpes simplex virus infection through the eye. *Br J Ophthalmol* 1992; 76:412-418.
17. Gelderen B, Van der Lelij A, Treffers F, van der Gaag R. Detection of herpes simplex virus type 1,2 and varicella zoster virus DNA in recipient corneal buttons. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:1238-1243.
18. Bezold G, Volkenandt M, Gottlober P, Peter RU. Detection of herpes simplex virus and varicella-zoster virus in clinical swabs: frequent inhibition of PCR as determined by internal controls. *Mol Diagn* 2000; 5(4):279-84.
19. Koizumi N, Nishida K, Adachi W y cols. Detection of herpes simplex virus DNA in atypical epithelial keratitis using PCR. *Br J Ophthalmol* 1999, 83:957-960.