

Reacción en cadena de la polimerasa: una alternativa en el diagnóstico de las uveítis

Polymerase chain reaction: an alternative in uveitis diagnosis

LOZANO LÓPEZ V, ALEMÁN VALLS R, LOSADA CASTILLO MJ,
ROCHA CABRERA P, CORDOVÉS DORTA L, SERRANO GARCÍA M

RESUMEN

Objetivo: Evaluar la utilidad clínica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) basada en la literatura y nuestra experiencia, en el diagnóstico etiológico de las uveítis infecciosas y en uveítis idiopáticas.

Métodos: Se realizó una revisión sistemática de la literatura médica disponible.

Resultados: Las técnicas moleculares sirven para confirmar el diagnóstico mediante la presencia de material genético del microorganismo (RNA o DNA amplificado por PCR) en las uveítis.

Conclusiones: En los últimos años, varios agentes infecciosos han sido implicados en la etiología de la uveítis. Además de los casos de endoftalmitis endógena y postquirúrgica, está incrementando la detección de patógenos. Siendo la PCR una técnica muy sensible y específica que puede confirmar el diagnóstico en menos de 24 horas con el fin de iniciar el tratamiento adecuado.

Palabras clave: Endoftalmitis, reacción en cadena de la polimerasa, uveítis.

SUMMARY

Objective: To assess the clinical usefulness of polymerase chain reaction (PCR), based on literature and on our experience, for etiologic diagnosis of infectious uveitis and idiopathic uveitis.

Methods: Systematic review of the available medical literature.

Results: Molecular techniques are used to confirm the diagnosis of uveitis by means of the presence of genetic material of the organism (RNA or DNA amplified by PCR).

Correspondencia:
Virginia Lozano López
Hospital Universitario de Canarias. Ctra. Gral del sur s/n
38320 La Laguna Tenerife
vlozano77@hotmail.c

Conclusions: In the last years, several infectious agents have been implicated in the etiology of uveitis. Apart from the cases of endogenous and postsurgical endophthalmitis, the detection of pathogenes is increasing. PCR is a sensitive and specific technique that can confirm the diagnosis in less than 24 hours and start the appropriate treatment.

Key words: Endophthalmitis, polymerase chain reaction, uveitis.

INTRODUCCIÓN

Las uveítis pueden tener un origen infeccioso o no, pero en más de la mitad de los pacientes con uveítis la causa sigue siendo desconocida. Las de origen infeccioso suponen entre el 20% al 25% de los casos de uveítis. Para el adecuado manejo del paciente y la eficacia del tratamiento, el diagnóstico diferencial es fundamental. Los patógenos más comúnmente asociados en pacientes inmunocompetentes son toxoplasma gondii, virus herpes simple (VHS) y virus varicelazóster (VZV). El citomegalovirus (CMV) es la causa más común de uveítis en pacientes inmunocomprometidos (1).

Aunque el diagnóstico diferencial incluye múltiples infecciones asociadas a uveítis como la tuberculosis, sífilis, bartonelosis y otros, con una epidemiología que está cambiando, existiendo un resurgimiento de estos y otros agentes infecciosos bien por el incremento de los viajes, por la inmigración desde áreas endémicas, por el comportamiento en relación con las enfermedades de transmisión sexual o por el insuficiente control de enfermedades por parte de los servicios de salud pública (2).

MÉTODOS

Para la detección de patógenos en casos de uveítis de probable origen infeccioso empleamos técnicas de análisis microbiológico estándar como tinciones o cultivos pero cada vez más, pruebas de diagnóstico molecular como la PCR.

La técnica que empleamos ha sido descrita por diversos autores, en nuestra experiencia la toma de muestras de fluido intraocular requiere la instilación de povidona yodada al 5% en el saco conjuntival tras anestesia local.

Mediante un vitreotomo 23G (Accurus, Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX) se extrae manualmente mediante succión, vítreo sin diluir (500 ml) en una jeringa de 2 ml conectada directamente al vitreotomo, con una tasa media de 1.500 cortes por minuto, colocando el vitreotomo en el centro de la cavidad vítrea, con una presión de infusión de 40 mm de mercurio. Tras finalizar la extracción se desconecta la jeringa y se abre la vía de infusión que contiene solución salina balanceada (1). Otros autores recomiendan emplear el sistema de vitrectomía transconjuntival sin suturas 25G, su principal ventaja se basa en su menor calibre que permite minimizar el trauma inducido en el lugar de entrada, favoreciendo el autocierre y la recuperación postoperatoria (3).

También podemos obtener una muestra de humor acuoso, con instilación de povidona yodada al 5% tras anestesia tópica, mediante aspiración con aguja de calibre 30 Gauges conectada a una jeringa de 1 ml se realiza una paracentesis de cámara anterior, obteniéndose entre 100 y 200 ml de fluido intraocular (4).

Las muestras son transferidas a viales de Eppendorf para ser almacenadas a 4°C y transferidas en un período inferior a 48 horas al laboratorio para ser procesadas. El ADN y ARN se extrae del fluido ocular mediante el kit de aislamiento MagNa Pure LC Total Nucleic Acid (Roche, Mannheim, Alemania). Para monitorizar la calidad de la extracción y el subsecuente procedimiento de amplificación se añade a cada muestra una dosis estándar de herpes virus tipo 1 y virus de la encefalomiocarditis como control interno. La PCR se realiza mediante el sistema de detección secuencias ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). En caso de positividad de la muestra, la PCR se repite para confirmar el diagnóstico (5).

RESULTADOS

Las uveítis idiopáticas representan una causa frecuente de uveítis en la práctica clínica. La prevalencia es de alrededor del 50%, con una incidencia anual de 15,8 casos por cada 100.000 habitantes, estando afectados los hombres y las mujeres por igual. No se conoce la patogénesis ni la etiología en la mayoría de los casos aunque se cree que están mediados por un proceso autoinmune como respuesta anormal al reconocimiento de auto-proteínas, inducido posiblemente por un agente infeccioso.

Aunque las causas infecciosas se deben considerar siempre en los pacientes con uveítis y se deben descartar. El diagnóstico diferencial incluye enfermedades como la infección por herpes, la toxoplasmosis, la tuberculosis, la sífilis, la bartonelosis y otros. Sin embargo debemos tener en cuenta nuevos agentes infecciosos como posibles causantes de la inflamación ocular (6).

Las uveítis infecciosas podemos clasificarlas en:

- Endógenas:
 - a) Bacterianas.
 - b) Fúngicas.
 - c) Víricas.
 - d. Parasitarias
- Exógenas:
 - a) Postquirúrgicas.
 - b) Postraumáticas.
 - c) Miscelánea: queratitis microbiana, escleritis.

En general, las uveítis infecciosas son más frecuentes en países en desarrollo, incluida la tuberculosis, leptospirosis, cisticercosis, lepra, toxoplasmosis y oncocercosis, llegando a provocar el 50% de los casos de uveítis mientras que en países desarrollados suponen una minoría de casos (11-21%). La epidemiología de las uveítis no infecciosas tiende a variar menos entre regiones pero varía en la medida en que la raza influye en las uveítis (7).

La prevalencia del VIH/SIDA tiene una importante influencia en la distribución de las uveítis. El estado de inmunosupresión promueve las infecciones, teniendo estos pacientes una mayor tasa de retinitis por CMV y retinocoroidosis por toxoplasma que ha dis-

minuido tras la introducción de la terapia antirretroviral (HAART). En África la prevalencia de estos cuadros de uveítis en pacientes con VIH/SIDA parece tener una prevalencia más baja, quizás debido a la mortalidad precoz de estos pacientes (7).

UTILIDAD DE LA PCR EN UVEÍTIS IDIOPÁTICAS

El hallazgo de que aproximadamente el 5% de las uveítis idiopáticas están asociadas a un patógeno viral se ha descubierto en varios estudios.

Así Drancourt estudió 1.321 pacientes con uveítis idiopática mediante análisis con PCR e identificó bacterias como Bartonella, Borrelia, Chlamydia y Coxiella, virus de la familia herpes y hongos en un 11% de los casos (4).

En otro grupo de trabajo De Groot-Mijnes ha recogido 629 muestras de fluidos oculares a lo largo de un período de 5 años en casos de uveítis consideradas idiopáticas en base a los resultados de laboratorio que habían sido negativos. A todas las muestras se les realizó PCR para VHS, VZV, CMV y toxoplasma gondii, resultando negativas 489 muestras. De estas, en 139 se disponía de suficiente fluido para la búsqueda mediante PCR de adenovirus, virus de Epstein-Barr (VEB), herpes virus humano 6 (HHV6), mycoplasma, coronavirus, enterovirus, metapneumovirus, influenza, parainfluenza, paraechovirus, virus sincitial respiratorio y rebeola. Demostrándose resultados positivos en el 7% de los casos, siendo la PCR positiva para VEB (1 caso), rubeola (1 caso), HHV6 (1 caso) y paraechovirus (4 casos) (1).

Hay que destacar que en cuadros considerados idiopáticos se está encontrando una asociación con agentes infecciosos. Así en la iridociclitis heterocrómica de Fuchs que representa el 1,5% de todas las uveítis anteriores se ha implicado la toxoplasmosis ocular y el VHS en su etiología (8,9). Más recientemente, Birnbaum correlacionó la fuerte disminución de la prevalencia de la iridociclitis heterocrómica de Fuchs con la introducción de los programas de vacunación contra la rubeola

Tabla I. Distribución de la etiología de las uveítis en países desarrollados

| Estudio (autor) | Año | Localización | N | Idiopática % | Toxo % | TBC % | BD % | FHIC % | Herpes % | VKH % | Sarcoidosis % | MFC % | Otros % |
|-----------------|------|--------------|------|--------------|--------|-------|------|--------|----------|-------|---------------|-------|----------------------------------|
| Jakob | 2008 | Alemania | 1598 | 34 | 5 | 1 | 2 | 7 | 6 | 0.3 | 5 | 0.9 | 7 HLA B27, 4 EA, 3 AIJ, 3 EM |
| Goto | 2007 | Japón | 3060 | 39 | 1 | 0.7 | 6 | | 5 | 7 | 13 | | 2 Posner, 2 HLA B27, 1 HTLV |
| Oruc | 2003 | St. Louis US | 853 | 31 | 4 | 0 | 0.1 | 0.5 | 0.5 | 0.2 | 2 | 5 | 15 CMVR, 10 endoftalmitis |
| Wakabayashi | 2003 | Japón | 189 | 42 | 4 | 7 | 6 | 0.5 | 1 | 10 | 10 | 2 | 2 HLA B27, 3 POHS, 2 OS, 2 MEWDS |
| Mercanti | 2001 | Italia | 655 | 44 | 18 | 7 | 3 | 2 | 12 | 1 | 0.8 | 0 | 2 AIJ, 2 micosis, 4 traumática |
| Biziorek | 2001 | Polonia | 563 | 30 | | | | | | | | | |
| Bodaghi | 2001 | Baltimore US | 927 | 32 | 12 | 4 | 6 | 3 | 11 | 2 | 6 | 2 | 5 HLA B27, 3 AIJ, 4 Birdshot |

AIJ: artritis idiopática juvenil, BD: enfermedad de Behcet, CMVR: retinitis por citomegalovirus, EA: espondilitis anquilosante, EM: escleritis múltiple, FHIC: iridoclititis heterocrómica de Fuchs, HTLV: virus linfotrofo humano, MEWDS: síndrome de múltiples manchas blancas evanescentes, MFC: coroiditis multifocal, OS: oftalmía simpática, POHS: síndrome de presunta histoplasmosis ocular, TBC: tuberculosis, Toxo: toxoplasmosis, VKH: Vogt-Koyanagi-Harada.

(10). Estos hallazgos han hecho que Rothova establezca la hipótesis de que el Fuchs representa una reacción de inmunidad retardada frente a la infección por rubeola. Quentin y Reiber han aportado evidencia de la producción de intraocular de Ac frente al virus de la rubeola en el 18% de las muestras de humor acuoso de pacientes con Fuchs (11). Chee informó de que un 41,7% de sus pacientes con Fuchs tienen evidencia de infección por CMV en cámara anterior (12).

La crisis glaucomatociclítica, también conocida como síndrome de Posner-Schlossman representa el 0,5% de los casos de uveítis anterior. La patogenia sugiere que tanto factores inmunológicos como infecciosos influyen en su naturaleza. Demostrándose asociación con *Borrelia burgdorferi* (13). Recientemente se han obtenido fragmentos de VHS en el humor acuoso de pacientes con episodios agudos (14). Chee detectó en 35 ojos de 67 pacientes con síndrome de Posner (52,2%) que la PCR fue positiva para CMV (12).

Las endotelitis pueden estar causadas por CMV que requieren tratamiento específico con ganciclovir o valganciclovir que no es efectivo contra el VHS ni el VZV, de la misma manera que el tratamiento para estos virus no es efectivo contra el CMV. Suzuki detectó mediante PCR en humor acuoso CMV en un caso de endotelitis persistente tras una queratoplastia que no respondía a

aciclovir ni corticoides, cambiando el tratamiento a ganciclovir que consiguió la erradicación del cuadro (15). Chee detectó en 11 de 12 ojos con endotelitis a los que se les realizó PCR para CMV, VHS, VZV y toxoplasma, que CMV fue el único agente patógeno identificado (12).

UTILIDAD DE LA PCR EN UVEÍTIS INFECCIOSAS

La endoftalmitis de origen bacteriano puede ocurrir después de una cirugía, traumatismo, queratitis o puede ser de origen endógeno. La PCR se ha convertido en una herramienta que permite la detección rápida y de forma sensible de los agentes infecciosos. Además nos ayuda a confirmar el diagnóstico en casos donde existe reactividad cruzada entre diferentes microorganismos o la seroprevalencia es igual entre pacientes afectados y la población general. Como en el caso de *Bartonella henselae*, *Coxiella burnetii*, rickettsias. También se ha debatido si la uveítis se debe a la participación directa del germen a nivel ocular o es una reacción inmune secundaria. La detección de microorganismos mediante PCR en los fluidos oculares sugiere infección, por lo que la recomendación es que estos pacientes sean tratados con antibióticos a concentraciones capaces de alcanzar el espacio intraocular (16).

Un caso especial lo constituye la tuberculosis intraocular. Los cultivos de los fluidos intraoculares son a menudo negativos, ya sean verdaderos negativos, falsos negativos o una reacción inflamatoria al bacilo de la tuberculosis. La obtención de fluidos intraoculares que permitan confirmar el diagnóstico no siempre es posible y está limitada por el pequeño volumen y la baja concentración de bacilos comúnmente obtenidos. Por lo que la PCR es una técnica prometedora que permite amplificar pequeñas cantidades de bacilos, jugando un papel importante en el diagnóstico de la tuberculosis ocular. Sin embargo la precisión (alta especificidad pero limitada sensibilidad) y las cuestiones técnicas de laboratorio siguen siendo sus principales limitaciones para su uso generalizado. Por lo que el diagnóstico de tuberculosis ocular incluye las manifestaciones clínicas, la prueba cutánea de PPD, el test de gamma-interferon, el cultivo y la PCR aunque esta última se ha propuesto pero no se ha validado (17).

La PCR resulta útil en la confirmación del diagnóstico de uveítis de origen vírico aunque este se basa en los hallazgos clínicos que suelen ser característicos y a veces suficientes; pero en pacientes inmunosuprimidos la clínica puede ser atípica y los resultados de laboratorio inconclusos por el estado inmunológico del paciente, siendo de gran utilidad la PCR. Así Verbraak demostró que era diagnóstica al analizar humor vítreo de pacientes con SIDA y retinitis necrotizante, detectando ADN vírico en 11 de los 28 pacientes analizados. Danise detectó en 11 de 15 casos estudiados ADN de CMV, VZV y VHS. Abe comparó el uso de PCR y la producción de anticuerpos locales para el diagnóstico de retinitis por CMV y virus ARN y concluyó que la PCR es más específica y sensible para la detección del origen del cuadro. Nogueira empleó la PCR de humor vítreo para confirmar la etiología de 17 casos de retinitis necrotizante, encontrando en 11 casos ADN de herpes virus y también en humor acuoso de un caso con uveítis anterior (18).

En los casos de uveítis parasitaria, la toxoplasmosis que es la causa más frecuente tiene algunas características especiales. Así para confirmar el diagnóstico Montoya prefiere la

PCR de vítreo por el gran tamaño del organismo. De Groot-Mijnes detectó en 9 de 25 casos (36%) PCR positiva para toxoplasma aunque Fardeau en 34 pacientes con toxoplasmosis identificó que el 79% de los pacientes tenían anticuerpos y sólo el 27% demostró resultado positivo en la PCR (4).

Las uveítis de origen fúngico pueden confirmarse mediante el estudio de frotis, cultivos, PCR y microscopía confocal. Los frotis permiten el diagnóstico rápido de hongos filamentosos. La tinción de Gram y Giemsa son sensibles para la detección de elementos fúngicos. La tinción con hidróxido de potasio al 10% (KOH) tiene una sensibilidad mayor (99,23%) que la tinción de Gram (88,73%). El cultivo de hongos en agar sangre y Sabouraud agar dextrosa requiere de 48 a 72 horas para poder crecer, la tasa de cultivos positivos es del 52-68%. La PCR está siendo empleada como nuevo método de diagnóstico rápido. Gaudio ha descrito que los cultivos y PCR fúngicas coincidían en 22 de 30 muestras (74%) pero sobretodo que los resultados se obtienen en 4 horas, lo cual es bastante más rápido que los 2 días a 2 semanas que requieren los cultivos (19).

TOMA DE MUESTRAS

No hay unanimidad sobre la técnica a emplear para la toma de muestras.

La vitrectomía diagnóstica por lo general se utiliza en casos atípicos o graves, sus principales ventajas son los volúmenes grandes de la muestra (500 µl sin diluir) y por lo tanto la posibilidad de realizar diversos exámenes, además en muchos casos permite mejorar la agudeza visual simplemente por la vitrectomía. Sin embargo sus inconvenientes son que se trata de un procedimiento invasivo, de acceso limitado (no todos los oftalmólogos realizan vitrectomías pars plana y requiere ser realizada en un quirófano) y que tiene un mayor costo. Lo cual puede explicar la reticencia de algunos oftalmólogos a realizarla como técnica diagnóstica inicial para toma de muestras de PCR.

La paracentesis de cámara anterior es una técnica menos elaborada que se puede reali-

zar en consulta con medidas de asepsia y bajo microscopio. Por tanto, tiene menos complicaciones aunque una de sus principales desventajas es el pequeño volumen de la muestra (150 ml) que limita el número de exámenes a realizar. Esta técnica se ha vuelto muy popular como primer examen de los fluidos oculares en las uveítis infecciosas, siendo útil incluso en casos de inflamación localizada en el segmento posterior.

Las técnicas para la toma de muestra de PCR no están exentas de complicaciones como la endoftalmitis, cataratas, hiphema. En nuestra experiencia no hemos tenido este tipo de complicaciones realizando una técnica reglada, tanto para las paracentesis de cámara anterior como para la vitrectomía pars plana.

CONCLUSIONES

Es evidente que la PCR es útil en la identificación de los patógenos responsables en los casos de endoftalmitis, especialmente postquirúrgicas o postraumáticas; pero es en los casos de uveítis idiopática donde la PCR podría resultar especialmente útil. Diversos estudios aplican técnicas moleculares de detección de patógenos en uveítis idiopáticas, que como hemos dicho representan el 50% de los casos de uveítis.

Algunos estudios han demostrado que la detección de patógenos mediante PCR es más sensible en muestras de vítreo que en humor acuoso. Además recientemente se ha demostrado que la PCR es más sensible que el cultivo de muestras de vítreo (20).

El diagnóstico de las uveítis requiere una valoración médica exhaustiva junto con estudios complementarios, la PCR es una técnica complementaria que influye en el diagnóstico y tratamiento de las uveítis.

BIBLIOGRAFÍA

1. De Groot-Mijnes ODF, De Visser L, Zuurveen S, Martinus RA, Völker R, Ten Dam-Van Loon NH, De Boer JH, Postma G, De Groot RJ, Van Loon AM, Rothova A. Identification of New Pathogens in the Intraocular fluid of Patients With Uveitis. *Am J Ophthalmol.* 2010; 150: 628-636.
2. Del Rey Calero J, Alegre del Rey E. Principales cambios en la epidemiología de las enfermedades infecciosas en el mundo. *Gaceta sanitaria Sociedad Española de Salud Pública y Administración Sanitaria.* 1998; 12: 2: 85-92.
3. Ibarra MS, Hermel M, Prenner JL, Hassan TS. Longer-term outcomes of transconjunctival sutureless 25-gauge vitrectomy. *Am J Ophthalmol.* 2005; 139: 831-836.
4. Harper TW, Miller D, Schiffman JC, Davis JL. Polymerase chain reaction analysis of aqueous and vitreous specimens in the diagnosis of posterior segment infectious uveitis. *Am J Ophthalmol.* 2009; 147: 140-147.
5. Chiquet C, Maurin M, Thuret G, Benito Y, Cornut PL, Creuzot-Garcher C, Rouberol F, Pechinot A, Lina G, Romanet JP, Bron A, Vandenesch F. Analysis of diluted vitreous samples from vitrectomy is useful in eyes with severe acute postoperative endophthalmitis. *Ophthalmology.* 2009; 116: 12: 2437-2441.
6. Khairallah M, Jelliti B, Jenzeri S. Emergent infectious uveitis. *Middle East Afr J Ophthalmol.* 2009; 16: 4: 225-238.
7. London NJS, Rathinam SRR, Cunningham ET. The epidemiology of uveitis in developing countries. *International Ophthalmology Clinics.* 2010; 50: 2: 1.17.
8. Schwab IR. The epidemiologic association of Fuch's heterochromic iridocyclitis and ocular toxoplasmosis. *Am J Ophthalmol.* 1991; 111: 356-362.
9. Barequet IS, Li Q, Wang Y. Herpes simplex virus DNA identification from aqueous fluid in Fuch's heterochromic iridocyclitis. *Am J Ophthalmol.* 2000; 129: 672-673.
10. Birnbaum AD, Tessler HH, Schultz KL. Epidemiological relationship between Fuchs heterochromic iridocyclitis and the United States rubella vaccination program. *Am J Ophthalmol.* 2007; 144: 424-428.
11. Hovakimyan A, Baglivo E, Cunningham ET. Fuchs uveitis syndrome in the developing world. *Int Ophthalmol Clinics.* 2010; 50: 2: 145-153.
12. Chee SP, Bacsal K, Jap A, Se-Thoe SY, Cheng CL, Tan BH. Clinical features of cytomegalovirus anterior uveitis in immunocompetent patients. *Am J Ophthalmol.* 2008; 145: 5: 834-840.
13. Isogai E, Isogai H, Kotake S. Detection of antibodies against *Borrelia burgdorferi* in patients with uveitis. *Am J Ophthalmol.* 1991; 112: 23-30.
14. Yamamoto S, Pavan-Langston D, Tada R. Possible role of herpes simplex virus in the origin of Posner-Schlossman syndrome. *Am J Ophthalmol.* 1995; 119: 796-798.

15. Suzuki T, Hara Y, Uno T, Ohashi Y. DNA of cytomegalovirus detected by PCR in aqueous of patient with corneal endothelitis after penetrating keratoplasty. *Cornea*. 2007; 26: 3: 370-372.
16. Drancourt M, Bodaghi B, Lepidi H, Le Hoang P, Raoult D. Intraocular detection of bartonella henselae in a patient with HLA B27 uveitis. *J Clin Microbiol*. 2004; 42: 4: 1822-1825.
17. Álvarez GG, Roth VR, Hodge W. Ocular tuberculosis: diagnostic and treatment challenges. *Int J Infect Dis*. 2009; 13: 432-435.
18. Nogueira ML, Siqueira RC, Freitas N, Amorim JB, Bonjardim CA, Ferreira PCP, Oréface F, Kroon EG. Detection of herpesvirus DNA by the polymerase chain reaction (PCR) in vitreous samples from patients with necrotising retinitis. *J Clin Pathol*. 2001; 54: 103-106.
19. Gaudio PA, Gopinathan U, Sangwan V. Polymerase chain reaction based detection of fungi in infected corneas. *Br J Ophthalmol*. 2002; 86: 755-760.
20. Seal D, Reischl U, Behr A, Ferrer C, Alió J, Koerner RJ, Barry P. Laboratory diagnosis of endophthalmitis: comparison of microbiology and molecular methods in the European Society of Cataract and Refractive Surgeons multicenter study and susceptibility testing. *J Cataract Refract Surg*. 2008; 34: 1439-1450.