

Identificación de *Histoplasma capsulatum* en muestras clínicas mediante la técnica de PCR en dos rondas

Detection of Histoplasma Capsulatum by Nested-PCR in Clinical Specimens

Colella, María Teresa¹; Mata, Sofía¹; Hartung, Claudia¹; Pérez, Celina¹; Roselló, Arantza¹; Olaizola, Carolina³; Fernández, Carmen³; Magaldi, Silvia¹ y Toro, Félix²

¹Sección de Micología Médica, Instituto de Medicina Tropical, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

²Laboratorio de Biología Molecular, Instituto de Inmunología, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.

³Cátedra de Medicina Tropical, Escuela Luis Razetti, Facultad de Medicina UCV. E-mail: ftororeacción.ve; mcolellacantv.net

Resumen

La histoplasmosis es una micosis profunda de distribución mundial cuyo diagnóstico se fundamenta en estudios clínicos, micológicos e inmunológicos. La identificación del agente etiológico en muestras biológicas es difícil de realizar. Se evaluó la técnica de PCR en dos rondas para identificar ADN de *Histoplasma capsulatum* en muestras clínicas (sangre y médula ósea) y cultivos del hongo. Se ensayaron 3 métodos de aislamiento de ADN basados en los reactivos Tiocianato de Guanidina, Cloruro de Bencilo y Triton-X-100. La técnica de aislamiento con Tiocianato de guanidina resultó de fácil aplicación en muestras clínicas. Sin embargo, se obtuvo un mayor rendimiento de ADN con el reactivo Triton-X-100. La aplicación de la prueba de PCR generó un amplificado de 210 pares de bases el cual fue identificado tanto en las cepas de referencia de *H. capsulatum* como en 5 muestras de sangre y 2 muestras de médula ósea. Para confirmar la especificidad de la prueba se analizaron cepas de otros hongos no relacionados, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* y *Coccidioides immitis* (*C posadasii*) las cuales resultaron negativas. La técnica de PCR mostró una sensibilidad de hasta 10pg de ADN de *H. capsulatum* confirmándose así su utilidad como herramienta de diagnóstico molecular.

Palabras clave: Histoplasmosis, PCR, ADN.

Abstract

Histoplasmosis is a systemic mycosis whose diagnosis is based on clinical, mycological and immunological criteria. Identification of its etiological agent in biological samples is difficult to perform. We evaluated a nested-PCR technique to identify *Histoplasma capsulatum* in clinical specimens (blood and bone marrow) and reference strains. Three different methods for DNA isolation were tested based on the reagents Guanidine thiocyanate, Benzoyl chloride and Triton X-100. Among these procedures, Guanidine thiocyanate-based method yielded by utmost good quality DNA and was easy to perform when used with clinical specimens. However, a better recovery of DNA was accomplished with the Triton-X-100 method. Reference strains of *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* and *Coccidioides immitis* (*C posadasii*) were tested to assess PCR assay specificity. The samples were amplified by nested-PCR and analyzed by 3% agarose gel electrophoresis. Each of the reference strains showed the same signal upon amplification with a DNA band of 210 bases pairs, as well as 5 blood samples and 2 bone marrow specimens, with high sensitivity (10 picograms of *Histoplasma capsulatum* DNA) and specificity (no cross reactivity with *P. brasiliensis*, *C. glabrata*, *C. neoformans* and *C. immitis*). This technique has proved to be useful as a diagnostic technique.

Key words: Histoplasmosis, PCR, DNA.

Introducción

La histoplasmosis es una enfermedad granulomatosa producida por un hongo dimorfo *Histoplasma capsulatum* (*H. capsulatum*). Es de distribución ecuménica, y es endémica en América, Asia, India y África (1, 2). La incidencia de esta micosis ha aumentado a nivel mundial en los últimos 5 años presentándose una situación similar en Venezuela donde se ha observado un predominio de la enfermedad fundamentalmente en las zonas urbanas (3, 4, 5).

El diagnóstico clínico de la histoplasmosis se basa en los aspectos epidemiológicos y las manifestaciones clínicas y radiológicas que presentan los pacientes. La confirmación de la micosis se efectúa a través de exámenes de laboratorio. Sin embargo, el diagnóstico de esta entidad es a veces difícil de realizar, principalmente cuando se trata de una histoplasmosis diseminada. En este sentido, el diagnóstico micológico presenta ciertos inconvenientes ya que tanto el examen directo de la muestra clínica, mediante la coloración

de Giemsa, como el estudio histopatológico, a pesar de permitir un rápido diagnóstico, exhiben una sensibilidad inferior al 50% debido a que dependen en gran parte de la pericia del observador. El aislamiento del organismo mediante el cultivo de la muestra clínica es confirmatorio, no obstante tiene la desventaja de que el hongo es de difícil crecimiento, siendo la sensibilidad de la prueba de un 80% (6, 7, 8).

Con los avances tecnológicos en el campo de la biología molecular, se han desarrollado métodos altamente sensibles y específicos tales como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), la cual permite la identificación y amplificación de ácidos nucleicos provenientes de cualquier tipo de material biológico. Esta metodología se ha constituido en una poderosa herramienta para el diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas entre las que se cuentan la histoplasmosis (9). Desde su desarrollo inicial, la PCR ha experimentado varias modificaciones que se han traducido en una mejora sustancial de su sensibilidad, especificidad y rango de aplica-

ciones. En este sentido, la PCR en dos rondas o "Nested-PCR", representa una variante metodológica con una sensibilidad superior a la técnica rutinaria de PCR (permite identificar entre 1 a 5 equivalentes de genomas de *H. capsulatum* por muestra), por lo que se le ha considerado como una valiosa herramienta de diagnóstico temprano de la Histoplasmosis (9, 10, 11, 12).

El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la técnica de PCR en dos rondas para la identificación de *H. capsulatum* en diferentes muestras clínicas, evaluando para ello distintos métodos de aislamiento del ADN a partir de cepas de referencia del hongo así como de especímenes clínicos.

Materiales y Métodos

Se utilizaron nueve muestras clínicas, (7 muestras de sangre anticoaguladas con EDTA y dos muestras de médula ósea); las cuales fueron positivas para *H. capsulatum* de acuerdo a los métodos de coloración de Giemsa y cultivo del hongo. Estas muestras se obtuvieron, previo consentimiento informado, de pacientes con diagnóstico de histoplasmosis evaluados en la Sección de Micología Médica del Instituto de Medicina Tropical. Adicionalmente, se procesaron 7 muestras de sangre anticoaguladas con EDTA de pacientes sanos que sirvieron como controles negativos para la PCR. En cuanto a las muestras de aspirado de médula ósea, estas fueron homogenizadas añadiendo 500 µL de buffer TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 8,0) antes de realizar la extracción de ADN.

Muestras de cultivo

Se utilizaron 8 cultivos de *H. capsulatum* pertenecientes a la micoteca de la Sección de Micología Médica del Instituto de Medicina Tropical los cuales fueron utiliza-

dos como controles positivos de la PCR y para determinar la sensibilidad de la técnica. Todas estas cepas fueron aisladas a partir de cultivos a 37°C en agar BHI + 5% de sangre durante tres semanas.

Con la finalidad de determinar la especificidad de la PCR, se procesaron cepas de otros hongos patógenos tales como: *Paracoccidioides brasiliensis* (10833) y *Coccidioides immitis* (*Coccidioides posadasii*) (FMC315), que fueron sembradas en agar Sabouraud dextrosa, a 28°C durante 3 semanas y *Candida glabrata* (1945U), *Cryptococcus neoformans* (FMC232) sembradas en agar Sabouraud dextrosa, a 28°C por 3 días.

Extracción del ADN

Para la extracción del ADN de los cultivos anteriormente mencionados se preparó una suspensión del microorganismo en 200 µL de buffer TE. Tanto para las muestras clínicas como para las cepas de referencia de *H. capsulatum* y de otros hongos, se emplearon tres métodos diferentes de extracción de ADN basados en los siguientes reactivos: Tiocianato de Guanidina (Sigma), Triton X-100 (Sigma) y Cloruro de Bencilo (Sigma). Este último reactivo fue utilizado únicamente para la extracción del ADN de las cepas de hongos aisladas de los cultivos.

Extracción con Tiocianato de Guanidina (TG)

Se realizó la extracción del ADN cromosomal, a partir de cultivos y muestras clínicas mediante el método de Sandhu et al (7) con algunas modificaciones. A 200 µL de la muestra (sangre/EDTA, médula ósea ó suspensión del cultivo) se le adicionó 500 µL de reactivo de TG (Tiocianato de Guanidina 6M preparado en solución Tris HCL 50mM, pH 8.3). El contenido fue mezclado vigorosamente y luego calentado a 95°C por

45 min. Posteriormente se añadieron 250 µL de cloroformo: fenol: alcohol isoamílico (24:25:1) saturado con 100mM Tris pH 8:0 (Sigma) agitando vigorosamente la mezcla por 20 seg, para luego centrifugar 10 min. a 14.000 rpm. Seguidamente se retiró la fase acuosa y se mezcló con 500, a 4°C, se removió el sobrenadante y el precipitado, que contenía los ácidos nucleicos, fue lavado con 500 frío al 70% (Merck). Seguidamente, la suspensión se mezcló por inversión y fue centrifugada a 14.000 rpm por 15 min., a 4°C. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 25 almacenado a -20°C hasta el momento de su análisis.

Extracción con Triton X-100 (TX)

Esta técnica de extracción es una modificación del método de Hopfer et al. (13). A 1 mL de la muestra clínica o de la suspensión del cultivo se le adicionó 900 µL de solución TXTE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA, 1% Triton X-100). La suspensión fue calentada a 95°C por 45 min y mezclada vigorosamente por 10 min. El homogenato así obtenido se utilizó inmediatamente para la prueba de PCR.

Extracción con Cloruro de Bencilo (CB)

La extracción del ADN se realizó a partir de cultivos de *H. capsulatum* de acuerdo al procedimiento descrito por Poonwan et al y Zhu et al. (14,15) con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión del cultivo en 200 500 de Cloruro de bencilo (Sigma). La suspensión se mezcló y se incubó a 95°C por 45 min y seguidamente se centrifugó a 14.000 rpm por 15 min, a 4°C. El sobrenadante obtenido fue retirado y transferido a un nuevo tubo agregándole el equivalente de 1/10 de su volumen de solución de acetato de sodio 3M. La suspensión fue mezclada por inversión e

incubada a 4°C por 10 min y seguidamente se agregaron 500 4.000 rpm por 15 min y a 4°C, el precipitado que contenía el ADN, se lavó con etanol al 70% repitiéndose la centrifugación bajo las condiciones anteriormente descritas. Finalmente, el precipitado fue resuspendido en 25 µL de TE y luego almacenado a -20°C. Para la PCR se utilizó 10 µL de la preparación antes mencionada.

Ensayo de PCR

Las muestras de ADN obtenidas fueron amplificadas mediante la técnica de PCR en dos rondas (Nested-PCR) siguiendo el protocolo descrito por Bialek et al (10, 11). Se emplearon secuencias oligonucleótidas iniciadoras que reconocen y amplifican una región del genoma de *H. capsulatum* de 210pb correspondiente al gen para la proteína de 100 KDa (10, 11). La presencia de ADN de origen humano en las muestras clínicas se evidenció mediante la amplificación de una secuencia de 248pb específica para el gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (GAPDH) (11). Las condiciones de amplificación para ambos genes fueron las mismas descritas por Bialek y col. (10, 11). Todos los ensayos de PCR fueron realizados en un termociclador PTC-200 (MJ Research). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 3% (Invitrogen), y teñidos con solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL). Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV y registrados con un sistema de documentación digital de imágenes (Kodak gel documentation system, Kodak).

Resultados

Los resultados del análisis de tres métodos de extracción de ADN utilizados a partir de cultivos de *H. capsulatum* se muestran en

la Figura 1. La aplicación de la prueba de PCR para identificar el ADN del hongo generó un amplificado de 210 pares de bases (pb) específico para *H. capsulatum* el cual fue visualizado con los tres métodos de extracción evaluados: Triton X-100 (TX), Cloruro de Benzilo (CB) o Tiocianato de Guanidina (TG). Sin embargo, la intensidad de la banda del amplificado resultó mayor en las muestras aisladas con el reactivo TX, sugiriendo este resultado que la cantidad de ADN obtenido con este método fue mayor (Figura 1). Cabe destacar que resultados similares fueron obtenidos para los 8 cultivos de *H. capsulatum* procesados. Para las muestras de sangre y médula ósea, el método TG mostró un mejor rendimiento en términos de la intensidad del amplificado de ADN obtenido (Figura 2).

Con la finalidad de determinar la sensibilidad de la prueba de PCR en dos rondas (Nested-PCR), se realizaron diluciones seriadas de muestras de ADN extraídas a partir de los cultivos de *H. capsulatum*, mediante el método de extracción con TG. Se evidenció que hasta 10pg de ADN de *H. capsulatum* podrían ser visualizados en el gel de agarosa luego de su amplificación por PCR (datos no mostrados).

En cuanto a la especificidad de la prueba de PCR, no se identificaron amplificados en muestras de ADN obtenidas de *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* y *Coccidioides immitis* (*C. posadasii*) (Figura 3). Tampoco hubo amplificación en muestras de ADN extraídas de sangre de individuos sanos (controles negativos).

En general, de un total de 9 muestras clínicas procesadas de pacientes con histoplasmosis (7 muestras de sangre y dos de médula ósea) solo dos muestras de sangre resultaron negativas para el ADN de *H. capsula-*

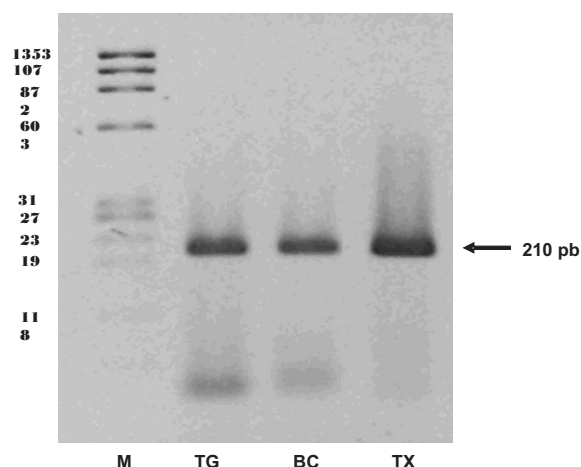


Figura 1. Evaluación de 3 métodos diferentes de extracción de ADN a partir de cultivos de *H. capsulatum*. El ADN fue aislado de acuerdo a metodologías que emplean los reactivos: Tiocianato de Guanidina (TG), Cloruro de Benzilo (BC) y Triton X-100 (TX) y posteriormente analizado por PCR como se indica en materiales y métodos. M: Marcador de Peso Molecular en pares de bases (pb). La flecha señala el producto de PCR de 210 pb específico para *H. capsulatum*.

tum. La posibilidad de que estas dos muestras no contenían ADN fue descartada debido a que las mismas resultaron positivas para el ADN del gen humano GADPH (Figura 2).

Discusión

La histoplasmosis, descrita en un principio como una enfermedad primariamente de las comunidades rurales, esta emergiendo como un serio problema de salud pública en el medio urbano (5). Actualmente, el diagnóstico de la histoplasmosis se lleva a cabo mediante la detección del organismo a través

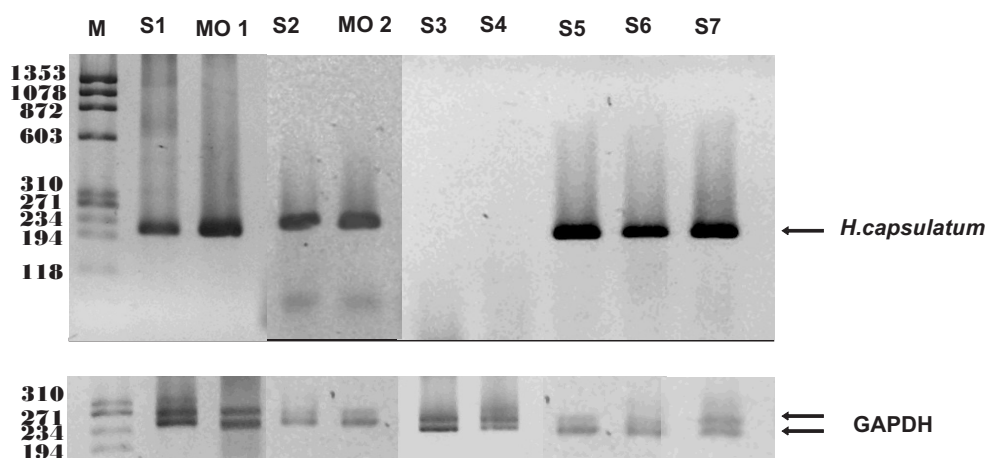


Figura 2. Detección de ADN de *H. capsulatum* en muestras de sangre y médula ósea. El ADN fue aislado a partir de muestras de sangre (S) y médula ósea (MO) de pacientes con diagnóstico de histoplasmosis utilizando el método de Tiocianato de guanadina (TG) y posteriormente analizado por PCR. M: Marcador de peso molecular en pares de bases (pb). La flecha muestra los productos de PCR de *H. capsulatum* (210 pb) y los productos de PCR para Glicerinaldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (248 pb).

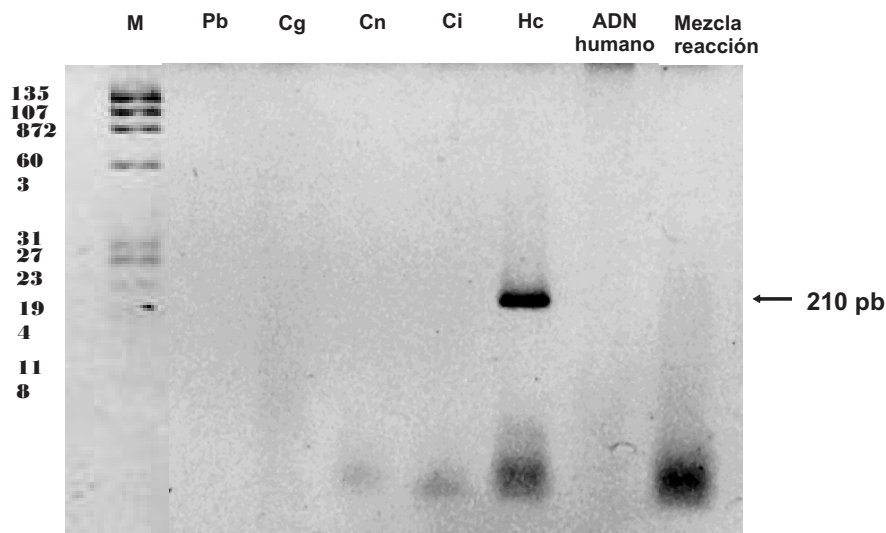


Figura 3. Especificidad del ensayo de PCR para la detección de ADN de *H. capsulatum*. Se aisló el ADN de diferentes hongos y se realizó la prueba de PCR empleando las secuencias cebadoras para *H. capsulatum*. Los hongos analizados corresponden a *P. brasiliensis* (Pb), *C. glabrata* (Cg), *C. neoformans* (Cn), *C. inmitis* 8(*C. posadasii*) (Ci), e *H. capsulatum* (Hc). M: marcador de peso molecular en pares de bases. La flecha indica el producto de PCR específico para *H. capsulatum* de 210pb.

del examen directo y coloraciones especiales tales como Giemsa, Grocott, Wright entre otras, el cultivo micológico de muestras clínicas y las pruebas serológicas. Sin embargo, los métodos anteriormente mencionados no son suficientes ya que su sensibilidad varía con las diferentes formas clínicas (1, 6). Aunque el cultivo de *H. capsulatum* es el método confirmatorio por excelencia, el hongo, por causas todavía no bien dilucidadas, puede no crecer o demorarse en su crecimiento de 4 a 6 semanas.

Un gran avance en el diagnóstico de la histoplasmosis se ha experimentado en los últimos años gracias a la biología molecular. Entre las diversas técnicas moleculares utilizadas para la identificación de *H. capsulatum*, el método de PCR en dos rondas desarrollado por Bialek et al. se presenta como una de las herramientas de mayor valor diagnóstico (9-11). Dichos autores señalan que a través de este método se logra amplificar una cantidad de ADN equivalente a 5 copias del genoma de *H. capsulatum* (11). Los resultados obtenidos en el presente estudio confirman la elevada sensibilidad y especificidad de esta técnica lográndose identificar hasta 10 pg de ADN provenientes de diferentes cultivos del hongo. Resultados similares fueron obtenidos en 9 muestras clínicas evaluadas, pudiéndose identificar ADN del hongo en 5 muestras de sangre y 2 de médula ósea. No se detectó ADN específico en dos de las muestras de sangre provenientes de pacientes con clínica y diagnóstico de laboratorio para histoplasmosis. Estos resultados podrían atribuirse al hecho de que para el momento de la toma de la muestra no había fungemia, o también a una distribución desigual del hongo en el paciente lo cual determina que dicho agente infeccioso no esté presente en sangre o médula ósea. La exploración de otros órganos o tejidos susceptibles a la infec-

ción por *H. capsulatum* permitiría dilucidar esta interrogante.

Es importante resaltar que en el presente estudio se evaluaron tres métodos de extracción de ADN con los cuales se ensayaron algunas modificaciones en el procesamiento de las muestras biológicas. De los tres métodos, el ensayo modificado con Tiocianato de Guanidina generó los mejores resultados en términos de rendimiento y fácil aplicación a las muestras clínicas. De esta forma, la combinación de este procedimiento de aislamiento de ADN con la técnica de PCR en dos rondas representa una poderosa herramienta de diagnóstico molecular de gran utilidad para el estudio de la histoplasmosis.

Referencias Bibliográficas

- (1) Wheat J. Histoplasmosis. Experience during outbreaks in Indianapolis and review of the literature. *Medicine* 1997; 76:339-354.
- (2) Gresham A, Curren histopathology in: Sappfelder K, Liscano T, Sauerteig E editors Atlas of fungal pathology. 17^{va} ed. London: Kluwer Academia Publishers; 1990. p.73-97.
- (3) Cavallera E. Casuística 1984-1993 de las micosis profundas y 1986-1993 de las micosis superficiales. *Boletín informativo de las Micosis en Venezuela* 1996; 28:13-17.
- (4) Vargas H. Histoplasmosis. *Boletín informativo de las Micosis en Venezuela* 1997; 30: 33-36
- (5) Warnock DW. Epidemiology and control of the endemic mycoses. XVth International Congress for Tropical Medicine and Malaria; 2000 August 20-25. Abstracts Vol 1; WeS6-4: 198
- (6) Wheat J. Current diagnosis of histoplasmosis Review. *Trends in Microbiology* 2003; 11: 488-494.
- (7) Sandhu G, Kline B, Stockman L, Roberts G. Molecular Probes for diagnosis of fungal Infections. *J Clin Microbiol.* 1995; 33: 2913-2919.
- (8) Hendolin P, Paulin L, Koukila-Kähkölä P, Anttila V, Malmberg K, Richardson M,

- Ylikoski J. Panfungal PCR and Multiplex Liquid Hybridization for Detection of fungi in Tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4186-4192.
- (9) Quinet B, Vera C, Medeiros M, Carvalho P, Fialho P, Santos R, et al. Histoplasmosis in Brazilian center: clinical forms and laboratory test. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 141-146.
- (10) Bialek R, Fischer J, Feuch A, Najvar L, Dietz K, Knobloch J et al. Diagnosis and Monitoring of Murine Histoplasmosis by a Nested PCR Assay. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:1506-1509.
- (11) Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling G, 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: 1644-1647.
- (12) Rickerts V, Bialek R, Tintelnot K, Jacobi V, Just-Nübling G. Rapid PCR-Based Diagnosis of Disseminated Histoplasmosis in an AIDS Patient. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 21:821-823
- (13) Hopfer R, Walden P, Setterquist S, Highsmith E. Detection and differentiation of fungi in clinical specimens using polymerase chain reaction (PCR) amplification and restriction enzyme analysis. *J Med Vet Mycol* 1993; 31:65-75.
- (14) Poonwan N, Imai T, Mekha N, Yazawa K, Mikami Y, Ando A and Nagata Y. Genetic analysis of *Histoplasma capsulatum* strains Isolated from Clinical Specimens in Thailand by PCR-based Random Amplified Polymorphic DNA Method. *J Clin Microbiol* 1998; 36:3073-3076.
- (15) Zhu H, Qu F, Zhu LH. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucl Acids Res* 1993; 21:527-528.