

Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera

A. I. TORANZO¹, I. N. TIRABOSCHI², N. FERNÁNDEZ², B. IBARRA-CAMOU¹, M. C. RIVAS¹,
W. LEE¹, G. DAVEL¹, C. E. CANTEROS^{1*}

¹Departamento Micología, INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán". Av. Vélez Sarsfield 563 (1281) Ciudad Autónoma de Buenos Aires; ²División Infectología, Hospital de Clínicas "José de San Martín", Universidad de Buenos Aires.
Av. Córdoba 2351 (1120) Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

*Correspondencia. E-mail: ccanteros@anlis.gov.ar

RESUMEN

Se evaluó el uso de sangre entera para el diagnóstico molecular de histoplasmosis utilizando un método artesanal de extracción de ADN fúngico y una PCR anidada que amplifica una porción del gen HcP100 específica de *Histoplasma capsulatum*. La sangre entera se trató con litocasa, enzima lisante de *Trichoderma harzianum* y proteinasa K, seguido de una extracción fenólica. Este tratamiento permitió una lisis completa de las células, mostró buen rendimiento en la obtención de ADN y posibilitó la detección de la banda de 210 pb específica de *H. capsulatum* en la PCR anidada. El límite de detección fue de 0,25-1 levaduras/ml de sangre. El método se evaluó en 31 muestras de sangre de 19 pacientes con diagnóstico microbiológico de histoplasmosis, en 21 muestras de pacientes con otras micosis o infecciones por micobacterias y en 30 controles sanos. La PCR fue positiva en sangre para 17/19 pacientes con histoplasmosis (14/15 inmunocomprometidos y 3/4 sin inmunocompromiso aparente). Las muestras de sangre de los 30 controles sanos y de 20 pacientes con otras patologías fueron negativas, sólo hubo un falso positivo correspondiente a un paciente con infección por *Mycobacterium avium-intracellulare*. El método presentó 89% de sensibilidad y 96% de especificidad para el diagnóstico de histoplasmosis en sangre entera.

Palabras clave: histoplasmosis, PCR, diagnóstico molecular, sangre entera

ABSTRACT

Molecular diagnosis of human histoplasmosis in whole blood samples. To assess the value of using whole blood samples for the molecular diagnosis of histoplasmosis, we applied an in-house DNA extraction method and a nested PCR targeting a 210 bp specific segment of the *Histoplasma capsulatum* HcP100 gene. A whole blood volume of 2.5-3 milliliters was centrifuged and the cellular pellet was treated with *Trichoderma harzianum* lyticase and proteinase K prior to applying a conventional phenol DNA extraction. This procedure allowed complete cell lysis, high DNA yield and specific amplification. The PCR detection limit was 0.25-1 yeast cells/ml of blood sample. The method was assessed on 31 blood samples from 19 patients with microbiological diagnosis of histoplasmosis, 30 healthy persons and 21 patients with other mycoses or mycobacterial diseases. Positive results were obtained in samples from 17/19 patients with histoplasmosis (14/15 immunocompromised and 3/4 without known immunological disorder). Blood samples from the 30 healthy controls and 20 patients with other conditions proved negative; the only false positive result was obtained from a patient with *Mycobacterium avium-intracellulare* infection. With 89% sensitivity and 98% specificity, this molecular method for detection of the agent in blood shows promising for the rapid diagnosis of human histoplasmosis.

Keys words: histoplasmosis, PCR, molecular diagnosis, whole blood sample

INTRODUCCIÓN

Histoplasma capsulatum var. *capsulatum* es el agente etiológico de la histoplasmosis, una enfermedad subaguda o crónica, endémica en el continente americano. En las últimas décadas se observó un aumento de la frecuencia de esta enfermedad mayormente atribuible a la población de pacientes inmunocomprometidos, ya sea por infección con el VIH o por recibir tratamientos

inmunosupresores a causa de trasplante de órganos, enfermedades oncohematológicas o collagenopatías (7).

Según datos de la Red Nacional de Laboratorios de Micología de Argentina, la histoplasmosis ocupa el cuarto lugar entre las micosis profundas diagnosticadas en el país (5) y es la segunda micosis sistémica potencialmente fatal asociada al SIDA (13).

Los pacientes inmunocomprometidos desarrollan formas diseminadas de la enfermedad por infección recién

te o reactivación de una infección preexistente; de no ser tratadas, estas formas tienen un mal pronóstico. Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre, astenia, anorexia, pérdida de peso, anemia, hepatoesplenomegalia, patología intersticial pulmonar y lesiones mucocutáneas, cuadro clínico que se asemeja al producido por infecciones de otras etiologías. Los pacientes con SIDA pueden presentar, además, otras patologías asociadas a la histoplasmosis, lo que dificulta el diagnóstico (14).

Cuando los pacientes presentan manifestaciones mucocutáneas, el diagnóstico puede realizarse rápidamente por observación microscópica de *H. capsulatum* en frotis o biopsias de lesiones utilizando coloraciones como Giemsa, ácido peryódico de Schiff o metenamina de plata; en estos casos la sensibilidad está limitada por la calidad de la muestra clínica y el entrenamiento del operador. Si las lesiones en la piel o en las mucosas están ausentes, se puede recurrir al hemocultivo por lisis-centrifugación, método que posee alrededor de un 70% de sensibilidad. En el resto de los casos son necesarias técnicas invasoras, como el lavado broncoalveolar (BAL) o las biopsias quirúrgicas (14). El diagnóstico definitivo se basa en el aislamiento del hongo en medios de cultivo donde desarrolla aproximadamente entre los 10 y 20 días. Sin embargo, en ocasiones el hongo no produce los conidios característicos de la fase micelial o presenta morfologías coloniales aberrantes, lo que dificulta, demora o impide su identificación (18). Por otra parte, el manejo en el laboratorio de los cultivos de este hongo es riesgoso y requiere el uso de instalaciones y prácticas correspondientes a los microorganismos de nivel de bioseguridad 3 (17).

Existen métodos alternativos de diagnóstico basados en la detección de antígenos y anticuerpos en suero. La presencia de anticuerpos depende del estado inmunológico del hospedero, y en la histoplasmosis asociada al SIDA sólo el 40% de los pacientes tienen serología positiva (14). La técnica de enzoinmunoanálisis (EIA) para detectar antígeno glicoproteico de *H. capsulatum* en suero u orina se considera la más sensible en inmunodiagnóstico. Sin embargo, no se dispone de reactivos comerciales que cumplan con las características analíticas requeridas para su uso en diagnóstico (9). Además, el desarrollo de este método en los laboratorios hospitalarios resulta trabajoso, de difícil estandarización y validación (10).

Recientemente, se describieron métodos moleculares basados en diferentes técnicas de PCR, herramienta sencilla y prometedora para el diagnóstico rápido de esta micosis. Tanto la PCR anidada como la PCR en tiempo real (RT-PCR) fueron probadas sobre diferentes especímenes clínicos (1-3, 11); sin embargo, el uso de sangre entera no se evaluó sistemáticamente en el diagnóstico. La búsqueda de ADN de *H. capsulatum* en sangre podría aumentar el número de casos diagnosticados, al tratarse de un material clínico de fácil obtención com-

parado con el BAL o con las biopsias quirúrgicas. Por lo expuesto, fue nuestro objetivo desarrollar un método molecular rápido de diagnóstico de histoplasmosis a partir de sangre periférica basado en una extracción artesanal del ADN y una PCR anidada previamente descrita.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras clínicas

Se analizaron 31 muestras de sangre entera procedentes de 19 pacientes con diagnóstico microbiológico de histoplasmosis realizado entre diciembre de 2005 y enero de 2008. Todos los pacientes residían en el área de la Argentina más endémica para histoplasmosis (llanura del Río de la Plata) o la habían visitado. La primera muestra de cada paciente se tomó en el día uno o no más de 10 días después del diagnóstico. En 6 pacientes fue posible seguir la respuesta al tratamiento tomando muestras de sangre consecutivas con intervalos superiores a un mes a partir del momento del diagnóstico. Las muestras de sangre (3-4 ml) fueron recolectadas en tubos con EDTA como anticoagulante y mantenidas a una temperatura de entre 4 y 7 °C hasta la extracción del ADN.

En 10 de estos pacientes también se analizaron por PCR otros materiales clínicos: tres cortes histológicos de biopsia, siete sueros, dos BAL y un esputo. En la Tabla 1 se describen las muestras analizadas para cada paciente con histoplasmosis.

Para determinar la especificidad diagnóstica se analizaron 30 muestras de sangre de voluntarios sanos y 21 muestras de individuos con otras afecciones, a saber: cuatro pacientes con diagnóstico confirmado de infección fúngica invasora (una neumocistosis, una criptococosis, una coccidioidomicosis y una aspergilosis), ocho con otras enfermedades infecciosas (cuatro tuberculosis diseminadas, una actinomicosis pulmonar con fistulas en la piel, una infección por *Mycobacterium-avium intracellulare* (MAI) y dos meningitis asociadas a recambio de válvula) y nueve pacientes con diferentes patologías, sin signos ni síntomas clínicos, como así tampoco antecedentes epidemiológicos o estudios microbiológicos que probaran una enfermedad fúngica (seis tenían collagenopatías con lesiones en la mucosa o piel, dos neutropenia febril y uno sarcoma de Kaposi).

Muestra simulada

Para evaluar el límite de detección del método de extracción artesanal de ADN se utilizó sangre recolectada en tubos con EDTA de un voluntario sano. A partir de una suspensión de 10^6 levaduras/ml de *H. capsulatum* (cepa 02426) se realizaron diluciones sucesivas en factor 10 hasta obtener una concentración de entre 1-4 levaduras/ml. Los tubos con 3 ml de sangre del voluntario sano fueron inoculados con 1 ml de cada una de las diluciones. De esta manera, la concentración de levaduras/ml en cada tubo fue de $2,5 \times 10^5$; $2,5 \times 10^4$; $2,5 \times 10^3$; $2,5 \times 10^2$; 25; 2,5 y 0,25-1. Se incluyó un tubo con sangre entera libre de levaduras como control negativo.

ADN de microorganismos

Para la estandarización de la técnica de PCR se utilizó ADN purificado de dos cepas clínicas de *H. capsulatum* (062775 y 02426). Posteriormente, la técnica se probó sobre ADN purificado de diez aislamientos clínicos de *H. capsulatum* obtenidos entre 2002 y 2007.

Para determinar la especificidad analítica se utilizó ADN de otras especies fúngicas comúnmente involucradas en infecciones sistémicas y de micobacterias. Los ácidos nucleicos de *Coccidioides* sp. (n=5), *Paracoccidioides brasiliensis* (n=1) y *Blastomyces dermatitidis* (n=1) fueron obtenidos en el Servicio Micosis Profundas del Departamento Micología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán" siguiendo las normativas de bioseguridad

recomendadas por el centro de control de enfermedades de Atlanta, EE.UU. para el manejo de estos patógenos (17).

La extracción y purificación del ADN de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis* se efectuó a partir de cultivos de 84 h en agitación orbital (120 rpm) a 37 °C (fase levaduriforme) en caldo GYE (glucosa 2%, extracto de levadura 1%), utilizando las técnicas descritas por Möller *et al.* (12) y Perrotta *et al.* (15). El ADN de *Coccidioides* spp. se extrajo a partir de esférulas obtenidas en el medio de Converse a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 10% (8). Las esférulas, previamente inactivadas con timerosal 1%, fueron lavadas con alcohol 70° y posteriormente con agua bidestilada. El paquete de células fúngicas se separó por centrifugación a 5000 g durante 10 min. La extracción y purificación del ADN se realizó siguiendo el protocolo del equipo comercial DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemania), luego del tratamiento con 200 U de litocasa durante 2 h a 30 °C. Los ácidos nucleicos de los hongos dimorfos fueron conservados en buffer TE (10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 8,0) a -20 °C hasta su utilización.

Los ácidos nucleicos purificados de los patógenos oportunistas *Cryptococcus neoformans* (n= 5), *Candida* spp. (n=5) y *Aspergillus* spp. (n=5) fueron cedidos por los Laboratorios de Levaduras y de Hongos Miceliales del Departamento Micología. Los ADN de *Mycobacterium tuberculosis* (n=4), *M. avium* (n=4), *M. intracellulare* (n=4), *M. kansasii* (n=2), *M. bovis* (n=1), *M. peregrinum* (n=1), *M. fortuitum* (n=1), *M. simiae* (n=1) y *M. chelonae* (n=1) fueron gentilmente cedidos por el Servicio Micobacterias del Departamento Bacteriología del INEI-ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán".

Extracción de ADN de muestras clínicas y simuladas

Sobre el volumen total de cada muestra de sangre de paciente o simulada se realizó un método de extracción artesanal, brevemente descrito a continuación. La sangre de cada tubo se centrifugó a 2500 g durante 10 min a 5 °C y se eliminó el plasma. Sobre el paquete celular lavado dos veces con buffer TE, se realizó un pretratamiento con 6,5 µl de litocasa y 83 µl de enzima lisante de *Trichoderma harzianum* (6 µg/µl) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE.UU.) en buffer sorbitol durante 2 h a 25 °C. Luego se realizó un tratamiento con solución de lisis: 500 mM EDTA, 1% [p/v] N-laurylsarcosina (Sigma) y 0.5 mg/ml proteinasa K (Gibco BRL, Grand Island, NY, EE.UU.), durante 2 h a 55 °C y 16 h a 37 °C (4). Finalmente, se realizó una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y el ADN se resuspendió en 50 µl de buffer TE.

Cada vez que se procesó una muestra de sangre se incluyó un control negativo (sangre entera libre de levaduras) y un control positivo (sangre entera con levaduras).

En suero, esputo y BAL, donde se dispuso de volúmenes de entre 1,5 y 5 ml, el ADN fúngico se extrajo utilizando el método artesanal.

Las biopsias de tejido incluidas en parafina fueron cortadas en fragmentos de entre 3 y 5 µm de espesor, desparafinadas y sometidas a tres ciclos de frío-calor antes de ser procesadas utilizando el equipo comercial DNeasy Tissue Kit (Qiagen) (1).

PCR anidada

Se utilizaron los cebadores diseñados por Bialek *et al.*, basados en la secuencia de ADN que codifica para la proteína de 100 kDa involucrada en el proceso de infección y supervivencia del hongo dentro de la célula del hospedero (1). Los cebadores externos Hc I (5'-GCG TTC CGA GCC TTC CAC CTC ACC-3') y Hc II (5'-ATG TCC CAT CGG GCG CCG TGT AGT-3') delimitan una secuencia de 391 pb. Los cebadores internos Hc III (5'-GAC ATC TAG TCG CGG CCA GGT TCA-3') y Hc IV (5'-AGG AGA GAA CTG TAT CGG TGG CTT G-3') delimitan una secuencia de 210 pb.

La PCR se estandarizó a las condiciones de nuestro laboratorio con leves modificaciones del protocolo original. Para un

volumen final de 25 µl se utilizó 2 mM cloruro de magnesio, 200 µM dNTPs, 1 U *Taq* polimerasa (Invitrogen, Tech-line Life, CA, EE.UU.), 0,1% de albúmina bovina fracción V (Sigma), 1 µM de iniciadores Hc I y Hc II y 2 µl de muestra extraída. El programa de amplificación usado fue 94 °C 5 min, 35 ciclos (94 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C 1 min) y una extensión final de 72 °C 5 min. Con 2 µl del producto de la primera amplificación se realizó la segunda PCR (anidada), donde se disminuyó el cloruro de magnesio a 1 mM en la mezcla y se utilizaron los iniciadores Hc III y Hc IV a una concentración 1 µM. El programa de amplificación de la anidada fue 94 °C 5 min, 35 ciclos (94 °C 30 s, 67 °C 30 s, 72 °C 1 min) y una extensión final de 72 °C 5 min. Las reacciones se realizaron en un termociclador iCycler (BioRad, CA, EE.UU.). Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa 2% en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 2 mM, pH 8,5), teñidos con bromuro de etidio (10 µg/ml) y fotodocumentados (BioRad Gel Doc 1000, CA, EE.UU.). Como estándar de pares de bases se utilizó 100 bp DNA Ladder (Invitrogen).

Para cada material clínico la reacción de PCR se realizó por duplicado: en un tubo se agregó el ADN de la muestra y en el segundo, además del ADN del material clínico, 1 µl de ADN de *H. capsulatum* (10 ng/µl), este segundo tubo nos permitió evaluar la presencia de inhibidores de PCR. Cada vez que se realizó una PCR en muestras de sangre se incluyeron controles positivos, controles negativos y el control de inhibición.

La técnica de PCR para cada material clínico y para las muestras simuladas se realizó por duplicado, de forma independiente por dos operadores.

Análisis de los resultados

Los datos clínicos y de laboratorio de los pacientes fueron volcados en una planilla elaborada en Excel y se realizó un análisis descriptivo de los resultados. Se registró la edad y el sexo de los pacientes y los resultados de las muestras según la condición de inmunocompromiso. Se calculó la sensibilidad y la especificidad diagnóstica del método evaluado.

RESULTADOS

La población estudiada incluyó 12 pacientes de sexo masculino (63%) y 7 de sexo femenino (37%) con diagnóstico microbiológico de histoplasmosis. Las edades oscilaron entre 10 y 76 años (mediana 42 años). Quince pacientes eran inmunocomprometidos [10 VIH (+) y 5 con otras enfermedades inmunodebilitantes o antecedentes de tratamientos prolongados con corticoides]. Cuatro no tenían causa conocida de inmunocompromiso. En la Tabla 1 se consignan los pacientes, sus características clínicas, las muestras estudiadas, los métodos de diagnóstico utilizados y el resultado obtenido de cada análisis.

El ADN purificado de las cepas de referencia y de los 10 aislamientos clínicos de *H. capsulatum* mostraron la banda de 391 pb en la primera amplificación y la de 210 pb en la anidada. No hubo amplificación cuando se probó el ADN de las tres especies de hongos dimorfos causantes de micosis endémicas (*Coccidioides* spp., *P. brasiliensis* y *B. dermatitidis*), tampoco cuando se ensayó el ADN de las especies fúngicas oportunistas que pueden producir cuadros sistémicos semejantes al de histoplasmosis. Tampoco se observó amplificación con las 19 muestras de ADN obtenidas de las nueve especies de micobacterias probadas. Estos resultados permi-

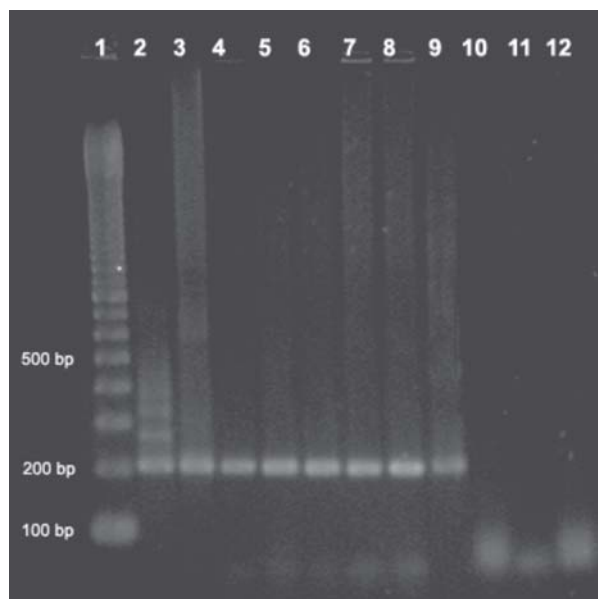


Figura 1. PCR anidada realizada a partir de ADN extraído de muestras de sangre simulada utilizando el método artesanal. 1: 100 bp ADN ladder, 2: ADN de *H. capsulatum* purificado (10 ng/μl), 3: $2,5 \times 10^5$ levaduras/ml, 4: $2,5 \times 10^4$ levaduras/ml, 5: $2,5 \times 10^3$ levaduras/ml, 6: $2,5 \times 10^2$ levaduras/ml, 7: 25 levaduras/ml, 8: 2,5 levaduras/ml, 9: 0,25-1 levaduras/ml, 10: sangre sin levaduras, 11 y 12: controles negativos.

ten determinar que la PCR utilizada tiene una sensibilidad y especificidad analítica de 100%.

El método de extracción artesanal nos permitió obtener ADN fúngico de las muestras de sangre y a partir de otros materiales cuando el volumen fue superior a 1 ml. La PCR anidada realizada sobre el ADN extraído artesanalmente de la sangre entera inoculada con distintas cantidades de levaduras dio un resultado positivo hasta el tubo de sangre inoculado con 1-4 levaduras en el volumen total (concentración final 0,25-1 levaduras/ml) (Figura 1).

La sensibilidad diagnóstica se estableció sobre la base del resultado de la PCR en la sangre de los 19 pacientes con histoplasmosis, sobre la muestra tomada en el momento o no más de 10 días después del diagnóstico microbiológico. La reacción fue positiva en 17 de los 19 pacientes, lo que resulta en una sensibilidad diagnóstica de 89% en muestras de sangre; este porcentaje aumenta a 94% si consideramos solamente a los pacientes inmunocomprometidos, que son aquellos para los que esta metodología tendría mayor aplicación. Entre los pacientes con histoplasmosis y PCR negativa en sangre, un paciente con SIDA tuvo dos muestras sucesivas con resultado negativo, una recolectada en el momento del diagnóstico microbiológico y otra a los 18 días; este paciente fue diagnosticado a partir de un raspado de lesiones en la piel, pero su hemocultivo fue negativo. El otro paciente para el que la PCR resultó negativa no tenía

inmunocompromiso documentado y la histoplasmosis se diagnosticó por cultivo de médula ósea.

En ocho pacientes donde se realizó conjuntamente PCR y hemocultivo, el método molecular detectó 7 de 8 casos de histoplasmosis (87%), mientras que el hemocultivo fue positivo sólo en 3 de 8 (37%).

De las 7 muestras de suero analizadas por PCR, 4 fueron positivas (57%), mientras que las tres muestras de biopsia, los dos BAL y el esputo fueron positivos. En este último material se detectó inhibición, la que se eliminó por dilución 1:2 del material extraído para PCR (Tabla 1).

Ninguna de las 30 muestras de sangre entera de voluntarios sanos resultó positiva. Tampoco fueron positivas las muestras de sangre de los cuatro pacientes con otras micosis, ni la de los nueve pacientes con diferentes patologías sin infección fúngica probada. Sólo en uno de los 8 pacientes con enfermedades infecciosas diferentes de micosis la PCR fue positiva. Este paciente con infección por MAI presentaba un síndrome febril con lesiones papulosas en la cara. La histoplasmosis no se pudo diagnosticar por las metodologías tradicionales: hemocultivo por lisis, directo y cultivo de la escarificación cutánea.

En 6 pacientes donde fue posible realizar un seguimiento del tratamiento utilizando la PCR en muestras de sangre pudimos observar su negativización entre los 2 y 5 meses, resultado que coincidió con la cura clínica. En tres de estos pacientes se reiteró la PCR en sangre después de transcurridos dos meses o más y la reacción se mantuvo negativa (Tabla 2).

DISCUSIÓN

El aumento de la población VIH (+) en nuestro país trajo aparejado un importante incremento de la histoplasmosis. El diagnóstico de esta micosis por métodos microbiológicos mediante el cultivo y la identificación de las cepas demora más de 10 días. Estos métodos tienen una sensibilidad discreta y requieren de infraestructura y equipamiento adecuado para manipular los cultivos de *H. capsulatum* en condiciones de bioseguridad, requisitos que no cumplen la mayoría de los laboratorios de nuestro país. Por otra parte, como mencionamos anteriormente, la detección de anticuerpos circulantes tiene baja sensibilidad en este grupo de pacientes y la técnica de EIA, altamente sensible para la búsqueda de antígenos en orina y suero, sólo se encuentra disponible en los Estados Unidos de Norteamérica (6, 9).

La adaptación de la PCR anidada a las condiciones de nuestro laboratorio demostró tener alta sensibilidad y especificidad analítica y diagnóstica. Esto coincide con lo publicado por Mauboun *et al.* (11), quienes utilizaron la misma técnica de PCR aquí aplicada e informaron 100% de sensibilidad al analizar diversos materiales clínicos, aunque estos autores sólo evaluaron dos muestras de sangre entera. Por su parte, Buitrago *et al.* (3) obtuvieron valores de 78,6% de sensibilidad diagnóstica

Tabla 1. Características de los pacientes con diagnóstico de histoplasmosis y resultados de los estudios micológicos realizados

Paciente	Edad	Sexo	Patología asociada	IDD	Material clínico	E. directo	Cultivo	PCR
1	19	F	Trasplante hepático	ND	Piel	-	+	
					Hemocultivo		-	
					Sangre entera			+
2	62	F	Artritis reumatoidea	+	Piel	+	+	
					Hemocultivo		-	
					Suero			-
					Sangre entera			+
3	61	M	Diabetes	+	Biopsia de pulmón	+	-	+
					Suero			-
					Sangre entera			+
4	10	M	Síndrome de hiper IgE		Biopsia de intestino	+	+	
					Hemocultivo		-	
					Suero			+
					Sangre entera			+
5	55	M	Tratamiento prolongado con corticoides	+	Biopsia de suprarrenal		+	
					Raspado de mucosa	+	+	
					Espujo	+	+	+
					Sangre entera			+
6	42	M	SCCIC	+	LCR	.	+	
					Suero			-
					Sangre entera			+
7	60	F	SCCIC	ND	Biopsia de paladar	+	-	
					Sangre entera			+
8	76	M	SCCIC	ND	MO	-	+	
					Sangre entera			-
9	36	M	SCCIC	ND	BAL	+	+	
					Sangre entera			+
10	40	M	VIH (+)	+	Piel	+	+	
					Hemocultivo		-	
					Sangre entera ⁽¹⁾			-
11	24	M	VIH (+)	-	MO	+	+	
					Hemocultivo		-	
					Sangre entera			+
12	54	M	VIH (+)	+	Raspado de mucosa	+	+	
					Sangre entera			+
13	38	M	VIH (+)	ND	BAL	+	+	+
					Biopsia de pulmón	+	+	
					Sangre entera			+
14	51	F	VIH (+)	ND	Biopsia de duodeno	+	+	
					Sangre entera			+
15	56	F	VIH (+)	ND	BAL	+	+	+
					Biopsia de piel	+	-	+
					Hemocultivo		+	
					Suero			+
					Sangre entera			+
16	33	M	VIH (+)	+	Hemocultivo		+	
					Suero			+
					Sangre entera			+
17	32	F	VIH (+)	+	Hemocultivo		+	
					Sangre entera			+
18	44	M	VIH (+)	ND	Biopsia mucosa nasal	+	+	
					Suero			+
					Sangre entera			+
19	10	F	VIH (+)	ND	Biopsia de piel	+		+
					Sangre entera			+

SCCIC: sin causa conocida de inmunocompromiso; ND: no determinada; ⁽¹⁾ en ese caso se analizó una segunda muestra de sangre pasados 18 días, con igual resultado; IDD: anticuerpos por inmunodifusión; E. directo: examen directo; MO: médula ósea; BAL: lavado broncoalveolar.

Tabla 2. Seguimiento de seis pacientes por PCR en sangre entera

Paciente N°	PCR	Fecha de extracción de sangre
2	+	17/12/2006 ⁽¹⁾
	-	09/03/2007
	-	29/05/2007
3	+	05/12/2006 ⁽¹⁾
	+	12/02/2007
4	+	06/02/2007 ⁽¹⁾
	+	06/06/2007
	-	13/11/2007
	-	17/01/2008
5	+	04/09/2007 ⁽¹⁾
	-	15/01/2008
6	+	01/08/2006 ⁽¹⁾
	+	28/12/2006
	-	07/03/2007
	-	25/06/2007
7	+	01/04/2006 ⁽¹⁾
	-	01/08/2006

⁽¹⁾ Se corresponde con la fecha del diagnóstico microbiológico.

en muestras de suero de 14 enfermos de histoplasmosis utilizando una RT-PCR; la única muestra de sangre entera incluida por estos autores resultó negativa.

Otros métodos de PCR aplicados a muestras de sangre fueron menos sensibles. Bracca *et al.* (2) utilizaron una PCR semianidada dirigida al gen que codifica el antígeno H para analizar 24 muestras de sangre de igual número de pacientes. Sólo 4 resultaron positivas y únicamente en dos casos pudieron corroborar este resultado mediante el diagnóstico microbiológico de histoplasmosis.

La alta sensibilidad que observamos en la PCR diseñada por Bialek *et al.* (1) utilizada en sangre entera podría deberse al volumen de material procesado. Mientras que la mayoría de los autores utilizan métodos comerciales donde los volúmenes de sangre procesados son de hasta 200 µl (3, 11, 16), nosotros partimos de volúmenes 12 a 15 veces mayores, lo que aumentaría las posibilidades de detectar el ADN fúngico. Esto podría ser una ventaja metodológica cuando las muestras clínicas superan 1 ml, no sólo por la cantidad de ADN disponible, sino también porque disminuiría el error de muestreo que se produce en el laboratorio al extraer alícuotas de materiales con una distribución de microor-

ganismos generalmente heterogénea, como ocurre en esputo y BAL.

El 100% de los cortes histológicos analizados mostraron resultados positivos por PCR, mientras que el porcentaje de positividad fue menor para las muestras de suero (57%). Probablemente el bajo porcentaje de resultados positivos observado en éstas se deba a que *H. capsulatum* es intracelular y la cantidad de ADN libre es bajo. Esta observación coincide con la realizada por Buitrago *et al.* (3), quienes detectaron cantidades significativamente inferiores de ADN de *H. capsulatum* en las muestras de suero y plasma en comparación con otras muestras analizadas por PCR cuantitativa.

En los ocho pacientes donde se realizó conjuntamente PCR y hemocultivo, se pudo determinar que la PCR en sangre fue más sensible que el hemocultivo. La sensibilidad de este método también supera la detección de anticuerpos en pacientes inmunocomprometidos y sería comparable con la descrita para la detección de antígenos circulantes por EIA (9), aunque se trata de una técnica más fácil de estandarizar.

Es importante recalcar la utilización de control de inhibición en cada una de las determinaciones, ya que nuestra experiencia nos permitió evidenciar la presencia de inhibidores en la muestra de esputo.

La PCR podría ser utilizada como un parámetro más para seguir la evolución del tratamiento de la histoplasmosis puesto que, en los casos en los que nos fue posible realizar este seguimiento del paciente, observamos correlación entre la cura clínica y la negativización de la reacción.

La notable reducción en el tiempo de diagnóstico lograda con estas técnicas moleculares (que sólo demandan entre 3 y 4 días) significaría una mejora en la supervivencia de los pacientes por la posibilidad de implementar rápidamente las terapias adecuadas. La disminución del riesgo biológico para el personal de laboratorio permitiría, además, ampliar la cobertura diagnóstica de la enfermedad y hacerla en centros donde las condiciones de bioseguridad necesarias para trabajar con cepas vivas de *H. capsulatum* no estén dadas.

Es preciso destacar que la PCR anidada requiere una serie de cuidados en el manejo del material para evitar la contaminación con amplicones que pueden ser la causa de falsos resultados positivos. Estos amplicones se eliminan del ambiente de trabajo con irradiación de luz ultravioleta (UV) antes de la extracción y de agregar los templados a la mezcla de reacción. Para evitar estas contaminaciones, la mezcla se realizó en un laboratorio apartado ediliciamente del resto y el agregado de templado de la primera y segunda PCR se realizó en laboratorios independientes, previamente irradiados con luz UV. Por el momento, estos cuidados dificultan la transferencia del método a laboratorios asistenciales. Las RT-PCR recientemente descritas son más sencillas y no presentan el problema de contaminación (3, 11). Dada la

eficiencia demostrada por el método de extracción artesanal de ADN descrito, a futuro éste se podría utilizar combinado con una RT-PCR; de esa manera se evitaría el problema de las contaminaciones y esto lo haría más atractivo para el diagnóstico de rutina en los laboratorios hospitalarios.

Nuestro estudio es el primero que evalúa sistemáticamente el uso de sangre periférica para el diagnóstico de histoplasmosis en un número considerable de pacientes. Los datos permiten concluir que la metodología aquí expuesta, extracción de ADN usando un método artesanal y PCR anidada para detectar ADN de *H. capsulatum*, es sensible y específica para el diagnóstico rápido de histoplasmosis a partir de muestras de sangre entera, especialmente cuando se incluyen controles internos para detectar inhibición.

Esta metodología tiene su mayor potencial en el diagnóstico presuntivo de histoplasmosis en pacientes con inmunocompromiso grave. Los laboratorios asistenciales que posean la infraestructura adecuada para desarrollar procedimientos de biología molecular podrían implementar la técnica para el diagnóstico rápido de esta micosis.

Cabe enfatizar, no obstante, que los métodos moleculares deben ser validados a través de estudios multicéntricos donde un importante número de muestras permita determinar su robustez. Por el momento, el diagnóstico definitivo de la enfermedad debe realizarse por la metodología microbiológica clásica que comprende el examen directo, el cultivo y la serología.

Agradecimientos: los autores agradecen a la Dra. Viviana Ritacco por la revisión crítica de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling, Robertson V, Knobloch J *et al.* Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 1644-7.
2. Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gomez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 1753-5.
3. Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25: 16-22.
4. Canteros CE, Zuiani MF, Ritacco V, Perrotta DE, Reyes-Montes MR, Granados J *et al.* Electrophoresis karyotype and chromosome-length polymorphism of *Histoplasma capsulatum* clinical isolates from Latin America. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; 45: 423-8.
5. Davel G, Canteros C y participantes del Programa Nacional de Control de Calidad en Micología. Situación de las micosis en la República Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2007; 39: 28-33.
6. Gutiérrez ME, Canton A, Connolly P, Zarnowski R, Wheat JL. *Histoplasma* antigen detection in panamanian patients with disseminated histoplasmosis and AIDS. *Clin Vaccine Immunol* 2008; 15: 681-3.
7. Kauffman CA. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 115-32.
8. Kwon-Chung KJ, Bennett JE. Coccidioidomycosis. En: Kwon-Chung KJ, Bennett JE, editors. *Medical Mycology*, Philadelphia- London, Lea & Febiger, 1992, p. 356-96.
9. LeMonte A, Egan L, Connolly P, Durkin M, Wheat LJ. Evaluation of the IMMY ALPHA *Histoplasma* antigen enzyme immunoassay for diagnosis of histoplasmosis marked by antigenuria. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 802-3.
10. Lindsley MD, Holland HL, Bragg SL, Hurst SF, Wannemuehler KA, Morrison CJ. Production and evaluation of reagents for detection of *Histoplasma capsulatum* antigenuria by enzyme immunoassay. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 700-9.
11. Maubon D, Simon S, Aznar C. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58: 441-4.
12. Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 6115-6.
13. Negroni R, Helou SH, López-Daneri G, Robles AM, Arechavala AI, Bianchi MH. Interrupción de la profilaxis secundaria antifúngica en la histoplasmosis asociada a SIDA. *Rev Iberoam Micol* 2004; 21: 75-8.
14. Negroni R. Micosis sistémicas tropicales asociadas a SIDA. *Enf Emerg* 2003; 5: 27-40.
15. Perrotta D, Abrantes R, Canteros C, Roderio L, Davel G. Caracterización molecular de aislamientos clínicos de *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* mediante RAPD-PCR. *Rev Argent Microbiol* 2001; 33: 160-6.
16. Rickerts V, Bialek R, Tintelnot K, Jacob V, Just-Nübling G. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21: 821-3.
17. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Services, Centers for Disease Control and Prevention, and National Institutes of Health. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. En: Fleming D, Richardson JH, Tulis JJ, Vesley D, editors. *Laboratory Safety Principles and Practices*. Washington D.C., ASM Press, 1995, p. 293-354.
18. Zuiani MF, Rivas MC, Lee W, Guelfand L, Davel G, Canteros CE. *Histoplasma capsulatum* con morfología aberrante aislado en Argentina. *Rev Argent Microbiol* 2006; 38: 79-83.