

COMPARACIÓN POR MÉTODOS CONVENCIONALES Y (PCR) PARA LA IDENTIFICACIÓN DE P. AERUGINOSA Y S. AUREUS; SU RESISTENCIA A CIPROFLOXACINA Y METICILINA EN USUARIOS DE LENTES DE CONTACTO BLANDOS

Johan Zuñiga Montilla*

Patricia Durán Ospina**, Luisa Fernanda Corredor Arias**

Resumen

Introducción: *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, son los patógenos más comúnmente aislados de lentes de contacto blandos, ocasionando blefaritis, conjuntivitis y queratitis; el diagnóstico tardío de la infección puede producir pérdida corneal en 24 horas. Es importante buscar nuevos mecanismos para detectar la infección en el menor tiempo y utilizar el antibiótico indicado.

Métodos: los aislamientos de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, se obtendrán a partir de lentes de contacto, estuches, soluciones de mantenimiento y secreciones oculares. El tamaño de la muestra se logrará a conveniencia, de acuerdo con el número de pacientes de lentes de contacto blandos, atendidos en la Fundación Universitaria el Área Andina, (seccional Pereira) en un período de doce meses. Las variables independientes serán: la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los métodos tradicionales (siembra en agar, pruebas confirmativas y antibiograma). Para la recolección de los datos se empleará como instrumentos, la anamnesis de presencia de signos y síntomas, y un formato de registro de análisis de datos. Se firmará un consentimiento informado para la participación voluntaria en el estudio.

Resultados: definir si los métodos moleculares son más eficientes que los métodos tradicionales, y conocer la frecuencia de aparición de estos microorganismos en usuarios de lentes de contacto blandos.

Palabras clave: *pseudomonas aeruginosa*, *staphylococcus aureus*, lentes de contacto, queratitis, métodos convencionales, PCR

* Estudiante Optometría. Semillero 'Visionarios'. Fundación Universitaria del Área Andina, seccional Pereira

** Docentes Fundación Universitaria del Área Andina, seccional Pereira

COMPARISON FOR CONVENTIONAL METHODS And (PCR) FOR THE IDENTIFICATION GIVES P. AERUGINOSA AND S. AUREUS; HIS RESISTANCE TO CIPROFLOXACINA and METICILINA IN USERS OF SOFT(SMOOTH) CONTACT LENSES

Abstract

Introduction: *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, are the most common isolated pathogens from soft contact lenses, causing blepharitis, conjunctivitis y keratitis, delay infection diagnosis, could lead to corneal loss in 24 hours. It is important to search for new mechanisms for the early detection of the infection in order to use the right antibiotic treatment.

Methods: isolates of *P. aeruginosa* and *S. aureus*, will be obtained from contact lenses, cases, conservation solutions and eye secretions. Sample size will be obtained by convenience, according to the number of soft contact lenses users attended at the Fundación Universitaria del Area Andina over a period of twelve months, the independent variables will be the polymerase chain reaction and the conventional methods (culture plate agar, confirmative test and antibiogram), to determine the presence, antibiotic resistance and to decrease identification time of *P. aeruginosa* and *S. aureus*. Instruments will be used for data collection, anamnesis of the presence of signs and symptoms and informed consent for participation in the study.

Results: define if molecular methods are more efficient than traditional for isolation of *P. aeruginosa* and *S. aureus* and to know the frequency of those microorganisms in contact lens wearers.

Keywords: *pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, contact lenses, keratitis, conventional methods, PCR.

Introducción

Existen alrededor de 75 millones de usuarios de lentes de contacto (LC) en el mundo. La incidencia de las complicaciones asociadas a su utilización, principalmente de lentes blandos que favorecen la adherencia microbiana^{1,2}, pueden llegar a afectar a un número significativo de pacientes. *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, son los patógenos más comúnmente aislados de lentes de contacto blandos, ocasionando blefaritis, conjuntivitis y queratitis^{3,4}. La queratitis bacteriana es la complicación más grave en portadores de LC, siendo su incidencia 80 veces mayor⁵. La formación de biopelículas (biofilms) y los mecanismos de resistencia de estos patógenos, pueden ocasionar otras enfermedades como uveítis y endoftalmitis, si no son tratadas adecuadamente en el menor tiempo posible^{1,2}, puesto que el diagnóstico tardío en algunos casos conduce a un trasplante de córnea e incluso la enucleación del ojo. El diagnóstico acertado y rápido de la infección es imprescindible en la clínica, porque en ocasiones el tratamiento farmacológico es empírico⁶. Los antibióticos de referencia más ampliamente utilizados son las fluoroquinolonas y los aminoglucósidos.

El aislamiento del agente causal y su antibiograma, tardan dependiendo del laboratorio, de 3 a 7 días; por lo cual la aplicación de métodos que permitan disminuir este tiempo es indispensable, con el fin de reducir complicaciones y el uso indiscriminado de antibióticos. Los métodos moleculares han hecho posible el diagnóstico y la detección de la resistencia de estos patógenos en menor tiempo, sin exponer la integridad visual de los pacientes^{7,8}.

En la región del Eje Cafetero los métodos moleculares no son utilizados, por lo cual su implementación para detectar a tiempo el agente infeccioso y de manera simultánea la resistencia a antibióticos como la meticilina y la ciprofloxacina, representaría un gran beneficio para los pacientes.

El objeto del estudio es comparar los métodos convencionales y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, y su resistencia a ciprofloxacina y meticilina, en usuarios de lentes de contacto blandos remitidos a la Fundación Universitaria del Área Andina. Las variables independientes serán el método tradicional y el molecular, y las dependientes los aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, a partir de lentes, estuches, solución de mantenimiento y secreción ocular. Este estudio será el primer banco de datos de prevalencia de las infecciones oculares causadas por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, e igualmente será una innovación metodológica en el diagnóstico.

Metodología

Tipo de estudio: experimental

Población: aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, obtenidos a partir de lentes de contacto, estuches, soluciones de mantenimiento y secreciones oculares.

Muestra: el tamaño de la muestra se obtendrá a conveniencia, de acuerdo con el número de pacientes usuarios de lentes de contacto blando, atendido en la Fundación Universitaria el Área Andina (12 meses).

Hipótesis de trabajo: la técnica molecular es un método más eficiente que la técnica tradicional, para identificar la presencia, la resistencia antimicrobiana y para disminuir el tiempo de detección de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en muestras de usuarios de lentes de contacto blandos.

Hipótesis nula: la técnica tradicional no es un método más eficiente que la técnica molecular, para identificar la presencia, la resistencia antimicrobiana y para disminuir el tiempo de detección de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en muestras de usuarios de lentes de contacto blandos.

Variables independientes: método tradicional y método molecular.

Variable dependiente 1: *Pseudomonas aeruginosa* (en lente, estuche, solución y secreción). Indicadores de variabilidad: presencia, tiempo de identificación y resistencia al antibiótico.

Variable dependiente 2: *Staphylococcus aureus* (en lente, estuche, solución y secreción). Indicadores de variabilidad: presencia, tiempo de identificación y resistencia al antibiótico.

Variable intervinientes: demográficas: género, procedencia, edad.

Técnica empleada método molecular: amplificación y observación directa de productos de PCR múltiple en gel de agarosa al 2%.

Técnica empleada método tradicional: observación microscópica y directa de la morfología de colonias aisladas en agar bacteriológico. Posteriormente se realizarán repiques en medios confirmativos y antibiograma, para evaluar

resistencia o sensibilidad antimicrobiana (ciprofloxacina y meticilina).

Instrumentos: los pacientes deberán firmar el consentimiento informado para proceder con la valoración médica y autorizar el estudio de sus lentes con fines académicos. Para la recolección de los datos se realizará una historia clínica del paciente, y en una ficha se registrarán los aspectos tenidos en cuenta como variables dependientes.

Proceso de obtención de muestras: la toma de muestras se realizará a partir de secreciones oculares de usuarios de lentes de contacto blandos con signos evidentes de infección bacteriana (queratitis, conjuntivitis, etc.); del lente de contacto; del estuche y de la solución de mantenimiento, utilizando aplicadores estériles y medios de cultivo de transporte.

Toma de muestra para el análisis microbiológicos y molecular: las muestras se someterán a siembra en agar cetrimide (*Pseudomonas aeruginosa*) y en agar manitol (*Staphylococcus aureus*). Se realizará la extracción de ADN con el método CTAB modificado, para someter las muestras a amplificación por PCR para identificación de los microorganismos y detección de la resistencia antibióticos.

*Pseudomonas aeruginosa*⁹:

Se toma una muestra (alícuota de la solución de conservación de los lentes de contacto o de suspensión celular a partir de asilamiento de secreción ocular, lente o estuche) y se le adiciona directamente a la mezcla de reacción de la PCR. Desnaturalización: 18 min. a 95°C y se realiza PCR múltiple con *Taq* DNA, polimerasa (Promega); dNTPs,

Tabla 1. Iniciadores para la PCR múltiple de *Pseudomonas aeruginosa*

Gen/Ubicación	Iniciadores (5' - 3')	Tamaño	Ref.
Exotoxina A	ETA1 - GAC AAC GCC CTC AGC ATC ACC AGC -	397 pb	9, 10
Eta nt: 1001-1398	ETA2 - CGC TGG CCC ATT CGC TCC AGC GCT-		
DNA girasa	gyrA1 - TTA TGC CAT GAG CGA GCT GGG CAA CGA CT-	360 pb	9
Resistencia a ciprofloxacina: gyrA nt: 147-176	gyrA2 - AAC CGT TGA CCA GCA GGT TGG GAA TCT T -		

* nt: numero de nucleótidos donde se ubica el gen dentro del genoma del microorganismo

buffer de reacción y primers (ver tabla 1).
Termociclador GeneAmp PCR System
9700 y 2400. Extensión final: 10 min a
72°C.

Staphylococcus aureus:

A partir de cada muestra el aislamiento de
DNA: 20 µl de buffer de lisis (0.25% SDS,
0,05 N de NaOH). PCR múltiple (11): la
mezcla para un volumen de 50 µl contiene
2.5 U de Taq DNA polimerasa (Promega).
Termociclador GeneAmp PCR System
9700 y 2400. Desnaturalización inicial a

94°C por 5 min, seguida por 35 ciclos de
amplificación (94°C por 2 min, 57°C por
2 min. y 72°C por 1 min.) y una extensión
final de 72°C por 7 min. Control positivo:
cepa registrada ATCC *Staphylococcus*
aureus 29213. Control negativo: cepa de
otra especie de *Staphylococcus* y de otro
microorganismo Gram positivo.

La detección y análisis de los productos
amplificados de ADN, se realizará en
un gel de agarosa al 2% (Sigma), con
bromuro de etidio.

Tabla 2. Iniciadores para la PCR múltiple de *Staphylococcus aureus*

Gene	Secuencia del Iniciador (5'-3')	Tamaño/Referencia
Factor asociado al pepti= doglicano de <i>S. aureus</i> y a la resistencia a. meticilina <i>mecA</i>	femA-1 - AAA AAA GCA CAT AAC AAG CG - femA-2 - GAT AAA GAA GAA ACC AGC AG - <i>mecA</i> -1	132 pb 11,12
Resistencia a meticilina: proteína de unión a penicilina 2a	<i>mecA</i> -2 - AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C -	532 pb 11

Análisis estadístico: se realizará la comparación entre subgrupos. El índice Kappa se utilizará para el análisis de concordancia entre las dos metodologías empleadas. Se tendrá en cuenta una probabilidad (p) ≤ 0.05 .

Resultados esperados

Se espera definir si los métodos moleculares son más eficientes que los métodos microbiológicos convencionales para la identificación de *P. aeruginosa* y *S. aureus*, y permitirá conocer la frecuencia de las infecciones oculares por estos microorganismos, en usuarios de lentes de contacto blandos en la población estudiada. De igual manera realizar un protocolo,

empleando esta técnica para muestras oculares a partir de lentes de contacto y evitarle al paciente citas extras.

De otra forma contribuirá con la frecuencia de la resistencia de ciprofloxacina y meticilina en la población a estudiar y se podrán realizar los protocolos para la toma de muestras, transporte, cultivos y para la detección molecular a partir de secreciones de lentes de contacto. Si se logra un diagnóstico más rápido, se podría actuar ante una queratitis, que en muchas ocasiones termina en trasplante de córnea, poniendo en riesgo la seguridad ocular, y permite además identificar simultáneamente la sensibilidad y resistencia al antibiótico, sin necesidad de realizar un antibiograma adicional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Efron N. *Complicaciones de las lentes de contacto*. Elsevier, Madrid, 2005.
2. Delgado, E. Duran P. Neira, O.Veloza, C. *Queratitis por Pseudomonas aeruginosa asociada al uso de lentes de contacto de hidrogel de silicona de última generación: reporte de caso*. Revista Chilena de infectología. Agosto. 2008.
3. Iskeleli G., Bhar H., Unal M. *Microbiologic evaluation of frequent-replacement soft contact lenses*. The CLAO journal. Julio 2002.
4. Wilhelmus K. *Microbial keratitis associated with contact lens wear*. De contact lenses. The CLAO guide. Vol. III. pp: 19-48. 1995.
5. Egea Mc., Pueyo V., Noles B., Sánchez A., Brito C., Honrubia Fm. *queratitis microbiana en portadores de lentes de contacto*. Rev. Esp. Contact. 2006
6. Zhu H., Thurthyl S., Willcox, M. *Determination of quorum-sensing signal molecules and virulence factors of Pseudomonas aeruginosa isolates from contact lens-induced microbial keratitis*. Cooperative Research Center for Eye Research and Technology, University of New South Wales. Australia. J Med Microbiol. 51: 1063-1070. 2002.
7. Bergeron, M. G., and M. Ouellette. *Preventing antibiotic resistance through rapid genotypic identification of bacteria and of their antibiotic resistance genes in the clinical microbiology laboratory*. J. Clin. Microbiol. 36:2169-2172. 1998.
8. Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G. and Witte, W. *Multiplex PCR Assay for Simultaneous. Detection of Nine Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Staphylococcus aureus*. J Clin Microbiol. 41:4089-9. 2003.
9. Song, K. P., Chan, T. K., Ji, Z. L. and Wong, S. W. *Rapid identification of Pseudomonas aeruginosa from ocular isolates by PCR using exotoxin A-specific primers*. Molec and Cellular Probes. 14: 199-204. 2000.
10. Atzel, B., Szoboszlai, S., Mikuska, Z. and Kriszt, B. *Comparison of phenotypic and genotypic methods for the detection of environmental isolates of Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Hyg. Environ.-Health. In press. 2007.
11. Mehrotra, M., Wang, G. and Johnson W. M. *Multiplex PCR for detection of genes for Staphylococcus aureus enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin I, and methicillin resistance*. J. Clin. Microbiol. 38: 1032-1035. 2000.
12. Martineau, F., Picard, J. R., Roy, P. R, Ouellette, M. and Bergeron, M. G. *Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of Staphylococcus aureus*. J. Clin. Microbiol. 36: 618-623. 1998.