COLORACIÓN DE GIEMSA Y CULTIVO EN EL DIAGNÓSTICO DE LA HISTOPLASMOSIS

Xiomara Moreno C.[1], Gustavo Martínez[1], Leopoldo Sánchez[2], Carolina Macero[1]

[1]Departamento de Microbiología. Instituto Médico la Floresta. Caracas-República Bolivariana de Venezuela. [2] Cátedra de Salud Pública. Departamento de Medicina Preventiva y Social (MPS). Escuela de Medicina "J. M. Vargas". Universidad Central de Venezuela (UCV). Caracas. República Bolivariana de Venezuela.

Recibido para publicación el 1 diciembre 2015. Aprobado para publicación el 18 diciembre 2015.

RESUMEN:

La coloración de Giemsa (CG) es el clásico examen directo para el diagnóstico presuntivo y precoz de histoplasmosis causada por el *Histoplasma capsulatum (H. capsulatum)*, sin tener que esperar el crecimiento en cultivo. Sin embargo, la CG tiene una baja sensibilidad y en algunos casos no hay crecimiento del hongo en el cultivo. El objetivo de este trabajo fue evaluar la sensibilidad de la CG frente al cultivo de *H. capsulatum*, como un aporte en el diagnóstico micológico de esta infección en el Instituto Médico la Floresta. Se tomaron 28 cultivos, los cuales tenían CG positiva con crecimiento o ausencia del hongo en el cultivo y CG negativa con crecimiento en el cultivo durante el período 2006-2014. Las muestras provenían de médula ósea (17), ganglio (8), sangre (2) y tejido pleural (1). Los aislados fueron clasificados de acuerdo a la enfermedad de base del paciente: VIH (11), Cáncer (10) y no VIH/no Cáncer (7). El intervalo de confianza fue de 95% con una significancia de $p < 0.05$. Se aplicó la prueba exacta de Fischer de dos colas, y cálculo de porcentajes. Se obtuvo un 67.9% (19) de coloraciones positivas y 89.3% (25) de crecimiento en cultivo. El porcentaje de sensibilidad de la CG frente al cultivo fue de 84% y el valor de fue $p > 0,05$. La sensibilidad de la coloración respecto al cultivo en este estudio fue baja, pero no despreciable para el diagnóstico de esta infección. La experiencia del observador aumenta la probabilidad de diagnóstico de la enfermedad. Un CG negativa no confirma que el paciente no tenga la infección.

Palabras claves: Coloración de Giemsa, cultivo, *Histoplasma capsulatum*, VHI, Cáncer.

THE GIEMSA STAIN AND CULTURE IN THE DIAGNOSIS OF HISTOPLASMOSIS

SUMMARY

The Giemsa stain (GS) is the classic direct test for presumptive and early diagnosis of histoplasmosis caused by *Histoplasma capsulatum (H. capsulatum)*, without waiting for culture growth. However, the GS has a low sensitivity and in some cases no fungal growth in culture. The aim of this study was to evaluate the sensibility of the GS versus culture of *H. capsulatum*, as a contribution to mycological diagnosis of this infection in the Floresta Medical Institute. 28 cultures were taken, which had positive GS with growth or absence of fungus in culture and positive or negative GS with growth of fungus in culture in the period 2006-2014. The samples were from bone marrow (17), node (8), blood (2) and pleural tissue (1). The isolates were classified according to the patient's underlying disease: HIV (11), Cancer (10) and no HIV / no cancer (7). The confidence interval was 95% and a significance of $p < 0.05$. Fisher's exact test two-tailed and percentages applied. It was obtained 67.9% (19) of positive stains and 89.3% (25) growth in culture was obtained. The percentage of sensibility of the GS versus culture was 84% and the value was $p > 0.05$. The sensibility of staining in from culture in this study was low, but not negligible for the diagnosis of infection. The observer experience increases the probability of disease diagnosis. A negative GS stain does not confirm that the patient is not infected.

Key words: Giemsa stain , culture, *Histoplasma capsulatum*, HIV, Cáncer.

Introducción

La histoplasmosis es una micosis sistémica granulomatosa y de presencia endémica en las Américas, India, Sur Africa, Oceanía y Europa (1) causada por un hongo dimorfo denominado *Histoplasma capsulatum (H. capsulatum)* (2). Se han descrito tres variedades de especie para este hongo: var. *capsulatum* encontrado en el continente americano, var. *duboisii* confinado en África, que son patógenos en humanos; y var. *farciminosum* patógeno en equinos en África, Oriente Medio y Asia (3). La histoplasmosis se conoce como una infección marcadora de sida, así como en otras enfermedades que puedan tener una alteración en la respuesta celular, también se ha relacionado con diversas actividades laborales o hobbies (4). La enfermedad se adquiere por la inhalación de los propágulos en forma de aerosoles

Solicitar copia a: Xiomara Moreno Calderón (e-mail: x.morenoc@hotmail.com)

presentes en la naturaleza, a los que se exponen un gran número de personas; no se trasmite de persona a persona (2). La principal técnica diagnóstica de esta infección se hace por métodos directos para la visualización del hongo y el aislamiento en cultivo (5). La coloración de Giemsa (CG) es la coloración clásica como método directo para el análisis e interpretación del diagnóstico presuntivo y precoz de *H. capsulatum*, en dicha coloración se observan blastoconidias muy pequeñas de formas redondas u ovoides de manera intracelular y extracelular en los macrófagos; permitiendo en algunos casos hacer un diagnóstico certero sin tener que esperar el crecimiento del cultivo (2). Sin embargo la CG tiene una baja sensibilidad, que puede ir de un 9% a un 43% durante el padecimiento de la enfermedad (4). El cultivo es el *Gold standard*, por lo que es considerado el diagnóstico definitivo, pero tiene una baja sensibilidad en la forma autolimitada de 15%, y de 85% en la forma pulmonar crónica y diseminada. En algunos casos este hongo no se llega a aislar en cultivo (4, 6). El objetivo de esta investigación es evaluar la sensibilidad de la CG negativa y positiva frente al crecimiento o ausencia en cultivo de *H. capsulatum*, provenientes de diferentes muestras clínicas en el Laboratorio de Microbiología del Instituto Médico la Floresta como un aporte al diagnóstico micológico de esta infección.

Materiales y Métodos

Durante el 01 de enero de 2006 hasta el 31 de diciembre de 2014 en el departamento de Microbiología del Instituto Médico la Floresta se procesaron 3579 cultivos para investigación de hongos. Previa revisión y análisis de las boletas con los registros de los pacientes que tuvieron sospecha o diagnóstico clínico de histoplasmosis se encontraron 28 cultivos, los cuales presentaron CG positiva con crecimiento o ausencia del agente causal en el cultivo y CG negativa con crecimiento del agente causal en el cultivo.

La CG es la coloración utilizada para la evaluación y descripción de la población de células sanguíneas en hematología y parásitos intracelulares (7). En micología es el examen básico directo de rutina en los laboratorios de baja y alta complejidad, esta coloración fue utilizada de acuerdo a las recomendaciones del fabricante para observar las estructuras fúngicas de *H. capsulatum* en su fase parasitaria, Figura 1.

Las muestras provenientes de sangre y médula ósea fueron procesadas por la técnica de lisis centrifugación y sistema BACTEC 9240® (botellas Myco/F Lytic®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los tejidos y ganglios fueron cortados finamente y macerados para su posterior siembra; también fueron procesados fluidos orgánicos y secreciones respiratorias. Todas estas muestras al ser recibidas en el laboratorio fueron cultivadas en agar dextrosa Sabouraud con y sin antibiótico (cloranfenicol) y agar mycosel, estas fueron incubados a 25ºC para obtener la fase micelial, Figura 2; también se cultivaron en agar infusión cerebro corazón y agar sangre, los cuales se incubaron a 35ºC para la obtención de la fase levaduriforme, observándose consecutivamente por unas 10 semanas. Secuencialmente se estuvieron observando los cultivos hasta la 10 semana. Los cultivos que presentaron crecimiento del hongo con características macroscópicas de *Histoplasma* se les elaboró un examen directo con azul de cotton, donde se observó microconidios y macroconidios simples y tuberculados e hifas hialinas septadas, Figura 3. Cabe aclarar que el crecimiento del hongo con las características macro y microscópicas descritas permiten identificar el agente causal, y si no crece, hay ausencia del agente fúngico ya que no se describen cultivos positivos o negativos.

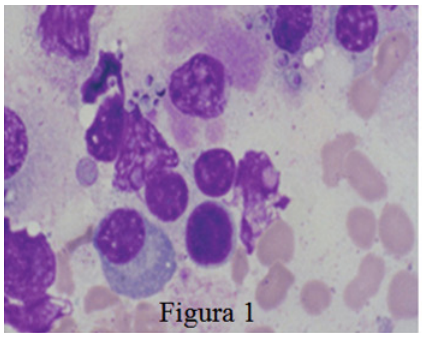


FIGURA 1. Blastoconidias intracelulares y aisladas compatibles con *H.capsulatum* en una coloración de Giemsa provenientes de médula ósea.

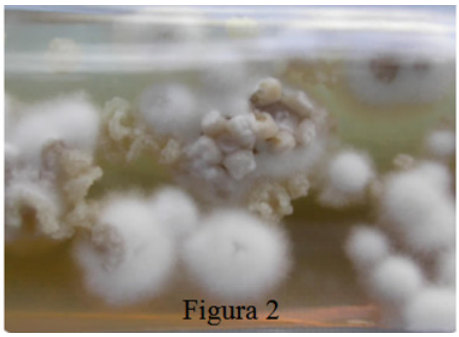


FIGURA 2. Colonias algodonosas y cerebriformes de color blanco y tonalidad marrón claro en medio agar Sabouraud dextrosa a 25°C.

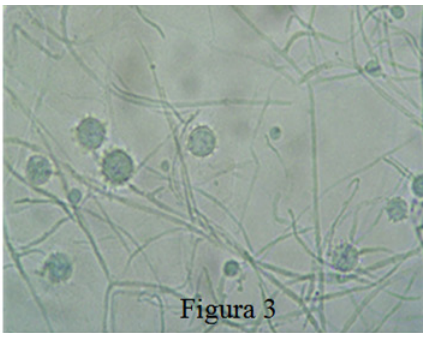


FIGURA 3. Microconidias de pared lisa, macroconidias tuberculadas o hifas hialinas tabicadas de *H. capsulatum* en medio agar Sabouraud dextrosa a 25°C.

En la metodología estadística se aplicó la prueba exacta de Fischer de dos colas y cálculo de porcentajes. Para la significancia estadística del estudio se tomó un nivel de confianza del 95 % y una significancia de $p < 0.05$.

Resultados

Las diferentes muestras analizadas que tuvieron relación con histoplasmosis se observan en la Figura 4. Los pacientes a quienes se les aisló *H. capsulatum* fueron clasificados de acuerdo a la enfermedad de base presente, como se observan en la Figura 5. De 28 coloraciones y cultivos procesados se obtuvieron: 19 (67.9%) coloraciones positivas y 25 (89.3%) cultivos con crecimiento del hongo. Tres pacientes tuvieron CG positiva y no hubo crecimiento en cultivo del hongo. Seis pacientes tuvieron CG negativa y hubo crecimiento del hongo en cultivo, Tabla 1. El porcentaje de sensibilidad de la CG frente al crecimiento en cultivo, fue de 84%. El cultivo para *Histoplasma* tiene un grado de evidencia A-I, siendo el estándar de oro en el diagnóstico de la histoplasmosis (8). No se pudo establecer una relación estadística entre tipos de muestra y enfermedad de base frente a la CG y el cultivo por el escaso número de las mismas, Tabla 1.

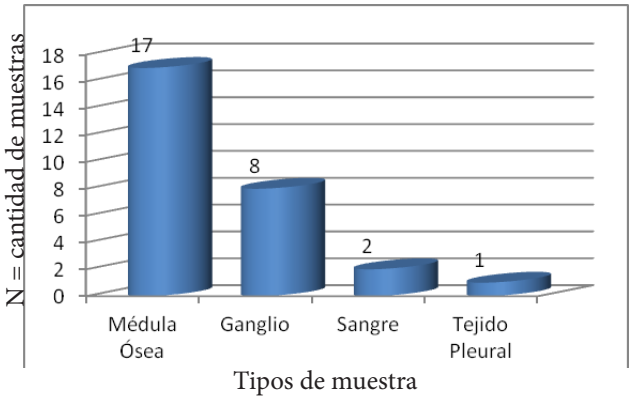


FIGURA 4. Cantidad y tipos de muestra de donde se aisló *H. capsulatum.*

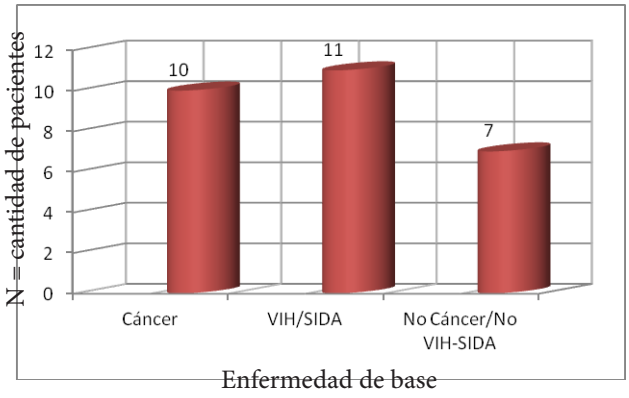


FIGURA 5. Pacientes clasificados de acuerdo a la enfermedad de base.

TABLA 1. A) Número de pacientes de acuerdo a su enfermedad de base, con y sin crecimiento del hongo en estudio. B) Tipos de muestra con CG positiva y negativa. C) Tipos de muestras con cultivo donde hubo crecimiento o ausencia del hongo en estudio.

A) Enfermedad Paciente	Cultivo		TOTAL
	Cult (cch)	Cult(sch)	
Cáncer	10	0	10
VIH-SIDA	11	0	11
No Cáncer/No VIH-SIDA	4	3	7
TOTAL	25	3	28
B) Origen Muestra	**Coloración**		**TOTAL**
	CG +	CG -	
Médula Ósea	11	6	17
Ganglio	6	2	8
Sangre	1	1	2
Tejido Pleural	1	0	1
TOTAL	19	9	28
C) Origen Muestra	**Cultivo**		**TOTAL**
	Cult(cch)	Cult(sch)	
Médula Ósea	16	1	17
Ganglio	6	2	8
Sangre	2	0	2
Tejido Pleural	1	0	1
TOTAL	25	3	28

Cult (cch): cultivo con crecimiento del hongo. Cult (sch): cultivo sin crecimiento o ausencia del hongo. VIH-SIDA: virus de inmunodeficiencia humana-síndrome de inmunodeficiencia adquirida. CG+: coloración de giemsa positiva. CG-: coloración de giemsa negativa.

Discusión y Conclusiones

La gran mayoría de personas que han estado expuestas al hongo *H. capsulatum* no presentan ningún síntoma o solo una enfermedad muy leve que no es diagnosticada como histoplasmosis (1,6). Las manifestaciones clínicas relacionadas con histoplasmosis son: histoplamosis pulmonar, histoplasmosis crónica cavitaria pulmonar, mediastinitis granulomatosa, fibrosis mediastinal e histoplasmosis diseminada, y estas ocurren en un 1%. La infección por histoplasmosis va a estar asociada al estado inmune del hospedero, relacionándose con pacientes con SIDA, trasplantados de órganos sólidos, neoplasias malignas hematológicas, inmunosupresión por corticoesteroides, entre otros (6). El SIDA ha ayudado a instaurar el espectro de la enfermedad diseminada, pacientes con recuentos de CD4 <150 células/µl se encuentran en mayor riesgo de padecerla por lo que es una enfermedad definitoria de SIDA, a la vez sigue siendo una infección oportunista importante (1). Los casos más graves actualmente son las histoplasmosis severas en pacientes que reciben antagonistas del

factor de necrosis tumoral. La deficiencia del receptor de interferon gamma se ha descrito como un factor de riesgo refractario para histoplasmosis diseminada recurrente, también han sido asociadas a histoplasmosis diseminada el síndrome de hiperinmunoglobulemia M y deficiencias de inmunoglobulinas (6,9). La infección en estos pacientes viene dada en meses y si no es tratada las consecuencias son fatales, en contraste con la forma aguda fatal que se produce en los lactantes e inmunocomprometidos de otro tipo (6).

El diagnóstico de histoplasmosis en el laboratorio esta dado por la utilización de la CG y la técnica del cultivo como paso inicial; existen otras técnicas en coloraciones, detección de antígenos y anticuerpos, biología molecular entre otros, pero no son el objetivo de esta investigación. La observación microscópica de la CG como una técnica de coloración directa nos permite detectar en grupos o en solitario blastoconidias esféricas u ovoides con una sola gemación o aisladas y un diámetro que puede ir de 1 a 4 µm; con una pared que no se tiñe muy bien, un núcleo que se colorea de violeta oscuro y el citoplasma en azulado tenue, casi incoloro, semejante a una cápsula en el interior de los macrófagos o de células gigantes en menor proporción (2, 3,5).

En el presente estudio 19 de 28 CG, se observó microscópicamente levaduras compatibles con H. capsulatum lo que representa un 67.9% del hallazgo global, no se pudo discriminar la variantes de las manifestaciones clínicas reportadas por la literatura internacional donde en la enfermedad autolimitada la sensibilidad es del 9%, en la pulmonar crónica va del 17-40% y en la enfermedad diseminada es de un 43% aproximadamente (4), debido a que no se disponía de datos clínicos y epidemiológicos completos en el momento de la recepción de la muestra en el laboratorio.

La observación de este tipo de blastoconidias intracelulares en cualquier tipo de muestra con las características antes descritas son muy sugestivas y compatibles con *H. capsulatum*; sin embargo existen algunas blastoconidias pequeñas de *Cryptococcus neoformans* que presentan una cápsula pobre, blastoconidias de *Candida glabrata*, conidias de *Penicillium marneffei,* quistes de *Pneumocystis jirovecci* y amastigotas de *Leishmaniasis* spp. (6,10), que pueden confundirse y dar un diagnóstico incorrecto, por lo que la experiencia del observador es indispensable ya que aumenta la probabilidad del diagnóstico de la enfermedad. Una CG negativa no confirma que el paciente no tenga la infección por este tipo de hongo y que no vaya a crecer en el cultivo. De ahí la importancia de no utilizar la CG como única herramienta diagnóstica.

En cuanto al cultivo, es el método *Gold Standard*, y es quien da el diagnóstico definitivo de la histoplasmosis (6). La identificación del hongo se realiza con base en las características macro y microscópicas de las colonias crecidas en los medios antes mencionados, donde la utilidad del antibiótico es inhibir el crecimiento bacteriano y la cicloheximida inhibe el crecimiento de hongos saprofíticos contaminantes (10). La incubación de los medios descritos a 28-30ºC se obtiene la fase micelial, mientras que incubados a 37ºC en agar sangre o infusión cerebro corazón se obtiene la fase levaduriforme, este es un proceso gradual que se consigue haciendo pases consecutivos, aunque no siempre se obtiene esta conversión (4).

La sensibilidad del cultivo en la fase autolimitada de la enfermedad es de un 15%, en la pulmonar crónica y la diseminada es de un 85% (4,11), en el presente estudio se obtuvo un 89.3% en forma global debido a la ausencia de datos epidemiológicos referidos anteriormente. En este estudio, 25 de 28 cultivos hubo crecimiento de *H. capsulatum* en su fase micelial y en 18 (72%) de los 25 se obtuvo la fase levaduriforme. Cuando se realizó el examen directo de colonias crecidas a las 3 semanas de incubación se observó microconidios de pared lisa, esta característica se puede confundir con microconidios del complejo *Scedosporium* por lo que se sugiere incubar por más tiempo para conseguir una mayor esporulación (12). También hay que considerar que la observación de macroconidios tuberculados puede ser similar a los observados en los géneros *Sepedonium* y *Chrysosporium* (6) por lo que se debería tratar de conseguir el crecimiento de las dos fases: micelial y levaduriforme para poder dar un diagnóstico certero, sin olvidar la importancia que tiene la observación de las estructuras fúngicas coloreadas con Giemsa en muchos casos con el examen directo de la muestra clínica. Muchos investigadores recomiendan observar el cultivo hasta 12 semanas, otros recomiendan observar por 4 semanas sobre todo en zonas endémicas (9,13), por lo que se debería estandarizar en cada laboratorio el tiempo del cultivo de acuerdo al lugar geográfico, tipos de pacientes relacionados con su enfermedad de base y tratamiento para obtener un resultado confiable.

En tres cultivos no hubo crecimiento de *H. capsulatum*, pero las CG estaban positivas; dos de ellos pertenecían a pacientes cuyo diagnóstico fue hecho hace 6 y 8 meses respectivamente en otro centro de salud y que

estaban en tratamiento, mientras que el otro cultivo negativo pertenecía a un paciente inmunocompetente que había visitado la cueva del indio (hábitat natural de *H. capsulatum* en Caracas-Venezuela), el cual no fue tratado debido a que sus manifestaciones clínicas y radiológicas no pasaron de ser una neumonía controlable, representando en este estudio un 10,7% de la enfermedad autolimitada, resultado menor pero no despreciable con lo reportado por Fernández et al., en su revisión en cuanto a la clasificación de la enfermedad respecto al cultivo.

El aislamiento de *H. capsulatum* también es posible a partir de muestras provenientes del torrente sanguíneo de pacientes con infección crónica y diseminada, utilizando el sistema de lisis-centrifugación que incluye los tubos Isolator, el cual es más eficaz que los medios convencionales; de igual manera han diseñado equipos automatizados como BACTEC 9240®, que utiliza frascos de hemocultivo Myco/F Lytic® específicos para la recuperación de patógenos intracelulares además de levaduras, hongos filamentosos, micobacterias, entre otros (2,3,10). En las 19 muestras provenientes tanto de médula ósea como de sangre en este estudio se utilizaron las dos metodologías, resaltando la importancia de estas técnicas en la recuperación del hongo.

En esta investigación se procesaron 966 muestras provenientes del tracto respiratorio inferior (esputo, secreción traqueal, lavado bronquial y lavado broncoalveolar) pero no fue posible recuperar *H. capsulatum*, debido a que no se usó ningún agente mucolítico y la mayoría de los cultivos les creció flora asociada o contaminante. Debido a esto Peman et al., recomiendan el uso de algún mucolítico como N-acetil-L-cisteina (NALC) en muestras muy viscosas antes de la siembra, con volúmenes iguales de muestra, dejando actuar a temperatura ambiente por unos 10 minutos o hasta que se consiga la fluidificación de la muestra antes de la siembra . Esta metodología se debería implementar de rutina para todas las muestras respiratorias exceptuando los lavados broncoalveolares los cuales vienen diluidos, salvo los muco-sanguinolentos (14). Smith et al. (15), recomiendan la utilización de hidróxido de amonio (NH4OH) cubriendo el medio selectivo para aumentar el pH, el cual va disminuir el crecimiento de hongos comensales y permitir el crecimiento lento de *H. capsulatum*. Esta técnica es muy útil en aquellos pacientes con histoplasmosis pulmonar cavitaria crónica y pulmonar aguda, después de la exposición a un gran inoculo del hongo.

En la presente investigación se observó que el porcentaje de sensibilidad de la coloración es bajo (84%), respecto al cultivo, pero no despreciable para el diagnóstico de esta infección, resultado que se correlaciona con los reportados por la literatura internacional (4,6). No hubo significancia estadística entre CG y el cultivo ($p > 0,05$), debido a que los resultados se presentaron de forma independiente y al azar.

La histoplasmosis es y seguirá siendo una micosis sistémica de gran impacto clínico y social en los pacientes con un compromiso inmunológico. Los métodos convencionales como la CG y el cultivo son las principales herramientas de diagnóstico en un laboratorio microbiológico de rutina y de mayor complejidad. El cultivo nunca será reemplazado por otro tipo de diagnóstico, pues es quien pone en evidencia al microorganismo. No todos los laboratorios tiene accesibilidad a pruebas inmunoserólogicas, serológicas y moleculares por lo que se hace indispensable utilizar la CG y el cultivo como métodos diagnósticos de histoplasmosis. Cabe destacar que la experiencia del observador aumenta la probabilidad de diagnostico de la enfermedad con una CG. Un CG negativa no confirma que el paciente no esté relacionado con la enfermedad, por lo que la CG debe ir de la mano con el cultivo microbiológico para poder aportar un diagnóstico veraz y confiable.

Referencias

1. Bahr N, Antinori S, Wheat L, Sarosi G. Histoplasmosis Infections Worldwide: Thinking Outside of the Ohio River Valley. Curr Trop Med Rep 2015;2:70-80.
2. Bonifaz A. Micología Médica Básica.México D.F: Interamericana McGraw; 2010. p. 279-293.
3. Quindós Guillermo. Micología clínica. Elsevier. Barcelona-España 2015.
4. Fernández CC, Illnait MT, Martínez G, Perurena MR, Monroy E. Una actualización acerca de histoplasmosis. Rev Cub Med Trop 2011;63(3):189-205.
5. Muñoz C, Cano LE, González A. Detección e identificación de Histoplasma capsulatum por el laboratorio: de los métodos convencionales a las pruebas moleculares. Infecto 2010; 14(S2):S145-S158.
6. Kauffman C A. Histoplasmosis: a clinical and Laboratory update. Clin Microbiol Rev 2007;20:115-132.
7. Bava AJ, Zuiani MF. Comparación de las coloraciones de Giemsa y Grocott en el diagnóstico de la histoplasmosis.

Acta Bioquim Clin Latinoam 2007;41:395-398.

8. Ayats J, Martín-Mazuelos E, Pemán J, Quindós G, Sánchez F, García-Rodríguez J, Guarro J, Guinea J, et al. Recomendaciones sobre el diagnóstico de la enfermedad fúngica invasora de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2010. Grupo de Estudio de Micología Médica de la SEIMC (GEMICOMED). Actualización 2010. Enferm Infecc Microbiol Clin 2011; 29(1):39.e1–39.e15.
9. Crum NF, Lederman ER, and Wallace MR. 2005. Infections associated with tumor necrosis factor-alpha antagonists. Medicine (Baltimore) 2005;84(5):291–302.
10. Guimaraes AJ, Nosanchuck JD, Zancopé-Oliveira RM. Diagnosis of histoplasmosis. Braz J Microbiol 2006;37(1):1-13.
11. Wheat LJ, Freifeld AG, Kleiman MB, Bladdley JN, McKinsey DS, Loyd JE, et al. Clinical practice guidelines for the management of patients with histoplasmosis: 2007 update by de Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis 2007;45(7):807-825.
12. De Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ. Atlas digital of Clinical Fungi, 2nd ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht Universitat Rovira i Virgili, Reus;2002.
13. Ferreira MS, Borges AS. Histoplasmosis. Rev Soc Bras Med Trop 2009;42(2):192-198.
14. Sánchez F. Procesamiento de las muestras del tracto respiratorio inferior (Capítulo 5). En: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio MC, editores. Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. 1era ed. España: Rev Iberoam Micol 2001;5.1-5.12.
15. Smith CD, and Goodman NL. Improved culture method for the isolation of Histoplasma capsulatum and Blastomyces dermatitidis from contaminated specimens. Am J Clin Pathol 1975;63:276–280.