

Original breve

Alberto Tenorio-Abreu¹
Juan Carlos Sánchez-España²
Ligia Esperanza Naranjo-
González²
María Carmen González-
Gallego³
Carlos Hidalgo-Grass⁴
Carlos Ruiz-Frutos⁵

Desarrollo de una PCR para la detección y cuantificación de la parasitación por *Demodex folliculorum* en biopsias de neoplasias cutáneas del área periocular

¹UGC Microbiología Complejo Hospitalario Universitario de Huelva.

²UGC Oftalmología Complejo Hospitalario Universitario de Huelva.

³UGC Anatomía Patológica Complejo Hospitalario Universitario de Huelva.

⁴HGC Biomedical Research Diagnostic S.L. Huelva.

⁵Departamento de Biología Ambiental y Salud Pública Universidad de Huelva.

RESUMEN

Objetivo. Estandarizar la cuantificación relativa por masa de tejido de la parasitación por *Demodex folliculorum* procedente de biopsias neoplásicas cutáneas de la zona periocular mediante técnicas de amplificación molecular con el objetivo de poder estudiar la posible relación de la aparición de carcinoma basocelular palpebral con la presencia y densidad del ácaro en trabajos posteriores.

Material y métodos. Se desarrolló una PCR cuantitativa a tiempo real con sondas TaqMan. La PCR se probó en una serie piloto de 46 muestras reales de biopsias de carcinoma basocelular de tipo nodular.

Resultados. La sensibilidad se situó con un límite de detección de entre 1 y 10 copias/μl. El 50% (23/46) de las biopsias fueron positivas a *D. folliculorum*. La especificidad fue del 100% confirmado mediante secuenciación.

Conclusión. La técnica muestra buenos resultados de sensibilidad y especificidad que la pueden hacer útil como herramienta para estudios causa-efecto de *D. folliculorum* y basalioma.

Palabras clave: *Demodex folliculorum*, PCR cuantitativa, carcinoma basocelular.

Development of a PCR for the detection and quantification of parasitism by *Demodex folliculorum* infestation in biopsies of skin neoplasms periocular area

ABSTRACT

Objective. To standardize the relative quantification by mass of tissue parasitism by *Demodex folliculorum* infestation from neoplastic skin biopsies periocular using molecular amplification to study the possible relationship of the appearance of eyelid basal cell carcinoma with the presence and density of the mite in later works.

Methods. A quantitative PCR was developed real-time probes TaqMan. PCR was tested in a pilot 46 actual biopsy samples nodular basal cell carcinoma series.

Results. The sensitivity was placed with a detection limit of between 1 and 10 copies / μl. 50% (23/46) of the biopsies were positive for *D. folliculorum*. The specificity was 100% confirmed by sequencing.

Conclusion. The technique shows good results for sensitivity and specificity that can make it useful as a tool for studies of cause and effect *D. folliculorum* and basal cell carcinoma.

Keywords: *Demodex folliculorum*, quantitative PCR, basal cell carcinoma.

INTRODUCCIÓN

Demodex folliculorum es un ácaro comensal que vive en los folículos pilosos humanos, alimentándose de restos celulares muertos. Tienen forma alargada y durante su ciclo de vida van parasitando folículos de la cara, sobre todo de la zona de la nariz y párpados. En número reducido no suelen presentar sintomatología clínica, aunque el aumento de la infestación está relacionado con ciertas patologías como la blefaritis crónica o la rosácea reportado por diversos estu-

Correspondencia:
Dr. Alberto Tenorio Abreu.
Hospital Juan Ramón Jiménez, Ronda Exterior Norte s/n 21005 Huelva
Tfno: 657929483
E-mail: albeteno@hotmail.com

dios^{1,2}. También se ha relacionado su infestación en pacientes inmunocomprometidos³.

El diagnóstico habitual se realiza mediante visualización directa del ácaro con el microscopio óptico a partir de muestras cutáneas o pestañas afectadas^{4,5}, informando los resultados mediante un índice de parasitación (número de parásitos/pestaña). Actualmente se están desarrollando técnicas moleculares de PCR para la detección y cuantificación de *D. folliculorum* con el fin de estandarizar con mayor precisión el diagnóstico y el índice de parasitación en lesiones cutáneas como la rosácea^{6,7}. Por otra parte, existe la sospecha de que *D. folliculorum* pudiera intervenir en la aparición de carcinoma basocelular (CB) palpebral⁸. Por ello, para poder establecer la posible relación y que sirva de herramienta para estudios posteriores, el objetivo del presente trabajo ha sido estandarizar la cuantificación relativa por masa de tejido de la parasitación por *D. folliculorum* procedente de biopsias neoplásicas cutáneas de la zona periocular mediante técnicas de amplificación molecular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se desarrolló una PCR cuantitativa a tiempo real para la detección del parásito *D. folliculorum*. Para la puesta a punto de la técnica, se utilizaron 3 controles positivos del parásito, obtenidos e identificados mediante visualización directa en microscopio óptico a partir de muestras de pestañas procedentes de pacientes con blefaritis crónica. Cada control positivo constó de tres ejemplares completos y adultos (figura 1). También se utilizaron tres controles negativos de biopsias procedentes de tejidos profundos. Los controles positivos y negativos fueron almacenados a -20°C hasta su procesamiento. Se utilizó un sistema manual de extracción de ácidos nucleicos en columnas

de sílica (ISOLATE Genomic DNA Spin Column- Bioline), apto también para para la extracción a partir de tejidos sólidos. Para el desarrollo de la técnica, se utilizaron cebadores diseñados y dirigidos a detectar la secuencia diana específica 18S ARNr (KF745889.1). El sistema de detección utilizado fue mediante una sonda TaqMan con un fluoróforo FAM unido al extremo 5' y un extintor de señal (*Quencher*) al extremo 3'. El diseño de cebadores y sonda se realizó con la aplicación informática Primer Express 3.0 (Applied Biosystem). La especificidad del amplificación fue validado mediante BLAST frente a la base de datos de nucleótidos NCBI. La validez de los oligos (cebadores y sonda) fueron confirmados mediante el software *on line* Oligo Calculator versión 3.26. Como control de extracción y amplificación se utilizaron cebadores y sonda TaqMan para la detección del gen humano de la ARNasa P. Las secuencias de oligonucleótidos y sonda para la detección de *D. folliculorum* fueron: sense: CGAGGATCTATTGGAGGGCAAGT; antisense: GAACTGAGATCAACTACGAGCT; sonda: [6FAM]AGCCGCGGTAATTCCA[BQH1a]. Las secuencias de oligonucleótidos para la detección del gen de la ARNasa P fueron: sense: AGATTGGACCTGCGA-GCG; antisense: GAGCGGCTGTCTCCCAAGT; sonda: [6FAM]TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG[BQH1a]. La plataforma utilizada para el análisis por PCR fue el termociclador a tiempo real 7500 Fast (Applied Biosystems), con el siguiente programa de temperaturas: 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 95°C 15 segundos, 55°C 25 segundos y 72°C 30 segundos. El DNA de los tres controles positivos se extrajo mediante el sistema en columna anteriormente mencionado, obteniéndose 100 µl de eluido. El volumen total de cada reacción fue de 25 µl, compuesto de 12,5 µl de Master Mix 2X (Promega), 1 µl de mezcla de cebadores a concentración 10 mM, 1 µl de solución ROX, 0,5 µl de sonda TaqMan específica (Sigma-Aldrich), 5 µl de agua libre de ARNasa y 5µl de eluido de extracción. El amplicón obtenido

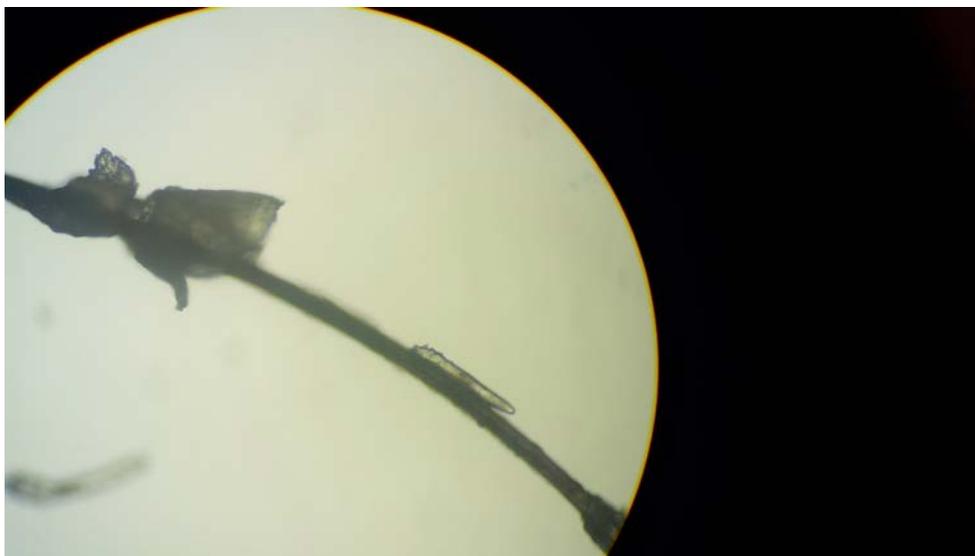


Figura 1 | Ejemplar adulto de *Demodex folliculorum* sobre pestaña de paciente con blefaritis crónica tomado como control positivo (40x).

por los controles mediante la PCR, fue secuenciado por el secuenciador automático 3500 Series Genetic Analyzers (Applied Biosystems) y comparado con la base de datos del GenBank del NCBI para confirmar la especificidad de la reacción. El amplicón de los controles positivos fue cuantificado mediante espectroscopia (Qubit 3.0 fluorometer, life technologies), realizando una curva patrón con 5 puntos de concentraciones: 10 copias/ μ l, 100 copias/ μ l, 1.000 copias/ μ l, 10.000 copias/ μ l y 100.000 copias/ μ l. La sensibilidad se estableció con el número mínimo de copias capaz de detectar la PCR, mediante diluciones seriadas de concentraciones conocidas analizadas por triplicado. Las concentraciones que se utilizaron para determinar la sensibilidad fueron 1, 5, 10, 100 y 1000 copias/ μ l. Finalmente, la técnica se testó con una serie piloto de 46 muestras de biopsias cutáneas parafinadas aportadas por anatomía patológica procedentes de pacientes con lesiones de carcinoma basocelular de áreas perioculares de presentación clínica nodular. Las muestras consistieron en 15 cortes de 15 μ m de grosor de una superficie de 1 cm² equivalente a 22,5 mg de tejido aproximadamente, que se desparafinaron mediante disolución con xilol durante 30 minutos y centrifugación 1 minuto a 11.000 g. El producto desparafinado se incubó a 56°C durante 24 horas en tubo cerrado con 200 μ l de solución de lisis para optimizar el rendimiento en la extracción de biopsias de tejidos sólidos. La densidad parasitaria se expresó en número de amplicones por cada 1,125 mg de muestra sólida (22,5 mg/20= 1,125 mg, debido a que en cada reacción se utilizó 5 μ l de eluido de los 100 μ l obtenidos). Los resultados cuantitativos se obtuvieron mediante la variable CT (*cycle threshold*= ciclo umbral) en comparación a la curva patrón, calculados por el software de la plataforma 7500 Fast. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado en la misma reacción, una para la determinación de *D. folliculorum* y otra para detección de la ARNasa P como control de extracción y amplificación en la reacción. Las muestras presuntamente positivas fueron secuenciadas y cotejadas con la base de datos del NCBI.

RESULTADOS

Los tres controles positivos identificados mediante microscopía óptica, fueron también amplificados e identificados mediante la PCR desarrollada. La secuenciación de los amplicones mostró una homología del 100% con el alineamiento de la secuencia KF745889.1 de la base de datos del GenBank correspondiente a *D. folliculorum*. Los tres controles negativos, lo fueron también mediante PCR. La curva patrón utilizada para la cuantificación mostró valores de CT (*cycle threshold*= ciclo umbral) de 17,13; 21,51; 25,05; 27,58 y 30,61 para las concentraciones de 100.000, 10.000, 1.000, 100 y 10 copias/ μ l respectivamente. Las concentraciones de 10, 100 y 1000 copias/ μ l para determinar la sensibilidad fueron detectadas en los tres análisis por triplicado. Las concentraciones de 1 y 5 copias/ μ l se detectaron por la PCR en uno de los análisis realizados por triplicado, no detectándose en dos de las tres reproducciones. Por tanto, el límite de detección se situó entre 1 y 10 copias/ μ l.

Veintiséis de las 46 muestras de biopsias analizadas

(56,52%) correspondieron a hombres. La media de edad fue de 66,38 años (DE= 13,1) con una mediana de 67,4 y un rango de entre 35,8 y 89,7 años. La presencia del parásito *D. folliculorum* se detectó en el 50% (23/46) de las muestras. El 57% de los casos de hombres fueron positivos (15/26) y el 40% de los casos de mujeres fueron positivos (8/20). La densidad media de los tres controles positivos fue de 1213 amplicones por cada tres ejemplares adultos. La densidad media entre las muestras positivas fue de 308,65 amplicones por cada 1,125 mg de tejido (DE= 560,71) con una mediana de 87,35 y un rango de entre 10,82 y 2560,74 amplicones por cada 1,125 mg de tejido sólido de la lesión. Las 23 muestras positivas fueron confirmadas mediante secuenciación, por lo que la especificidad de la técnica se consideró del 100% en la serie analizada. Las 46 muestras amplificaron para el gen de la ARNasa P en los pocillos correspondientes a control de extracción y amplificación.

DISCUSIÓN

La implicación de *D. folliculorum* en algunas enfermedades de piel como la rosácea o blefaritis crónica está suficientemente demostrada por numerosos estudios^{1,2,4-6}. Sin embargo, a pesar de ciertos indicios y sospechas de su relación con el desarrollo de enfermedades malignas como en cáncer basocelular, actualmente no está claramente demostrado. El parásito vive de forma saprofita en número controlado en los folículos pilosos de un importante porcentaje de individuos sanos⁹ y cuya infestación y densidad se relaciona directamente proporcional con la edad¹⁰. Posiblemente su hiperparasitación descontrolada es lo que por un lado se relaciona con algunas enfermedades⁶ y por otro se sospecha su implicación en el desarrollo de ciertos tipos de CB⁸. La clave esencial para poder establecer una relación directa de la presencia y densidad del parásito con ciertas enfermedades, sería disponiendo de una herramienta diagnóstica precisa y exacta que permitiera reproducir resultados y obtener datos estadísticos que de forma objetiva pueda relacionar el parásito con enfermedad de forma significativa e inequívoca. Los resultados obtenidos en el presente estudio, demuestran que la técnica desarrollada permite detectar y cuantificar la presencia de *D. folliculorum* con una alta sensibilidad y especificidad, siendo capaz de detectar cantidades muy pequeñas de amplicones del parásito, además de mostrar resultados excelentes de especificidad confirmados mediante secuenciación.

En la serie piloto analizada de 46 casos para la puesta a punto de la técnica, se demuestra la presencia del parásito en la mitad de los casos de CB estudiados, y con una densidad variable y en algunos casos considerable respecto a los controles positivos que estaban compuestos de tres ejemplares completos con su ADN extraído de forma limpia sin otro tejido acompañante como en los casos de biopsias. Con ello se demuestra presencia del ácaro en la lesión en la serie estudiada, aunque no su relación, que debiera demostrarse en estudios de casos y controles. En cuanto a datos demográficos, en la presente serie se ha hallado más porcentaje de positivos entre los casos de hombres que mujeres y las edades de mayor frecuencia de

casos son las más avanzadas coincidiendo con la mayoría de los estudios^{10,11}. La técnica del conteo directo presenta limitaciones de reproducibilidad, dependiendo por una parte de la experiencia del observador al microscopio, y por otra de la cantidad de parásitos que se adhieren a la pestaña en el proceso de extracción (los que se detectan por microscopia óptica) y los que se quedan en el folículo piloso (los que no se detectan y producen un sesgo de cuantificación). No obstante, aunque la técnica de PCR de biopsias elimina las limitaciones del conteo directo, ésta no está exenta de otras limitaciones. En este sentido, la estandarización de la cantidad de tejido biopsiado para establecer la densidad relativa al peso es un proceso complejo que requiere entrenamiento y personal cualificado. En primer lugar, se debe elegir con la mayor exactitud la zona de la lesión más representativa y homogénea posible para realizar el corte de la muestra. Además, en los cortes realizados por el microtomo, aunque se seleccione lo mejor posible la zona del tejido parafinado a tomar, siempre contendrá impurezas con restos de parafina que aunque en pequeña proporción influirán en el peso total de la muestra a estudio produciendo pequeñas variaciones en el peso estandarizado, por lo que los datos obtenidos se presumen siempre aproximados. Como se ha mencionado, en la serie piloto estudiada, la presencia de *D. folliculorum* está patente en la mitad de los casos de CB, y a partir de estos datos en estudios posteriores comparativos de casos y controles utilizando la técnica desarrollada, se podría esclarecer la relación causa-enfermedad. Aunque en un estudio reciente no se halló dicha relación¹², no obstante, este estudio no utilizó técnicas de amplificación molecular. A pesar de las limitaciones mencionadas, con los datos obtenidos de la puesta a punto de la técnica, se puede concluir que la técnica de PCR cuantitativa desarrollada presenta una sensibilidad, especificidad y reproducibilidad excelente, por lo que estaría a punto y disponible para utilizarla como herramienta para el estudio de la hipotética relación de la parasitación y su densidad con ciertas enfermedades neoplásicas cutáneas como es el caso del cáncer basocelular de la zona periocular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Cheng AM, Sheha H, Tseng SC. Recent advances on ocular *Demodex* infestation. *Curr Opin Ophthalmol* 2015; 26(4):295-300.
2. Laspina F, Samudio M, Arrúa M, Sanabria R, Fariña N, Carpinelli L, et al. *Demodex* spp in chronic blepharitis patients. *Rev Chilena Infectol* 2015; 32(1):37-42.
3. Kosik-Bogacka DI, Łanocha N, Łanocha A, Czepita D, Grobelny A, Zdziarska B, et al. *Demodex folliculorum* and *Demodex brevis* in healthy and immunocompromised patients. *Ophthalmic Epidemiol* 2013; 20(3):159-63.
4. Sattler EC, Hoffmann VS, Ruzicka T, Braunmühl TV, Berking C. Reflectance confocal microscopy for monitoring the density of *Demodex* mites in patients with rosacea before and after treatment. *Br J Dermatol* 2015; 173(1):69-75.
5. Rivera N, Molina P, Torres A. Measurement of the index of infection by *Demodex* spp in patients with chronic blepharitis and in patients without other ocular diseases. *Rev Chilena Infectol* 2013; 30(5):494-501.
6. Casas C1, Paul C, Lahfa M, Livideanu B, Lejeune O, Alvarez-Georges S et al. Quantification of *Demodex folliculorum* by PCR in rosacea and its relationship to skin innate immune activation. *Exp Dermatol* 2012; 21(12):906-10.
7. Ravera I, Altet L, Francino O, Bardagi M, Sánchez A, Ferrer L. Development of a real-time PCR to detect *Demodex canis* DNA in different tissue samples. *Parasitol Res* 2011; 108(2):305-8.
8. Erbagci Z, Erbagci I, Erkiliç S. High incidence of demodicidosis in eyelid basal cell carcinomas. *Int J Dermatol* 2003; 42(7):567-71.
9. Wesolowska M, Knysz B, Reich A, Blazejewska D, Czarnecki M, Gladysz A, et al. Prevalence of *Demodex* spp. in eyelash follicles in different populations. *Arch Med Sci* 2014; 10(2):319-24.
10. Hom MM, Mastrota KM, Schachter SE. *Demodex*. *Optom Vis Sci* 2013; 90(7):e198-205.
11. Rodríguez AE, Ferrer C, Alió JL. Chronic blepharitis and *Demodex*. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2005; 80:635-42.
12. Talghini S, Fouladi DF, Babaeinejad S, Shenasi R, Samani SM. *Demodex* Mite, Rosacea and Skin Melanoma; Coincidence or Association?. *Turkiye Parazit Derg* 2015; 39(1):41-6.