

Comunicación corta

Evaluación de la técnica de PCR anidada para el diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii*

María Mercedes Panizo^{a,*}, Víctor Alarcón^a, Vera Reviakina^a, Trina Navas^b

^aDepartamento de Micología, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. ^bHospital General del Oeste Dr. José Gregorio Hernández, Caracas, Venezuela.

Recibido 6 de septiembre de 2009; aceptado 26 de octubre de 2009

Resumen: Se realizó un estudio comparativo entre las técnicas de inmunofluorescencia directa (IFD) y la reacción en cadena de la polimerasa anidada (PCRa) en 62 muestras del tracto respiratorio inferior, con la finalidad de evaluar la técnica de PCRa para el diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii*. Al comparar ambas técnicas, la PCRa obtuvo valores de sensibilidad 100%; especificidad 79,2%; valor predictivo positivo 58,3%; valor predictivo negativo 100% y una concordancia de 84% con la técnica de IFD. La PCRa para el diagnóstico de neumocistosis predice con éxito la ausencia de la enfermedad cuando el resultado es negativo. Ante un resultado positivo, debe tomarse en cuenta la condición clínica del paciente, ya que la prueba no es capaz de discriminar entre colonización e infección.

Palabras clave: *Pneumocystis jirovecii*, inmunofluorescencia directa, PCR anidada

Evaluation of the nested PCR technique for *Pneumocystis jirovecii* diagnosis

Abstract: A comparative study between the direct immunofluorescence technique (DIF) and the nested polymerase chain reaction (nPCR) was carried out in 62 samples taken from the lower respiratory tract in order to evaluate the nPCR technique for *Pneumocystis jirovecii* diagnosis. When comparing both techniques, nPCR showed 100% sensitivity, 79.2% specificity, 58.3% positive predictive value, 100% negative predictive value, and 84% of agreement with the DIF technique. nPCR used for pneumocystosis diagnosis successfully predicts absence of disease when the result is negative. With a positive result, the clinical condition of the patient should be taken into account since the test is not capable of discriminating between colonization and infection.

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, direct immunofluorescence, nested PCR

* Correspondencia:
E-mail: mmpanizo@gmail.com

Introducción

Pneumocystis jirovecii es el agente causal de la neumocistosis, una infección pulmonar severa que padecen principalmente los pacientes inmunosuprimidos [1-4]. Su diagnóstico se basa en la detección microscópica del microorganismo en una gran variedad de muestras del tracto respiratorio, mediante coloraciones (Giemsa, azul de toluidina, Gomori-Grocott) o inmunofluorescencia directa (IFD), esta última considerada la técnica de preferencia para el diagnóstico de la enfermedad [5-7]. Debido a que este hongo no es cultivable, es necesario desarrollar métodos alternativos para la detección del mismo, que en conjunto con los métodos tradicionales, proporcionen un diagnóstico precoz de la enfermedad.

Hasta ahora, en Venezuela, todas las investigaciones sobre la neumocistosis se han realizado usando IFD

[3,4,8,9] y no se dispone de técnicas de detección basadas en biología molecular. En este sentido, la finalidad de este trabajo consistió en evaluar la técnica de PCR anidada (PCRa) versus la IFD (como técnica de referencia o patrón oro), para implementarla como nueva herramienta en el diagnóstico de esta enfermedad.

Materiales y métodos

En este estudio se utilizaron 62 muestras del tracto respiratorio inferior distribuidas así: 4 lavados broncoalveolares (LBA), 3 esputos inducidos (EI), 51 esputos espontáneos (EE) y 4 secreciones bronquiales (SB), provenientes de pacientes con sospecha clínica de neumocistosis y recolectadas en el transcurso de un año (enero-diciembre de 2007).

Se realizó la técnica de IFD con el kit de Merifluor® *Pneumocystis* (Meridian Bioscience Inc), para la detección *in vitro* de *P. jirovecii* en muestras del tracto respiratorio. Para el procesamiento de las muestras de LBA y EI se siguieron las instrucciones del fabricante, mientras que las muestras de EE y SB se procesaron según el procedimiento estandarizado en el Departamento de Micología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" [2,4,8]. Como control positivo se utilizó una muestra de LBA de un paciente con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), con diagnóstico clínico de neumocistosis y coloración de Gomori-Grocott e IFD positivas para *P. jirovecii*.

Los sedimentos obtenidos de las muestras se dividieron en dos porciones: una para el análisis por IFD y otra fue congelada a -70°C hasta su utilización en las pruebas moleculares.

Para el análisis molecular, se realizó un ensayo de PCRA con el uso de los cebadores propuestos en el protocolo descrito por Wakefield *et al* [10-12], cuyas secuencias son complementarias a la región de la subunidad mayor mitocondrial (mtLSUrRNA) del genoma de *Pneumocystis*. El ADN fue extraído a partir de las muestras antes mencionadas mediante la utilización del QIAamp DNA Mini kit (QIAGEN), usando el protocolo para tejidos. A 200 µl de suspensión del sedimento de cada muestra en solución salina tamponada con fosfatos a pH 7,2 (PBS), se le adicionaron 20 µl de proteasa, 4 µl de ARNasa A (100 mg/ml, QIAGEN) no provista por el kit y 200 µl de solución tampón AL. El procedimiento continuó posteriormente siguiendo las recomendaciones del fabricante. En la primera ronda de amplificación, se colocaron 5 µl del ADN extraído en una mezcla de reacción preparada con solución tampón 10mM Tris-HCL (pH 8,8), 10mM KCL, 0,002% Tween 20 vol/vol (First Strand Buffer, invitrogen); 50mM de MgCl₂ (invitrogen); 100mM de oligonucleótidos (invitrogen); 0,1mM de ditriotrietol (invitrogen); 40 U/µl de inhibidor recombinante de ribonucleasas (invitrogen); 10mM de cada uno de los cebadores externos pAZ102-E (5'-GATGGCTGTTTCCAAGCCCA-3') y pAZ102-H (5'-GTGTACGTTAAGCCCA-3') (Molecular Bioscience Inc); 5 U/µl de Taq ADN polimerasa recombinante (invitrogen) y de agua libre de nucleasas (invitrogen), para completar un volumen de 50 µl por reacción. La segunda ronda de amplificación fue realizada a partir de 5 µl del producto obtenido en la primera ronda de amplificación, previamente diluido 1 en 10 veces con agua libre de nucleasas (invitrogen). La mezcla de reacción para esta segunda etapa contenía los mismos reactivos de la primera ronda, en las mismas concentraciones, con la excepción de los cebadores internos [(10mM de cada uno de los cebadores pAZ102-X (5'-GTCAAATACAAATCGGACTAGG-3') y pAZ102-Y (5'-TCACTTAATATTAATTGGGGA GC-3') (Molecular Bioscience Inc)], el ditriotrietol y el inhibidor recombinante de ribonucleasas. Ambas rondas de la PCRA se realizaron en un termociclador modelo iCycler® (Laboratorios Bio-Rad) bajo las mismas condiciones: 94°C por 1,5 minutos; 55°C por 1,5 minutos y 72°C por 2 minutos durante un total de 40 ciclos.

Posteriormente, a 10 µl del amplicón generado en cada una de las reacciones de PCRA se le añadieron 2 µl de solución tamponada de carga 6X (0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xylene cyanole FF y 30% solución acuosa de glicerol grado molecular), para luego someterlos a una corrida electroforética a 120 voltios por 30 minutos en un gel de agarosa al 2% (100 mg de agarosa grado molecular/invitrogen en 50 ml de solución tamponada TBE 0,5X pH 8,0), teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml, GIBCO, BRL). Se incluyeron en la corrida electroforética marcadores de peso molecular de 100 y 50 pb (Amersham GE Healthcare). El producto de PCRA fue finalmente visualizado en un sistema de documentación de imágenes (Gel Doc XR®, Laboratorios Bio-Rad), usando el software de análisis 1D Quantity One® (Laboratorios Bio-Rad). Se consideró como muestra positiva, aquella en la cual se evidenciara la presencia de una banda de 346 pares de bases para el amplicón generado en la primera ronda de PCRA y/o una banda de 260 pares de bases para el amplicón generado en la segunda ronda de PCRA.

Como controles para la PCRA se usaron: control positivo de muestras (el mismo usado en las pruebas de IFD), control de reacción en el termociclador (ADN comercial de 500 pb, Laboratorios Perkin-Elmer, USA) y control de reactivos. Todos fueron procesados bajo las mismas condiciones en que fueron tratadas las muestras en estudio a fin de monitorear posibles contaminaciones y para validar los resultados obtenidos.

Las variables fueron descritas mediante medidas de tendencia central y porcentajes. La prueba de Chi cuadrado (X^2) y las tablas de contingencia de 2x2 se usaron para la evaluación estadística, tomando un valor de $p \leq 0,05$ como significativo. Se calcularon valores de sensibilidad (S), especificidad (E), valores predictivos positivos y negativos (VPP y VPN), errores mayores (EM), errores graves (EG) y el porcentaje de concordancia para la prueba de PCRA en comparación con la IFD. Los EM fueron identificados como aquellos resultados positivos por IFD que resultaron negativos por PCRA y los EG fueron aquellos resultados negativos por IFD que dieron positivos por PCRA.

Resultados y discusión

De las 62 muestras procesadas, 14 resultaron positivas por IFD y PCRA, 10 fueron negativas por IFD pero positivas por PCRA y 38 dieron resultados negativos por ambas técnicas. Se encontró una asociación estadísticamente significativa al comparar los resultados de ambas pruebas ($p < 0,05$), por lo tanto, la PCRA puede ser usada para el diagnóstico de la neumocistosis. Se obtuvieron valores de S=100%, E=79,2%, VPP=58,3% y VPN=100%, comparables a los reportados en la literatura con el uso de la PCRA para el diagnóstico de *P. jirovecii*, los cuales varían entre 96-100% para la sensibilidad y 60-80% para la especificidad, usando muestras de LBA y EI [3,5-7,10]. Para la evaluación de la PCRA en este trabajo se usaron muestras de LBA y EI, pero el mayor volumen de las mismas fue de EE, por lo que los valores obtenidos de sensibilidad y especificidad para esta técnica cobran una gran importan-

cia, ya que pueden incrementarse en la medida en que se utilicen buenos procedimientos al procesar muestras no invasoras para la técnica de PCRa. Por otra parte, un VPN igual a 100% para la PCRa la convierte en una técnica de elevado valor diagnóstico, ya que un resultado negativo por esta prueba excluye la presencia de la enfermedad [7,13].

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos en la primera ronda del PCRa, en donde se observan amplicones de 346 pares de bases. En la figura 2 se muestran los resultados correspondientes a la segunda ronda de amplificación, en la cual se observan los amplicones de 260 pares de bases. Es importante aclarar que se deben realizar ambas rondas del PCRa. Todas aquellas muestras que no generaron amplicones en la primera ronda deben ser corridas nuevamente en la segunda ronda, ya que es en esta última donde pueden evidenciarse muestras que en la ronda inicial cursaron con bajas concentraciones de ADN.

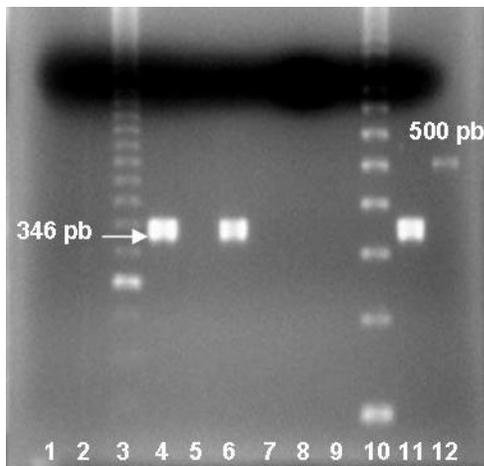


Figura 1. Primera ronda de la PCRa para *P. jirovecii*. Carril 1: Control negativo de muestras. Carril 2: Control de reactivos. Carril 3: Marcador de peso molecular 500 pb. Carriles 4 y 6: Muestras positivas. Carriles 5,7,8 y 9: Muestras negativas. Carril 10: Marcador de peso molecular 100 pb. Carril 11: Control positivo de muestras. Carril 12: Control de PCR.

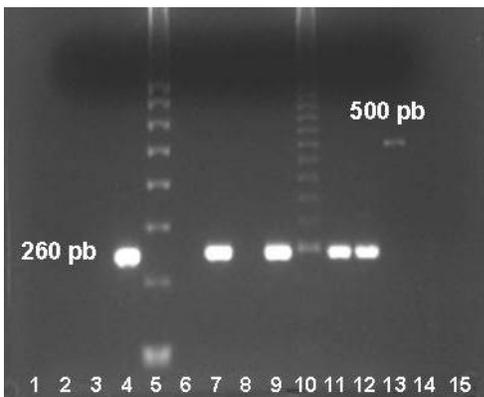


Figura 2. Segunda ronda de la PCR anidada para *P. jirovecii*. Carril 1: Vacío. Carril 2: Control negativo de muestras. Carril 3: Control de reactivos. Carriles 4, 7, 9 y 11: Muestras positivas. Carril 5: Marcador de peso molecular 100 pb. Carriles 6 y 8: Muestras negativas. Carril 10: Marcador de peso molecular 50 pb. Carril 12: Control positivo de muestras. Carril 13: Control de PCR. Carriles 14 y 15: Vacíos.

No se obtuvieron EM al comparar la PCRa con la IFD, pero si se presentaron EG en un 16% (10 muestras negativas por IFD pero positivas por PCRa) y la concordancia entre ambas pruebas fue de 84%. La IFD es considerada como la metodología de referencia para el diagnóstico de la neumocistosis, debido a sus altos niveles de sensibilidad y especificidad, ambos por encima del 95%, lo que implica que un resultado positivo se atribuye a la presencia de la enfermedad, mientras que un resultado negativo la excluye [5,6]. La PCRa en cambio, es capaz de detectar el ADN de *P. jirovecii* independientemente de su viabilidad en la muestra clínica, debido a su gran sensibilidad, por lo tanto, no es capaz de discriminar adecuadamente entre colonización e infección en algunos casos, lo que disminuye sus valores de especificidad. Esto implica que un resultado positivo debe ser interpretado con precaución y es indispensable poseer toda la información acerca de la condición clínica del paciente. Por otra parte, también se debe tomar en consideración que un resultado negativo por IFD, en un paciente con sintomatología, puede deberse a una escasa cantidad del microorganismo en la muestra que no puede ser detectada por la IFD; en estos casos, la PCRa sería muy útil para diagnosticar la presencia de la enfermedad. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores [7,13].

Finalmente, concluimos que la IFD sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico de la neumocistosis y la PCRa puede utilizarse como técnica de apoyo para los mismos fines, debido a su elevado valor predictivo negativo.

Agradecimientos

Los resultados de este estudio corresponden al Trabajo Especial de Grado de Especialización en Micología Médica del Lic. Víctor Alarcón y fueron presentados en el 17th Congress of The International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM 2009) en Tokio, Japón.

Este estudio fue parcialmente financiado por el proyecto FONACIT N° F-2005000211.

Referencias

1. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 891-6.
2. Panizo M, Reviákina V. *Pneumocystis carinii* y neumocistosis. *Med Intern (Caracas).* 2002; 18: 90-106.
3. Casanova K, Sáez A, Navas T, Reviákina V, Panizo M, Chiriboga D. Epidemiología de la neumocistosis. *Med Intern (Caracas).* 2006; 22: 207-26.
4. Panizo MM, Reviákina V, Navas T, Casanova K, Sáez A, y col. Neumocistosis en pacientes venezolanos: diagnóstico y epidemiología (2001-2006). *Rev Iberoam Micol.* 2008; 25: 226-31.
5. Cruciani M, Marcati P, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients. *Eur Respir J.* 2002; 20: 982-9.

6. Flori P, Bellele B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, *et al.* Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol.* 2004; 53: 603-7.
7. Olson M, Stralin K, Holmberg H. Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7: 492-7.
8. Panizo M, Reviákina V, Vásquez C. Diagnóstico de *Pneumocystis carinii* por inmunofluorescencia directa modificada y coloración de Gomori-Grocott. Estudio comparativo. *Bol Soc Ven Microbiol.* 2000; 20: 98-103.
9. Cermeño JR, Hernández de Cuesta I, Alcalá F, Áppice M. *Pneumocystis jirovecii* en centros hospitalarios del estado Bolívar, Venezuela. *Rev Biomed.* 2006; 17: 169-74.
10. Wakefield AE, Guiver L, Miller RF, Hopkin JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet.* 1991; 337: 1378-9.
11. Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol.* 1996; 34: 1754-9.
12. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxan ER, Hopkin JM. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet.* 1990; 336: 451-3.
13. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11:245-50.