

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS TINTORIALES PARA *Pneumocystis jirovecii*

(Diagnostic methods staining for *Pneumocystis jirovecii*)

Peggy Vieille O.¹ & Daniela Fuentes²

Cátedra de Micología^{1,2}
Departamento de Anatomía Patológica¹
Escuela de Medicina. Universidad de Valparaíso
Casilla 92 V. Valparaíso
peggy.vieille@uv.cl

Palabras clave: *Pneumocystis*, tinciones, gomori-grocott

Key words: *Pneumocystis*, staining, gomori-grocott

RESUMEN

Se realizó una búsqueda en base de datos Cabdirect bajo los términos «*Pneumocystis-stain*» entre los años 1990 a 2010., revisándose 109 trabajos relacionados al diagnóstico y estudio de la neumocistosis. Las metodologías empleadas fueron clasificadas en 6 grupos según su frecuencia: Tinción con Gomori-Grocott; Giemsa; Azul de toluidina; Otras tinciones (pap, blanco de calcofluor, gram, may grunwald giemsa); además de inmunofluorescencia directa y PCR (en cualquiera de sus variantes). Se observó una constante en el empleo de las tinciones histológicas en ambas décadas, mayormente con las tinciones de Gomori-Grocott y Giemsa. Sin embargo y como es de esperar, aumenta en la segunda década la tendencia del diagnóstico a través de técnicas moleculares.

INTRODUCCIÓN

La neumocistosis en humanos fue descrita durante el transcurso de la segunda guerra mundial. Se asoció histológicamente a una neumonía intersticial de células plasmáticas, relacionada en aquella época a niños prematuros y/o desnutridos (Vanek, 1951). Algunos años más tarde, al iniciarse las terapias antineoplásicas, se comienzan a describir los primeros casos en pacientes adultos inmunocomprometidos, al igual que en aquellos con defectos congénitos de la inmunidad (Esterly &

ABSTRACT

Was performed a database search Cabdirect under the terms "*pneumonia-stain*" between the years 1990 to 2010, 109 papers being revised, and study related to the diagnosis of pneumocystosis. The methodologies used were classified into six groups according to their frequency: Gomori-Grocott stain, Giemsa, toluidine blue, Other stains (pap, calcofluor white, Gram, May Grunwald Giemsa), in addition to direct immunofluorescence and PCR (in any of their variants). There was a constant in the use of histological stains in both decades, mostly with Gomori-Grocott staining and Giemsa. However, as expected, increases in the second decade, the trend of diagnosis using molecular techniques.

Warner, 1965). Posteriormente, en los inicios de 1980, la neumocistosis es diagnosticada en pacientes adultos inmunocomprometidos por causa no conocida. Esta alerta constituyó una de las primeras evidencias para el descubrimiento del VIH (Wong, 1984). Desde este punto de la historia, la neumocistosis pasa a ser reconocida como «enfermedad marcadora» de pacientes infectados por VIH en etapa SIDA.

Taxonómicamente, fue nombrado por el matrimonio Delanøe del Instituto Pasteur, según su tropismo y morfología: *Pneumo* (pulmón)–*cystis* (quiste) y *-carinii* (por Antonio Carini, quien le envió sus placas histológicas para su estudio)(Macfarlane & Finch,1985). Desde su descubrimiento en 1909 y hasta 2001 perteneció al reino protista, año en que fue oficialmente reclasificado como hongo perteneciente a la clase ascomycota, taphrinamyco-tina, pneumocystidiales, pneumocystidiomycetes, pneumocystidaceae y renombrada la especie infectante del hombre como *Pneumocystis jirovecii*- (*jirovecii*, por Otto Jirovec, quien lo asoció a la etiología de la neumonía intersticial de células plasmáticas) y para la forma infectante de ratas como *P. carinii* (Stringer *et al.* 2001, 2002; Benchimol & de Souza, 2005).

El ciclo de vida de *Pneumocystis spp.* comprende 2 etapas de desarrollo: un primer ciclo asexual, el cual consiste en divisiones mitóticas de las formas tróficas (1-4 µm de diámetro). El segundo ciclo, sexual consta de la fusión de dos trofozoitos (ascosporas) con cariogamia, la formación de un prequiste con meiosis I y II, la formación de un prequiste intermediario con mitosis consecutiva hasta alcanzar una célula con 8 núcleos, y finalmente la etapa de quiste (asco) tardío (5-8 µm de diámetro) donde ocurre la delimitación de estos 8 núcleos formando 8 correspondientes cuerpos intraquísticos los que serán liberados al espacio alveolar e iniciar así un nuevo ciclo asexual.(Benchimol & de Souza, 2005;Aliouat-Denis *et al.*,2009) **Figura 2.**

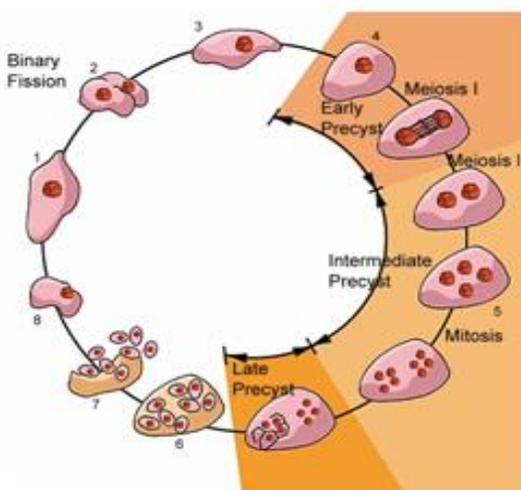


Figura 2: Diagrama resumen del ciclo de vida de *Pneumocystis spp.* (imagen tomada de de Souza & Benchimol. 2005)

Al ser *Pneumocystis spp.* un microorganismo que no crece *in vitro* en medios de cultivo microbiológicos, se hace necesaria su identificación por otros métodos que van desde la observación en estado fresco de un frotis hasta análisis moleculares. De todos ellos, los métodos tintoriales continúan siendo muy valiosos para su diagnóstico.

Las tinciones más empleadas para detectar *Pneumocystis jirovecii*, tanto en frotis como en tejido son: **Gomori-Grocott**, correspondiente a una coloración por impregnación con sales de plata, comúnmente empleado en la detección de hongos. **Giemsa** y **Azul de Toluidina**, colorantes metacromáticos empleados para frotis sanguíneos entre otras aplicaciones. **Gram-Weigert**, una modificación de la tradicional tinción de Gram para microbiología. Tinción de **Papanicolau**, empleado en diagnóstico citológico. Y otras, correspondientes a tinciones inmunofluorescentes, como **Blanco de calcoflúor**, utilizado en la identificación de estructuras fúngicas y **Merifluor Pneumocystis**, tinción inmunofluorescente directa. (García del Moral, 1993; Reiss *et al.* 2012). Existen en la literatura estudios que han demostrado la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para cada una de ellas, ya que poseen distinta afinidad tintorial dentro del ciclo de vida del *pneumocystis*. Gomori-grocott, azul de toluidina y blanco de calcofluor tiñen la etapa de quiste;. Gram-weigert y Merifluor pneumocystis teñirán ambas etapas: quiste y trofozoito. Giemsa solo la etapa de trofozoito y la tinción de papanicolau, tiñe el exudado espumoso producido durante un cuadro de neumocistosis.

Debido a la importancia clínica que implica un diagnóstico de neumocistosis y ante la ausencia de un sistema de cultivo *in vitro*, el objetivo del presente trabajo es la revisión de publicaciones relacionadas al diagnóstico de *Pneumocystis* a través de métodos tintoriales, ya que siguen siendo ampliamente empleados en la rutina de los laboratorios clínicos carentes de tecnologías contemporáneas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se revisaron 109 trabajos, entre los años 1990 a 2010, relacionados al diagnóstico y estudio de la neumocistosis. Se clasificaron las metodologías empleadas en 6 grupos según su frecuencia: Tinción con Gomori-Grocott; Giemsa; Azul de toluidina; Otras tinciones (pap, blanco de calcofluor, gram, may grunwald giemsa) ; además de inmunofluorescencia directa y PCR(en cualquiera de sus variantes). No todas las publicaciones revisadas se enlistan en «referencias», solo los trabajos comparativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Existen en la literatura variados trabajos que comparan las tinciones histológicas/citológicas entre ellas y frente a metodologías moleculares. De una revisión de 109 trabajos entre 1990 a 2010, con un total de 9 metodologías empleadas en cada década, y clasificadas en 6 grupos según su frecuencia, se observó la siguiente tendencia en la elección de las éstas (Gráfico 1):

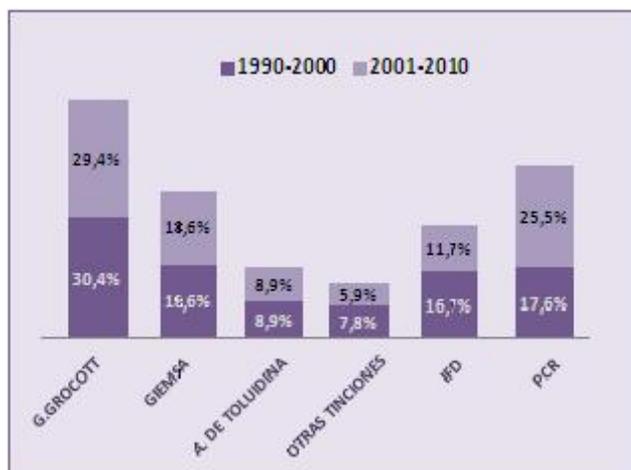


Gráfico 1: Porcentaje de las metodologías diagnósticas empleadas para la identificación de *Pneumocystis jirovecii* en las últimas dos décadas.

Se observa una constante en el empleo de las tinciones histológicas, Gomori-Grocott y Giemsa con los mayores porcentajes, similares en ambas décadas, sin embargo y como es de esperar, aumenta en la segunda década, la tendencia del diagnóstico a través de técnicas moleculares.

En cuanto a los trabajos comparativos tintoriales, Casanova *et al.* en 1996, realiza una comparación entre las tinciones Azul de Toluidina, Giemsa modificado (Diff-Quik) y Gomori-Grocott en lavados broncoalveolares (LBA) procedentes de ratas, con ésta última como gold estándar. Sus resultados fueron de 93%, 27% y 100% de sensibilidad, respectivamente. Sugirieron emplear la tinción de plata para garantizar resultados diagnósticos. En 2004, Procop *et al.* comparó cuatro métodos de tinción en frotis: Gomori-Grocott, Diff-Quik, Blanco de Calcofluor y Merifluor *Pneumocystis*. Sus resultados mostraron que los valores predictivos positivos y negativos superaban el 90% empleado las coloraciones de Blanco de Calcofluor y Gomori-Grocott. Concluyó que ambas poseen los mejores parámetros para el uso rutinario en el laboratorio. Un año después, Bava *et al.* 2005, comparó en pacientes con sida, la eficacia de 3 métodos diagnósticos: preparaciones en fresco, Gomori-

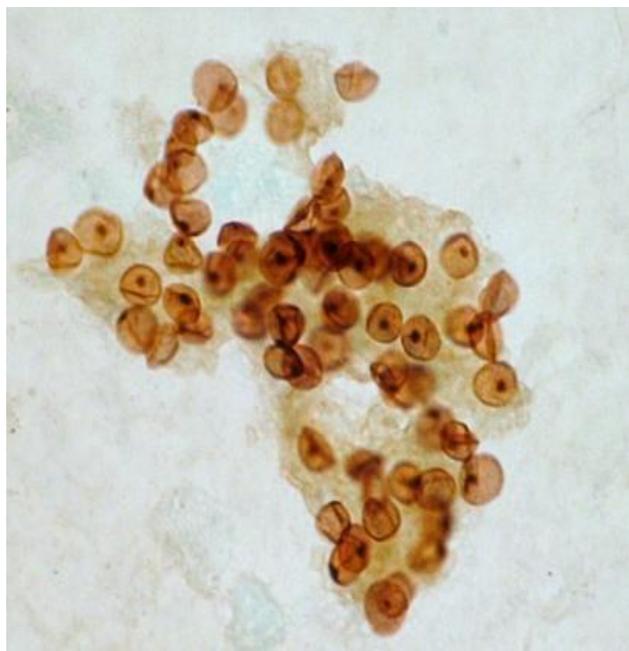
Grocott e inmunofluorescencia directa (IFD). Tomando como referencia la IFD por su reconocida sensibilidad y especificidad, concluyó que en pacientes con sida debido a la alta carga de microorganismos que ellos poseen, la identificación en fresco de estructuras típicas en «panal de abejas» es de gran utilidad como prueba tamiz, obtuvo con ella una especificidad y sensibilidad de 85% y 100% y de 71% y 100% con Gomori-Grocott, con un VPN de 96% y 94%, respectivamente. Sin embargo, aclara que este esquema puede ser poco exitoso en pacientes no VIH/sida con una carga de *pneumocystis* menor.

La tinción de Papanicolau (PAP), coloración de rutina en muchos centros citopatológicos, también ha sido empleada para diagnóstico de neumocistosis. En relación a ella, Schumann & Swensen en 1991, luego de compararla con Gomori-Grocott en LBA, publicaron que la neumocistosis podría ser diagnosticada en muestras de LBA solo con la tinción de PAP y que las demás tinciones especiales son innecesarias. Diferentes resultados obtuvo Raabs *et al.* 1994, al comparar cuatro formas tintoriales: Gomori-Grocott, Diff Quik, Papanicolau y Papanicolau/Diff quik combinado en LBA; la sensibilidad para la detección del hongo en cada una de ellas respectivamente fue de 100%, 88%, 88% y 100%. Nassar *et al.* 2006, en una revisión sobre la utilidad de estas mismas tinciones, recomienda utilizar la tinción de Gomori-Grocott solo en casos en que la tinción de PAP sea negativa y que la presentación clínica sea consistente con PCP. La tinción de Papanicolau, detecta la presencia de formación alveolar espumosa o material floculante en los frotis teñidos, es indicativo de infección por *Pneumocystis jirovecii*, no obstante no identifica al agente propiamente tal, sino que el hallazgo de este material es un criterio de presunción diagnóstica de la infección en frotis citológicos (Nassar *et al.* 2006).

Dentro de los métodos moleculares, el uso de PCR ha demostrado tener mayor sensibilidad y especificidad que los métodos tintoriales para el diagnóstico de neumocistosis en muestras de LBA y esputo inducido (Thomas, 2004). Walkefield *et al.* 1990, mostró la primera evidencia del uso de estos métodos. En los últimos años, la PCR en tiempo real, ha mostrado ser una técnica rápida, con un tiempo menor de 3 horas incluyendo la extracción, amplificación y visualización. Posee una alta sensibilidad al igual que la PCR convencional, pero tiene la ventaja adicional de la cuantificación de las copias de DNA pudiéndose determinar un punto de corte que permita la diferenciación entre portación del microorganismo y la enfermedad para la mayoría de los casos (Flori *et al.* 2004). Otra gran utilidad de

los estudios moleculares recae en los análisis de mutaciones del gen de la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS), que genera resistencia de estos microorganismos a las sulfamidas. Estas mutaciones aparentemente están asociadas al uso previo de las mismas y podrían identificar a la vez, la presencia de fenotipos resistentes en la comunidad (Álvarez, 2008).

En 2010, se publicó una nueva aplicación para la citometría de flujo: la detección de *Pneumocystis jirovecii*. En el trabajo de Barbosa *et al.* se desarrolla y optimiza un protocolo específico para su identificación. Compararon análisis de muestras respiratorias por medio de tinción de inmunofluorescencia (IF) y la detección por citofluorometría (CF), considerando el criterio clínico como diagnóstico estándar. Sus resultados mostraron superioridad de la CF frente a la IF, con valores de sensibilidad y especificidad del 100% para la CF y de 90.9% y 100% para la IF, respectivamente.



**Figura 3: Quistes de *Pneumocystis jirovecii*
Tinción Gomori-Grocott en LBA. (100x)**

CONCLUSIÓN

El contar con una buena técnica de identificación para *Pneumocystis jirovecii*, según los recursos humanos, económicos y además respaldada por la literatura, resulta primordial para un diagnóstico confiable. La tinción de Gomori-Grocott, además de contar con buenos parámetros de sensibilidad/especificidad, es una de las tinciones

histológicas más utilizadas para la búsqueda de elementos fúngicos. Por lo tanto, como las muestras a analizar provienen de pacientes inmunodeprimidos, quienes podrían cursar con otra infección micótica concomitante, es una tinción ampliamente recomendada y de nuestra elección como Laboratorio de Micología.

REFERENCIAS

- Aderaye, G.; Woldeamanuel, Y.; Asrat, D.; Lebbad, M.; Beser, J.; Worku, A.; Fernandez, V.; Lindquist, L. (2008) Evaluation of Toluidine Blue O staining for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* in expectorated sputum sample and bronchoalveolar lavage from HIV-infected patients in a tertiary care referral center in Ethiopia. *Infection*.36(3):237-243.
- Aliouat-Denis, C.M et al. (2009) *Pneumocystis* life cycle. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 104(3): 419-426.
- Álvarez, M. (2008). Prevalencia de *Pneumocystis jirovecii* con mutaciones asociadas a resistencia a las sulfamidas en pacientes con infección VIH-1. Estudio de los factores de riesgo y valor pronóstico en la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PcP). Tesis doctoral. Departament d' Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia. Facultat de Medicina. Universitat de Barcelona.
- Armbruster, C.; Hassl, A.; Kriwanek, S.(1998)Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in AIDS-patients. *Wiener Klinische Wochenschrift* .110(17): 604-607.
- Barbosa, J.; Bragada, C.; Costa-de-Oliveira, S. ; Ricardo, E.; Rodrigues, A. & Pina-Vaz, C. (2010) A new method for the detection of *Pneumocystis jirovecii* using flow cytometry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29: 1147-1152.
- Bava, A.; Moreno, D. & Bellergerde, E. (2005). Comparación de 3 técnicas para el diagnóstico de la neumocistosis pulmonar en pacientes con SIDA. *Rev Arg Microbiol* 37: 150-152.
- Benchimol, M. & de Souza, W. (2005) Basic biology of *Pneumocystis carinii* - A Mini Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*. 100(8): 903-908
- Casanova, L.; Cedillo, R.; Garduño, G. & Muñoz, O. (1996) Comparación de dos tinciones en la detección de *Pneumocystis carinii*. *Rev Invest Clin*; 48 (6): 443-447.
- Contini, C.; Villa, M. P.; Romani, R.; Merolla, R.; Delia, S.; Ronchetti, R. (1998)Detection of *Pneumocystis jirovecii* among children with chronic respiratory disorders in the absence of HIV infection and immunodeficiency. *Journal of Medical Microbiology* .47(4): 329-333.
- Djamin, R. S.; Drent, M.; Schreurs, A. J. M.; Groen, E. A. H.; Wagenaar, S. S. (1998)Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-positive patients: bronchoalveolar lavage vs. bronchial brushing. *Acta Cytologica*. 42(4):933-93.

- Esterly J. & Warner N. (1965) *Pneumocystis carinii* pneumonia. Twelve cases in patients with neoplastic lymphoreticular disease. Arch Pathol. 80(5):433-41.
- Flori P, Belleste B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, Lucht F, Sung RT. (2004) Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol. 2004 Jul;53(Pt 7):603-7.
- Fraire, A. E.; Kemp, B.; Greenberg, S. D.; Kim, H. S.; Estrada, R.; McBride, R. (1996) A. Calcofluor white stain for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in transbronchial lung biopsy specimens: a study of 68 cases. Modern Pathology. 9 (8):861-864.
- García del Moral, R. (1993). Laboratorio de Anatomía Patológica. En O'Valle, F. & Gómez-Morales, M. : Métodos para la detección de microorganismos. McGraw-Hill / Interamericana de España, S.A. p. 287-288.
- Jarbouai, M. A.; Sellami, A.; Sellami, H.; Cheikhrouhou, F.; Makni, F.; Arab, N. B.; Jemaa, M. B.; Ayadi, A. (2010) Molecular diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients. Mycoses. 53(4):329-333.
- Kaouech, E.; Kallel, K.; Anane, S.; Belhadj, S.; Abdellatif, S.; Mnif, K.; Othmane, T. B.; Lakhal, S. B.; Kilani, B.; Châabane, T. B.; Chaker, E. (2009) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: comparison between conventional PCR and staining techniques. Pathologie Biologie. 57(5):373-377.
- Khan, M. A.; Nadia Farrag; Butcher, P. (1999) Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: immunofluorescence staining, simple PCR or nPCR. Journal of Infection. 39(1): 77-80.
- Macfarlane J. & Finch R. (1985) *Pneumocystis carinii* pneumonia. Thorax. 40(8):561-70.
- Mahmoodzadeh, A.; Hajia, M.; Rezaieanesh, M. R. (2008) Comparison of Gomori's methenamine silver method with PCR technique on oral swab, bronchoalveolar lavage and lung homogenate specimens in detection of *Pneumocystis*. Iranian Journal of Parasitology. 3(2):21-25.
- Matos, O.; Lundgren, B.; Caldeira, L.; Mansinho, K.; Aguiar, P.; Forte, M.; Antunes, F. (2000) Evaluation of two nested polymerase chain reactions for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients Clinical Microbiology and Infection . 6 (3): 149-152.
- Mishra M, Thakar YS, Akulwar SL, Tankhiwale NS, Powar RM. (2006) Detection of *Pneumocystis jirovecii* in Induced sputum samples of HIV positive patients. Indian J Med Microbiol [serial online] 24:149-50.
- Nassar, A. Zapata, M. Little, J. & Siddiqui, M. (2006) Utility of reflex Gomori methenamine silver staining for *Pneumocystis jirovecii* on bronchoalveolar lavage cytologic specimens: a review. Diagn Cytopathol. 34(11):719-2
- Oosterhout, J. J. G. van; Laufer, M. K.; Perez, M. A.; Graham, S. M.; Chimbiya, N.; Thesing, P. C.; Álvarez-Martinez, M. J.; Wilson, P. E.; Chagomerana, M.; Zijlstra, E. E.; Taylor, T. E.; Plowe, C. V.; Meshnick, S. R. (2007) *Pneumocystis* pneumonia in HIV-positive adults, Malawi. Emerging Infectious Diseases. 13(2):325-328.
- Procop, G.; Haddad, S.; Quinn, J.; Wilson, M.; Henshaw, n.; Reller, L.; Artymyshyn, R.; Katanik, M. & Weinstein, M. (2004) Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimen by four staining methods. J Clin Microbiol. 42(7): 333-3335.
- Raab, S.; Chevillat, J.; Bottles, K. & Cohen, M. (1994) Utility of Gomori methenamine silver stains in bronchoalveolar lavage specimens. Mod Pathol. 7(5):599-604.
- Rafanan, A. L.; Klevjer-Anderson, P.; Metersky, M. L. (1998) *Pneumocystis jirovecii* pneumonia diagnosed by non-induced sputum stained with a direct fluorescent antibody. Annals of Clinical and Laboratory Science. 28(2):99-103.
- Reiss, E.; Shadomy, J. & Lyon, M. (2012) Fundamental Medical Mycology. En Pneumocystosis. p. 349-350
- Rohner, P.; Jacomo, V.; Studer, R.; Schrenzel, J.; Graf, J. D. (2009) Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. Infection. 37(3):261-265.
- Schumann, G. & Swensen, J. (1991). Comparison of Papanicolaou's stain with the Gomori methenamine silver (GMS) stain for the cytodagnosis of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage (BAL) fluid. Am J Clin Pathol. 95(4):583-6.
- Silva, R. M. da; Bazzo, M. L.; Borges, A. (2007) Induced sputum versus bronchoalveolar lavage in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in human immunodeficiency virus-positive patients. Brazilian Journal of Infectious Diseases. 11(6):549-553.
- Stringer J.; Cushion T. & Wakefield, A. (2001) New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. Proceedings of the Seventh International Workshops on Opportunistic Protists. J Eukaryot Microbiol. Suppl:184s-9s
- Stringer, J.; Beard, C.; Miller, R. & Wakefield, A. (2002) A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. Emerg Infect Dis ;8:891-896
- Tong XiaoYing; Ji WeiHua (2002) Study of Wright-Giemsa's Compound Stain for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. Chinese Journal of Parasitic Disease Control. 15 (4):220-221.
- Tuncer, S.; Ergüven, S.; Kocagöz, S.; Ünal, S. (1998) Comparison of cytochemical staining, immunofluorescence and PCR for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* on sputum samples. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 30(2):125-128.
- Tyagi, A. K.; Mirdha, B. R.; Kalpana Luthra; Randeep Guleria; Anant Mohan; Singh, U. B.; Samantaray, J. C.; Lalit

Dar, Iyer, V. K.; Rama Chaudhry (2010) Dihydropteroate synthase (DHPS) gene mutation study in HIV-infected Indian patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Journal of Infection in Developing Countries*. 4 (11): 761-766.

Vanek, J. (1951) Atypical (interstitial) pneumonia in children caused by *Pneumocystis carinii*. *Cas Lek Cesk.* 90(38):1121-4.

Vargas, S. L.; Hughes, W. T.; Santolaya, M. E.; Ulloa, A. V.; Ponce, C. A.; Cabrera, C. E.; Cumsille, F.; Gigliotti, F. (2001) Search for primary infection by *Pneumocystis jirovecii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clinical Infectious Diseases*. 32(6): 855-861.

Wang XueLian; Xua XiaoHong; Lu XiaoBo; An ChunLi (2005) Latent infection of *Pneumocystis jirovecii* in patients with lung cancer. *Chinese Journal of Zoonoses*. 21(5):393-396.

Wissmann, G.; Alvarez-Martinez, M. J.; Meshnick, S. R.; Dihel, A. R. S.; Prolla, J. C. (2006) Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 53 (4):305-307.

Wong, B. (1984) Parasitic diseases in immunocompromised hosts. *Am J Med*. 76(3):479-86.