

# Evaluación de una técnica de PCR cuantitativa para el diagnóstico clínico de la histoplasmosis importada

María José Buitrago, Alicia Gómez-López, Araceli Monzón, Juan Luis Rodríguez-Tudela y Manuel Cuenca-Estrella

Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Madrid. España.

**OBJETIVOS.** Valoración de la utilidad de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (PCR-TR) para el diagnóstico de histoplasmosis en muestras clínicas.

**MÉTODOS.** Para el diseño de los iniciadores y de las sondas se analizaron las secuencias de las regiones ITS (*internal transcriber spacers*) del ADN ribosómico de 20 cepas de *Histoplasma capsulatum*. Se empleó la tecnología LightCycler (Roche Applied Science) y la sonda fue diseñada mediante el sistema Fluoresce Resonance Energy Transfer (FRET). Se realizaron estudios de reproducibilidad, sensibilidad y especificidad. Además, se incluyó un sistema de control interno para reconocer falsos negativos por inhibición de la reacción de PCR. Tras ello, se testó la técnica en 22 muestras clínicas procedentes de 14 pacientes diagnosticados de histoplasmosis probada. Además se analizaron 30 muestras de control, procedentes de enfermos con otras micosis, de pacientes con neutropenia febril y de voluntarios sanos.

**RESULTADOS.** El límite de detección de la técnica fue de 1 fg de ADN fúngico por  $\mu\text{l}$  de muestra. Así mismo fue reproducible y muy específica. La técnica fue positiva en 11 de los 14 enfermos (78,6%) y en 17 de las 22 muestras analizadas (77,3%). Por muestras, el 100% de las muestras respiratorias y de los aspirados de médula ósea fueron positivos, pero sólo el 70% de los sueros ( $p < 0,01$ ). La cantidad media de ADN detectado en suero fue de  $23,1 \text{ fg}/\mu\text{l}$ , mientras que en muestras respiratorias y aspirados medulares fue de  $4,85 \times 10^3 \text{ fg}/\mu\text{l}$  ( $p < 0,01$ ). La técnica de PCR-TR fue positiva en suero de 3 enfermos por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) positivos, en los que la detección de anticuerpos por inmunodifusión fue negativa. La especificidad fue del 100%, ya que ninguna de las muestras de control dio un resultado positivo.

**CONCLUSIÓN.** Esta técnica de PCR-TR es un método sensible y específico para el diagnóstico rápido de histoplasmosis, sobre todo en muestras respiratorias y aspirados de médula ósea. La sensibilidad en suero es inferior, pero puede ser complementaria al cultivo y a la serología en enfermos VIH positivos.

**Palabras clave:** *Histoplasma capsulatum*. Serología. VIH positivo. Diagnóstico molecular.

Assessment of a quantitative PCR method for clinical diagnosis of imported histoplasmosis

**OBJECTIVE.** Evaluation of the usefulness of a quantitative real-time polymerase chain reaction-based (RT-PCR) technique for clinical diagnosis of histoplasmosis.

**METHODS.** Primers and probes were designed on the basis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA of 20 clinical strains of *Histoplasma capsulatum*. LightCycler procedures (Roche Applied Science) were used with probes marked by fluorescence resonance energy transfer (FRET). Reproducibility, sensitivity, and specificity were analyzed. In addition, an internal control was designed to identify false negative results by PCR inhibition. The RT-PCR assay was tested in 22 clinical samples from 14 patients with proven histoplasmosis. In addition, 30 samples from patients with febrile neutropenia or mycoses other than histoplasmosis, and from healthy volunteers were analyzed as controls.

**RESULTS.** The limit of detection of the assay was 1 fg of genomic DNA per  $\mu\text{l}$  of sample. The PCR-based technique was reproducible and highly specific. Positive results were obtained in 11/14 (78.6%) patients and in 17/22 (77.3%) clinical samples. RT-PCR was positive in 100% of respiratory secretions and bone marrow samples, but only 70% of sera ( $p < 0.01$ ). Mean fungal DNA value was  $23.1 \text{ fg}/\mu\text{l}$  in serum and  $4.85 \times 10^3 \text{ fg}/\mu\text{l}$  in respiratory and bone marrow samples. RT-PCR results were positive in serum from three HIV patients for which antibody detection by immunodiffusion was negative. Specificity was 100%, since PCR results were negative for all the control samples.

**CONCLUSION.** This RT-PCR technique is a sensitive, specific method for early diagnosis of histoplasmosis, particularly when respiratory secretions or bone marrow samples are analyzed. The reliability is lower in serum, but it can be used as an additional, complementary technique to culture and serology in HIV patients.

**Key words:** *Histoplasma capsulatum*. Serology. HIV+. Molecular diagnosis.

Correspondencia: Dr. M. Cuenca-Estrella.  
Servicio de Micología. Centro Nacional de Microbiología.  
Instituto de Salud Carlos III.  
Ctra. Majadahonda-Pozuelo, km 2. 28220 Majadahonda. Madrid. España.  
Correo electrónico: mcuenca-estrella@isciii.es

## Introducción

La histoplasmosis es una infección fúngica sistémica causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, patógeno primario que es endémico en África y América<sup>1,2</sup>. Aunque este patógeno tiene una distribución cosmopolita, no se han descrito casos autóctonos de histoplasmosis en España. Sin embargo, su prevalencia está aumentando en nuestro país debido a infecciones importadas en viajeros o emigrantes procedentes de zonas endémicas. Según el Instituto Nacional de Estadística ([www.ine.es](http://www.ine.es)), un 35% de la población emigrante que reside en España procede de zonas endémicas y, además, un millón de españoles viaja cada año a estos países.

Existen tres tipos de histoplasmosis importadas. En primer lugar, la histoplasmosis del viajero que suele ser una infección respiratoria aguda o subaguda, en individuos inmunocompetentes que han inhalado esporas de *Histoplasma*<sup>3-5</sup>. Es habitual que la infección afecte a varios miembros de un grupo que viajó a una zona endémica y realizó actividades en la naturaleza, contactando accidentalmente con el microorganismo<sup>6</sup>. El segundo tipo de histoplasmosis importada se observa en población emigrante infectada por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)<sup>7-9</sup>. Estos pacientes suelen presentar una micosis diseminada grave, de sintomatología similar a la de otras afecciones del sistema reticuloendotelial. Por último, el tercer tipo es la histoplasmosis crónica, caracterizada por alteraciones pulmonares, torácicas y mediastínicas, que se diagnostica con poca frecuencia en individuos procedentes de áreas endémicas<sup>10</sup>.

Las tres formas de histoplasmosis importadas no son fáciles de diagnosticar y debe recordarse, que sin tratamiento antifúngico, la forma diseminada de esta micosis suele ser mortal<sup>10,11</sup>. La detección de anticuerpos y la prueba de la histoplasmina no tienen apenas valor diagnóstico en la población emigrante. En viajeros, ambas pruebas tienen una mayor utilidad, aunque sus valores predictivos son bajos y se necesitan varias semanas para la seroconversión, por lo que el diagnóstico suele ser retrospectivo<sup>12</sup>.

Por ello, la técnica de referencia es el cultivo e identificación del hongo, que también es un método lento, pues se necesitan de 3 a 4 semanas para confirmar la especie. Además, esta técnica tiene una sensibilidad discreta y debe realizarse en instalaciones que cumplan con los criterios de bioseguridad para manejo de patógenos del grupo 3, instalaciones que no están disponibles en muchos laboratorios asistenciales<sup>13</sup>.

Para intentar superar estos problemas se han desarrollado varios métodos diagnósticos alternativos. Entre éstos destaca la detección de antígeno en orina y en suero, una técnica desarrollada en Estados Unidos para la detección de *H. capsulatum* en enfermos VIH positivos, cuyas especificidad y sensibilidad se sitúan por encima del 85%. Sin embargo, esta técnica no se ha comercializado y sólo se encuentra disponible en centros de referencia de Estados Unidos<sup>14,15</sup>.

En los últimos años, se han diseñado otros métodos alternativos basados en la detección de ácidos nucleicos, demostrando una sensibilidad y una especificidad variables. Se han descrito procedimientos no cuantitativos basados en la amplificación de ADN por técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dirigidos al ADN ribosó-

mico o a genes específicos como el que codifica el antígeno M o la proteína de 100 kDa de *H. capsulatum*<sup>16-20</sup>.

Así mismo se ha descrito un método basado en PCR cuantitativa para la detección del hongo a partir de cultivos, que también ha demostrado su utilidad como método de diagnóstico clínico en 3 enfermos con histoplasmosis<sup>21</sup>. Las técnicas cuantitativas permiten automatizar la extracción y detección de los ácidos nucleicos, además de poder evaluar la carga fúngica y la respuesta al tratamiento. Una de estas técnicas es la denominada PCR en tiempo real (PCR-TR), que utiliza la detección de fluorescencia como técnica de cuantificación.

El objetivo de este trabajo ha sido la valoración de la utilidad de una técnica de PCR-TR para la detección y cuantificación de *H. capsulatum* a partir de muestras clínicas.

## Material y métodos

### Microorganismos

Para el desarrollo de la técnica se utilizaron 20 cepas clínicas de *H. capsulatum* pertenecientes a la colección del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología. En el estudio de especificidad se utilizaron 12 cepas pertenecientes a otras especies fúngicas. Estas especies eran: *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium solani*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium oxysporum*, *Scedosporium prolificans*, *Scedosporium apiospermum* y *Candida albicans*. Además se incluyeron en los experimentos ADN genómico humano y de ratón (Promega, Madrid, Spain). Una vez diseñados los iniciadores y las sondas se realizó una búsqueda de tipo BLAST en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>) para estar seguros de que las sondas diseñadas no presentaban homología con otros microorganismos. Adicionalmente, se comprobó la especificidad de la sonda y de los iniciadores diseñados mediante análisis filogenéticos de sus secuencias. Para estos análisis se utilizó la base de datos de secuencias del Servicio de Micología, que dispone de 1.800 cepas pertenecientes a 250 especies fúngicas y el programa informático Fingerprinting II informatix, versión 3.0 (BIORAD, Madrid, España).

### Extracción de ADN

La extracción de ácidos nucleicos se realizó siguiendo procedimientos habituales<sup>22</sup>. En el caso de *H. capsulatum* y otros patógenos primarios, la extracción se realizó en un laboratorio de bioseguridad para patógenos del grupo 3, cumpliendo las normas establecidas (Real Decreto 664/1997). Las cepas se cultivaron en 10 ml de medio GYEP (2% glucosa, 0,3% extracto de levadura, 1% peptona, Oxoid, Madrid, España), durante una semana. Tras ello, se recogió el micelio, se dejó secar y se introdujo en un tubo Falcon (Becton Dickinson, LabCenter, Madrid, España) con 6 bolitas de vidrio de 4 mm Ø (Sigma-Aldrich Química, Madrid, Spain). Se aplicaron dos ciclos de congelación con nitrógeno líquido, tras lo que se agitó en vórtex durante 30 s, a 2.000 rpm (MS 1 Minishaker, IFA, Cultek, Madrid, España), hasta transformar dicho micelio en un polvo fino. Posteriormente, se empleó el método comercial Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen, Izasa, Madrid, España), para extraer el ADN, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### Diseño de los iniciadores y de las sondas

Para el diseño de los iniciadores y de las sondas se analizaron las secuencias de las regiones ITS (internal transcriber spacers) del ADN ribosómico de las 20 cepas de *H. capsulatum*. Se empleó el programa de diseño de sondas LightCycler Probe Design Software 1.0 (Roche Applied Science, Madrid, España), eligiéndose fragmentos pertenecientes a la zona ITS-1. El diseño se completó mediante análisis en las bases de datos de secuencias del GenBank y del Servicio de Micología.

TABLA 1. Características de los enfermos con histoplasmosis

Paciente	Zona de procedencia	VIH	Diagnóstico de histoplasmosis
1	Centroamérica	-	Detección de anticuerpos*
2	Centroamérica	-	Detección de anticuerpos*
3	Centroamérica	+	Cultivo
4	Centroamérica	-	Detección de anticuerpos*
5	Centroamérica	-	Detección de anticuerpos*
6	Sudamérica	+	Cultivo
7	Sudamérica	+	Cultivo
8	Sudamérica	+	Cultivo y detección de anticuerpos
9	Sudamérica	+	Cultivo
10	Sudamérica	+	Cultivo
11	Sudamérica	+	Cultivo
12	Sudamérica	+	Cultivo
13	Sudamérica	+	Cultivo y detección de anticuerpos
14	África	+	Examen histológico*

\*El diagnóstico se realizó en enfermos con cuadro clínico y antecedentes epidemiológicos compatibles con histoplasmosis. VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

El iniciador directo era 5'-CCACCCTTGCTACC-3' (iniciador Hcits1-1) y el inverso 5'-GGAACCAAGAGATCCGT-3' (Hcits1-2). La longitud del fragmento amplificado era de 182 bp. Las sondas diseñadas fueron del tipo fluoresce resonance energy transfer (FRET), con una estructura HC1-Fluores 5'GTCGGTGAACGATTGGCGT3'-LCFfluorescein y HC1-Red 5'LCRED640-GAGCATGAGAGCGATAATAATC-CAGT3'-(Tibmolbiol) (Roche Applied Science).

### Descripción de la técnica de PCR-TR

Las PCR-TR se realizaron con el sistema LightCycler 2.0 (Roche Applied Science), empleando el kit LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probes (Roche Applied Science) y los capilares LightCycler Capillaries, 20 µl (Roche), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de PCR-TR contenían un volumen final de 20 µl, con 3 mM de Cl<sub>2</sub>Mg, 0,3 µM de cada iniciador y 0,2 µM de cada sonda FRET, se añadieron 2 µl de ADN a la mezcla de PCR. Respecto a las condiciones de PCR, se realizó una preincubación a 95 °C seguida de 45 ciclos de desnaturalización (10 s a 95 °C), anillamiento (10 s a 52 °C), y extensión (30 s a 72 °C). Por último, el protocolo incluía un ciclo para conocer la temperatura de fusión de la doble cadena de ADN del producto amplificado (curva de *melting*). Este ciclo se realizó en el intervalo de temperaturas 47 a 95 °C.

Una vez realizadas las reacciones de PCR, se recogió el producto amplificado, mediante la inclusión del capilar en posición invertida en un tubo de plástico estéril (Eppendorf AG, Labcenter, Madrid, España), y centrifugación a 2.000 rpm, durante 1 min. Se comprobó la presencia del amplicón que se quería detectar, así como el tamaño de éste mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% (Pronadisa, Madrid, España), siguiendo los protocolos de Sambrook<sup>23</sup>. Los fragmentos amplificados se secuenciaron en el sistema ABI Prism 377 DNA sequencer (Applied Biosystem, Madrid, España) y sus secuencias se compararon con las bases de datos disponibles en el laboratorio. En cada experimento se incluyeron controles negativos. Como control positivo se utilizó ADN de la cepa de *H. capsulatum* CNM-CM-2721 (Colección de hongos filamentosos del Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología).

El estudio de reproducibilidad de la técnica, así como la cuantificación del ADN amplificado se realizaron mediante la construcción de rectas de regresión con los resultados de ocho repeticiones de diferentes diluciones de ADN del *H. capsulatum* CNM-CM-2721 (desde 10 ng a 1 fg ADN/µl). Las rectas de regresión se realizaron entre los logaritmos de las concentraciones de ADN y el ciclo de la reacción de PCR en el que se empezaba a detectar la fluorescencia (*crossing point*, CP).

La reproducibilidad se obtuvo mediante el cálculo de los coeficientes de variación de los CP para cada una de las concentraciones de ADN utilizadas.

### Diseño de un control interno de la técnica de PCR

Una de las principales limitaciones de las técnicas de PCR como método de diagnóstico clínico es la posibilidad de inhibición de la reacción de amplificación, por parte de sustancias que están presentes en la muestra. Para evitar estos falsos negativos, se diseñó un control interno para la técnica de PCR-TR. El control interno se elaboró según el método descrito por Burggraf et al<sup>24</sup>, que consiste en incluir otro oligonucleótido en la reacción, con secuencia complementaria a la de los iniciadores y la sonda, pero con algunos cambios puntuales en la secuencia. Estos cambios permiten que se produzca una hibridación con los iniciadores, pero no con la sonda FRET. De esta forma se produce una amplificación sin producción de fluorescencia y, además, el producto amplificado es diferente al que se produce si se amplifica ADN de *Histoplasma*, lo que puede detectarse mediante el análisis de las curvas de temperatura de fusión de los productos amplificados. De esta forma, en caso de inhibición de la PCR, también se inhibirá la hibridación con el control interno. Se determinó el número mínimo de copias del control interno que era necesario incluir, para minimizar la competición con el ADN diana y no reducir la sensibilidad de la técnica. Tras ello, se incluyeron 200 copias de control interno en cada PCR-TR en las muestras clínicas.

### Realización de la técnica de PCR en muestras clínicas

Para validar la técnica de PCR-TR en muestras clínicas, se emplearon muestras de 14 pacientes, en los que previamente se había confirmado el diagnóstico de histoplasmosis mediante cultivo, examen histológico o serología positiva más cuadro clínico y antecedentes epidemiológicos compatibles. Las muestras fueron recibidas en el Servicio de Micología entre 2004 y 2005. La tabla 1 muestra algunas de las características clínicas de los pacientes. Debe destacarse que 10 de 14 (71,4%) eran VIH positivos y que 13 enfermos procedían de Centroamérica y Sudamérica y uno del continente africano.

Se analizó la especificidad de la técnica en muestras clínicas con sueros procedentes de 30 personas. Se testaron un total de 30 muestras, 10 de pacientes con otra infección fúngica invasora (8 aspergilosis, una mucormicosis y una paracoccidioidomicosis), 10 de enfermos con neutropenia febril sin infección fúngica probada o probable y 10 de voluntarios sanos (5 españoles y 5 sudamericanos procedentes de zonas endémicas).

La extracción de ADN de las muestras sanguíneas se realizó mediante el NucleoSpinBlood Kit (Macherey-Nalgen, Culti, Madrid, Spain). Para los aspirados medulares y las secreciones respiratorias se utilizó el QiAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Se emplearon 2 µl del ADN extraído de cada muestra para cada reacción de PCR-TR. La única excepción fueron las muestras de suero en los que se verificó que el empleo de 4 µl mejoraba la sensibilidad del ensayo. La cuantificación del ADN en muestras clínicas se calculó mediante la recta de regresión antes descrita. En todos los casos se secuenciaron los productos de amplificación y se compararon con las bases de datos. Los experimentos fueron repetidos en dos ocasiones.

En las muestras de suero disponibles, también se determinó la presencia de anticuerpos para *H. capsulatum*, mediante una técnica de inmunodifusión (ID Fungal Antibody System, Immuno-Mycologics, Leti Laboratorios, Madrid, España).

### Análisis de los resultados

Los resultados de la técnica de PCR fueron analizados con ayuda del programa SPSS 13.0 (SPSS SL, Madrid, España). Se realizó un análisis descriptivo y un análisis comparativo mediante tablas de contingencia y comparación de medias. El nivel de significación estadística aceptado fue de  $p < 0,01$ .

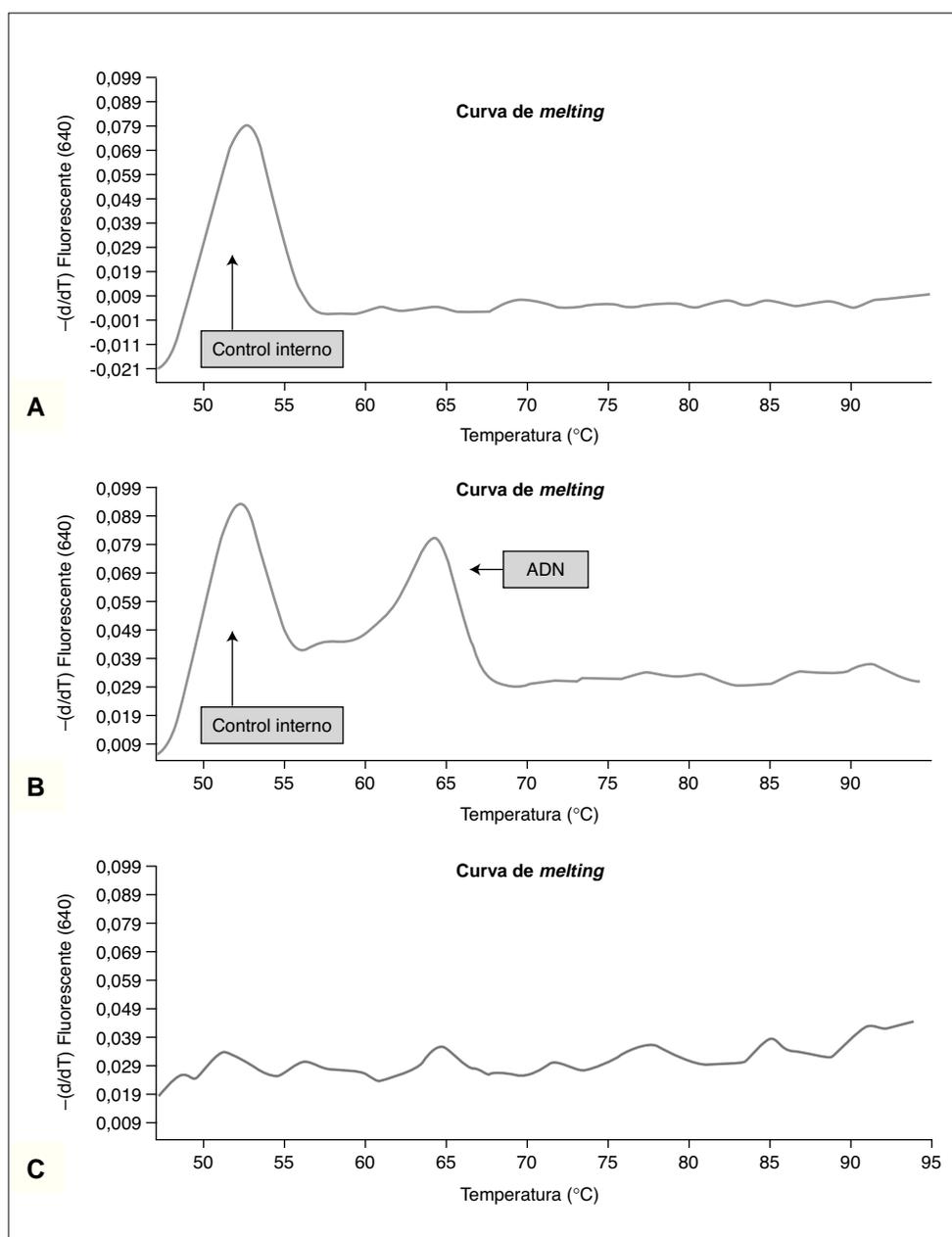
## Resultados

### Puesta a punto de la técnica

El límite de detección de la técnica se estableció en 1 fg por  $\mu\text{l}$  de muestra analizada. La recta de regresión construida entre las concentraciones conocidas de ADN y los CP tenía un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) de 0,99 ( $p < 0,01$ ). La reproducibilidad del ensayo fue muy elevada para los seis primeros puntos de la recta (de 20 ng a 200 fg), con coeficientes de variación inferiores al 3% entre las ocho repeticiones que se efectuaron para estandarizar la técnica. Para las concentraciones de ADN más bajas, los coeficientes de variación fueron más elevados, siendo del 35% para la concentración de 10 fg y del 37,5% para la de 1 fg. Por debajo de 10 fg la regresión perdió linealidad. La media de la eficiencia de la amplificación fue de 1,8.

En cuanto a la especificidad del ensayo, no se detectó señal de amplificación cuando se incluyeron ácidos nucleicos de otras especies fúngicas, ni cuando se analizó ADN humano o de ratón.

En la figura 1 se representan las temperaturas de fusión (curvas de *melting*) del producto amplificado. En la figura 1A se representa el resultado de una muestra negativa para *H. capsulatum*, en el que puede observarse la curva de fusión de un producto amplificado que corresponde al control interno. En la figura 1B se observan las curvas de una muestra positiva, con la curva de fusión del ADN fúngico y del control interno. En la figura 1C se muestra una muestra en la que se inhibió la reacción de PCR. Este resultado confirmó la posibilidad de detectar falsos negativos por inhibición de la reacción de PCR.



**Figura 1.** Representación de las curvas de temperatura de fusión (curvas de *melting*) de los productos amplificados (reproducción de las imágenes del LigthCycler Probe Design Software 1.0). A) Curva de la temperatura de fusión de una muestra negativa. El pico representa la amplificación del control interno. Muestra de suero del paciente 1. B) Curva de la temperatura de fusión de una muestra positiva. Las curvas representan la amplificación del control interno y del ADN fúngico. Aspirado medular del paciente 10. C) Inhibición de la reacción de PCR en la muestra de orina del paciente 12.

TABLA 2. Muestras recibidas por paciente con histoplasmosis y resultados de la técnica de PCR en tiempo real. La tabla incluye también, los resultados de la detección de anticuerpos en aquellos pacientes con histoplasmosis de los que se dispuso de muestras de suero

Paciente	Muestras recibidas	Resultado de PCR	Cuantificación del ADN fúngico en fg/ $\mu$ l	Resultado de la secuenciación	Resultado de la inmunodifusión*
1	Suero	Negativo	**	**	Positivo
2	Suero	Negativo	**	**	Positivo
3	Suero	Negativo	**	**	Negativo
	Sangre	Negativo	**	**	**
4	Suero	Positivo	3,3	<i>H. capsulatum</i>	Positivo
5	Suero	Positivo	2,2	<i>H. capsulatum</i>	Positivo
6	Suero	Positivo	24,5	<i>H. capsulatum</i>	Negativo
7	Suero	Positivo	16,2	<i>H. capsulatum</i>	Negativo
8	Suero	Positivo	62,2	<i>H. capsulatum</i>	Positivo
9	Suero	Positivo	20,5	<i>H. capsulatum</i>	Negativo
10	Secreción bronquial	Positivo	$2,3 \times 10^3$	<i>H. capsulatum</i>	**
	Lavado broncoalveolar	Positivo	$5,1 \times 10^2$	<i>H. capsulatum</i>	**
	Médula ósea	Positivo	65,2	<i>H. capsulatum</i>	**
11	Médula ósea	Positivo	$1,1 \times 10^4$	<i>H. capsulatum</i>	**
12	Espuito	Positivo	$1,8 \times 10^4$	<i>H. capsulatum</i>	**
	Lavado broncoalveolar	Positivo	$6,1 \times 10^2$	<i>H. capsulatum</i>	**
	Orina	Inhibición	**	**	**
13	Suero	Positivo	3,05	<i>H. capsulatum</i>	Positivo
	Secreción bronquial	Positivo	$5,1 \times 10^2$	<i>H. capsulatum</i>	**
	Lavado broncoalveolar	Positivo	$7,5 \times 10^3$	<i>H. capsulatum</i>	**
	Médula ósea	Positivo	$3,3 \times 10^3$	<i>H. capsulatum</i>	**
14	Plasma	Positivo	53,1	<i>H. capsulatum</i>	**

\*Detección de anticuerpos de *H. capsulatum* mediante inmunodifusión. \*\*No realizado.  
PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

### Resultados en las muestras clínicas

En la tabla 2 se resumen las muestras recibidas de cada enfermo. No se recibieron el mismo tipo y número de muestras de cada paciente, por lo que no se pudo hacer un análisis detallado por tipo de muestra. La PCR se realizó en 22 muestras. Se recibieron 10 sueros, 3 lavados broncoalveolares, 3 aspirados de médula ósea, 2 secreciones bronquiales, un plasma, una sangre, una orina y un esputo.

La técnica de PCR fue positiva en 11 de los 14 enfermos analizados, lo que le otorga una sensibilidad total de 78,6%. Por muestras, el resultado fue positivo en 17 de las 22 analizadas (77,3%). En 4 muestras, el resultado fue negativo y en una, la única muestra de orina analizada, se inhibió la PCR. Esta inhibición no logró evitarse ni repitiendo las reacciones ni con ningún método de purificación de ADN.

Al analizar los resultados por tipo de muestra se obtuvieron diferencias significativas. De los 10 sueros recibidos sólo 7 (70%) fueron positivos. En contraste, todas las muestras respiratorias analizadas (esputo, secreciones bronquiales y lavados broncoalveolares), así como los 3 aspirados de médula ósea fueron positivos por la técnica de PCR-TR ( $p < 0,01$ ). Sólo se recibieron una muestra de sangre y otra de plasma, lo que impide realizar análisis estadísticos.

En cuanto a la cantidad de ADN detectado, en las muestras hematológicas positivas (7 sueros y un plasma), la media de la cuantificación del ADN de *Histoplasma* amplificado fue de 23,1 fg/ $\mu$ l. En el caso de las 6 muestras respiratorias, la media de ADN detectado fue de  $4,9 \times 10^3$  fg/ $\mu$ l, y

en los aspirados de médula ósea fue de  $4,8 \times 10^3$  fg/ $\mu$ l. Por tanto, la cantidad de ADN detectado en las muestras de suero y plasma fueron significativamente inferiores ( $p < 0,01$ ), que las detectadas en las otras muestras.

En la tabla 2 también se recogen los resultados de la detección de anticuerpos por medio de inmunodifusión. De las 10 muestras de suero analizadas, el resultado fue positivo en 6 casos (60%). Debe destacarse que la serología fue positiva en los 4 casos VIH negativos. Sin embargo, en los 6 sueros procedentes de enfermos VIH positivos, la serología fue positiva sólo en 2 casos (33,3%).

No se realizaron otros análisis por zona endémica de procedencia o por presencia del VIH, ya que los grupos no eran comparables ( $p > 0,01$ ), pues no se dispuso del mismo tipo y número de muestra de todos los enfermos.

Respecto al estudio de especificidad, ninguna de las 30 muestras analizadas procedentes de enfermos con micosis, de pacientes con neutropenia febril y de voluntarios sanos resultó positiva para la técnica de PCR-TR, por lo que su especificidad fue del 100%.

### Discusión

Las micosis primarias importadas continúan siendo infrecuentes en los países desarrollados del hemisferio occidental<sup>25</sup>. Sin embargo, los movimientos migratorios que se han producido en los últimos años están modificando esta situación epidemiológica<sup>26,27</sup>. Los últimos datos españoles revelan que en nuestro país reside entre un millón y un millón y medio de emigrantes procedentes de zonas donde

la histoplasmosis, la paracoccidiodomicosis, la coccidiodomicosis y la blastomicosis son infecciones endémicas. En los últimos años, el Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología ha recibido un número creciente de peticiones para diagnosticar micosis importadas y no es arriesgado suponer, que esta demanda se incrementará en el futuro.

En el caso de la histoplasmosis, el Servicio de Micología realizaba el diagnóstico microbiológico mediante el cultivo e identificación de las cepas, así como con la detección de anticuerpos. Estas técnicas tienen una sensibilidad discreta y suelen requerir varias semanas para confirmar el diagnóstico, por lo que su utilidad clínica puede considerarse limitada<sup>12</sup>. Por ello, se ha desarrollado una técnica de diagnóstico molecular basada en métodos de amplificación de ácidos nucleicos.

Hasta la fecha, se han diseñado otros métodos para detectar ADN de *H. capsulatum* en muestras clínicas<sup>16-20</sup>. La mayoría de ellos se han basado en técnicas de PCR convencional, dirigidas a distintos genes de este microorganismo. La diana más utilizada ha sido el ADN ribosómico y, concretamente, fragmentos de la región 18S. La sensibilidad y especificidad de estas técnicas fueron buenas, pero no se han extendido por laboratorios asistenciales debido a su complejidad, escasa automatización y falta de protocolos estandarizados.

Por ello, se han elaborado técnicas de PCR cuantitativa, como la PCR-TR, que permiten automatizar la extracción, utilizar protocolos normalizados y, quizá, su implantación en laboratorios asistenciales. En el caso de la histoplasmosis, Martagón-Villamil et al<sup>21</sup> publicaron en 2003 el diseño de una PCR-TR dirigida a la región ITS-1 del ADN ribosómico. El método se aplicó en la identificación de colonias de especies fúngicas, para posteriormente utilizarlo con éxito en el diagnóstico de 3 enfermos con histoplasmosis.

La técnica de PCR-TR diseñada por el Servicio de Micología también está dirigida a la región ITS-1, pues es la zona que resultaba más adecuada tras el estudio de las secuencias de *Histoplasma*, así como la de otras especies. Tras su puesta a punto, se procedió a evaluarla en muestras clínicas, procedentes de 14 enfermos diagnosticados de esta micosis. La sensibilidad total fue buena, situándose en el 78,6% (11 de 14 enfermos) y su especificidad fue del 100%. No obstante debe destacarse, que la sensibilidad fue del 100% en los enfermos en los que se analizaron muestras respiratorias o aspirados medulares y que descendió al 70% en las muestras de suero. Además, la cantidad de ADN en suero fue significativamente más baja que la de las secreciones respiratorias y los aspirados medulares, situándose en algunos casos cerca del límite de detección, que era de 1 fg/ $\mu$ l. Una cantidad tan baja de ADN fúngico explica porqué la técnica tuvo una sensibilidad más baja en las muestras de suero.

Por último cabe destacar, que la PCR-TR resultó negativa en el suero de 2 casos de histoplasmosis en enfermos VIH negativo, que fueron positivos con la técnica de inmunodifusión para detectar anticuerpo. Por el contrario, la PCR-TR fue positiva y la serología negativa en 3 casos en enfermos VIH positivos. En otros 3 casos, tanto la serología como la PCR-TR fueron positivas.

Estos datos permiten concluir que esta técnica de PCR-TR es un método sensible para el diagnóstico rápido

de histoplasmosis. La técnica debe realizarse en muestras respiratorias y aspirados de médula ósea, donde muestra una sensibilidad del 100%. La sensibilidad en suero es inferior, pero puede ser un método complementario al cultivo y a la serología, sobre todo en enfermos VIH positivos. Este método cuantitativo automatizado podría implantarse en los laboratorios asistenciales con capacidad de realizar técnicas de PCR-TR y, de esta forma, ayudar a obtener un diagnóstico más rápido y fiable de la histoplasmosis. No obstante, debería evaluarse en un mayor número de enfermos, así como su utilización en el seguimiento de la respuesta al tratamiento.

### Agradecimientos

Alicia Gómez-López tiene un contrato de investigación del Fondo de Investigaciones Sanitarias (N.º de Expediente CM05/00184). Este trabajo fue financiado en parte por el proyecto de investigación 1021/04 del Instituto de Salud Carlos III y el 1397/04 de la Fundación Ramón Areces, Madrid, España.

Agradecemos la colaboración de los laboratorios asistenciales del Sistema Nacional de Salud que enviaron muestras al Servicio de Micología del Centro Nacional de Microbiología para el diagnóstico clínico de histoplasmosis.

### Bibliografía

1. Deepe GS. *Histoplasma capsulatum*. En: Mandel GL, Bennet JE, Dolin R, editors. Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 2718-33.
2. Guelfand L, Cahn P. Histoplasmosis. En: Ausina Ruiz V, Moreno Guillen S, editores. Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2006. p. 659-64.
3. Flor A, Estivill D, Pérez R, Ordeig J, Ramos F, Soler-Bel J, et al. Histoplasmosis pulmonar aguda en un viajero español a Nicaragua: ejemplo de enfermedad importada. Revista Iberoamericana de Micología. 2003;20:24-8.
4. Gascón J, Torres JM, Luburich P, Ayuso JR, Xaubet A, Corachán M. Imported histoplasmosis in Spain. J Trav Med. 2000;7:89-91.
5. Gascón J, Torres JM, Jiménez M, Mejías T, Triviño F, Gobbi F, et al. Histoplasmosis infection in Spanish travelers to Latin America. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2005;24:839-41.
6. García-Vázquez E, Velasco M, Gascón J, Corachán M, Mejías T, Torres-Rodríguez M. Infección por *Histoplasma capsulatum* en un grupo de cooperantes en Guatemala. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2005;23:274-6.
7. Benito N, García-Vázquez E, Blanco A, De Górgolas M, Gadea I, Escalonilla P, et al. Histoplasmosis diseminada en pacientes con sida. Estudio de 2 casos y revisión de la bibliografía española. Enferm Infecc Microbiol Clin. 1998;16:316.
8. De José MI, Orío M, Bilbao A, García J, Baquero F. Histoplasmosis diseminada. An Pediatr (Barc). 2005;63:249-52.
9. Díaz S, García JL, Villasante C, Villamor J. Histoplasmosis diseminada en un paciente afecto de síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Med Clin (Barc). 1988;90:54.
10. Panackal AA, Hajjeh RA, Cetron MS, Warnock DW. Fungal infections among returning travelers. Clin Infect Dis. 2002;35:1088-95.
11. Wheat J. Endemic mycoses in AIDS – A clinical review. Clin Microbiol Rev. 1995;8:146-59.
12. Wheat LJ. Current diagnosis of histoplasmosis. Trends in Microbiology. 2003;11:488-94.
13. Guarro J, Gene J, Stchigel AM. Developments in fungal taxonomy. Clin Microbiol Rev. 1999;12:454.
14. Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. N Engl J Med. 1986;314:83-8.
15. Wheat LJ, Garringer T, Brizendine E, Connolly P. Diagnosis of histoplasmosis by antigen detection based upon experience at the histoplasmosis reference laboratory. Diag Microbiol Infect Dis. 2002;43:29-37.
16. Bialek R, Fischer J, Feucht A, Najvar LK, Dietz K, Knobloch J, et al. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay. J Clin Microbiol. 2001;39:1506-9.

17. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nubling G, Robertson VJ, 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.
18. Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gómez C, Serra E. Molecular detection of *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum* in human clinical samples. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1753-5.
19. Guedes HLD, Guimares AJ, Muniz MD, Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, et al. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. *J Clin Microbiol.* 2003;41:535-9.
20. Rickerts V, Bialek R, Tintelnot K, Jacobi V, Just-Nubling G. Rapid PCR-based diagnosis of disseminated histoplasmosis in an AIDS patient. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2002;21:821-3.
21. Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, et al. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2003;41:1295-8.
22. Tang CM, Cohen J, Holden DW. An *Aspergillus fumigatus* alkaline protease mutant constructed by gene disruption is deficient in extracellular elastase activity. *Mol Microbiol.* 1992;6:1663-71.
23. Sambrook KJ, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning. A laboratory manual.* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
24. Burggraf S, Olgemoller B. Simple technique for internal control of real-time amplification assays. *Clin Chemistry.* 2004;50:819-25.
25. Freedman DO, Weld LH, Kozarsky PE, Fisk T, Robins R, Von Sonnenburg F, et al. Spectrum of disease and relation to place of exposure among ill returned travelers. *N Engl J Med.* 2006;354:119-30.
26. Farina C, Rizzi M, Ricci L, Gabbi E, Caligaris S, Goglio A. Imported and autochthonous histoplasmosis in Italy: new cases and old problems. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:169-71.
27. Leimann BC, Pizzini CV, Muniz MM, Albuquerque PC, Monteiro PC, Reis RS, et al. Histoplasmosis in a Brazilian center: clinical forms and laboratory tests. *Rev Iberoam Micol.* 2005;22:141-6.

#### Fe de errores

En el artículo "Infecciones osteoarticulares por micobacterias en un hospital universitario" publicado en *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2006;24(10):661-5 se ha producido un error en la autoría. Los autores correctos son los que se reproducen a continuación:

José I. García-Cía y Jaime Esteban  
*Departamento de Microbiología Clínica*  
*Fundación Jiménez Díaz-UTE*  
*Madrid. España.*