

Evaluación de la microscopía en fresco en el diagnóstico de neumocistosis pulmonar

Microscopic examination in fresh mount preparation for the diagnosis of pulmonary pneumocystosis

Avaliação da microscopia a fresco no diagnóstico de pneumocistose pulmonar

► Claudia Daniela Vaustat^{1a}, Amadeo Javier Bava^{2b}

¹ Bioquímica

² Doctor en Medicina

^a Residencia de Microbiología. Hospital de Enfermedades Infecciosas "Francisco Javier Muñiz", Buenos Aires, Argentina

^b Cátedra de Micología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata - UNLP, Buenos Aires, Argentina

Resumen

Para evaluar la utilidad de la microscopia en fresco en el diagnóstico de la neumocistosis pulmonar (PCP), se aplicó una técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos monoclonales a 50 secreciones respiratorias obtenidas por lavado broncoalveolar y procesadas en forma consecutiva en el Laboratorio de Parasitología, entre el 19 de enero y el 25 de febrero de 2011. Las mismas pertenecían a pacientes con SIDA y diagnóstico presuntivo de PCP, y en todas ellas la investigación de la presencia de exudados espumosos por microscopia en fresco fue negativa. Ninguna de las muestras procesadas resultó positiva para *Pneumocystis jiroveci* con la IFD. En base a los resultados obtenidos se concluyó que la microscopia en fresco permanece como un método rápido, económico, sencillo y seguro para el diagnóstico de la PCP en los pacientes con SIDA internados en diferentes Salas del Hospital Muñiz. Al igual que en un estudio previo, reveló poseer una sensibilidad similar a la IFD en los pacientes evaluados.

Palabras clave: microscopia en fresco * inmunofluorescencia directa * neumocistosis * *Pneumocystis jiroveci*

Summary

To evaluate the usefulness of fresh microscopy for the diagnosis of pulmonary pneumocystosis (PCP), direct immunofluorescence (DIF) with monoclonal antibodies technique was applied to 50 respiratory secretions obtained by bronchoalveolar lavage and consecutively processed in the Laboratory of Parasitology from January 19, 2011 to February 25, 2011. The samples belonged to AIDS patients with presumptive diagnosis of PCP, and all of them were negative for the search of foamy exudates by wet mount

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

microscopy. No positive results were obtained for *Pneumocystis jiroveci* with the DIF. According to the results obtained, it was concluded that fresh microscopy remains being a rapid, economic, simple and accurate method for the diagnosis of PCP in AIDS patients assisted in different Wards of the Muñiz Hospital. As in a previous study, performed in a similar cohort of patients, fresh microscopy revealed a sensitivity similar to that of DIF when applied to the diagnosis of PCP.

Keywords: fresh microscopy * direct immunofluorescence * Pneumocystosis * *Pneumocystis jiroveci*

Resumo

Para avaliar a utilidade da microscopia a fresco no diagnóstico da pneumocistose pulmonar (PCP), foi aplicada uma técnica de imunofluorescência direta (IFD) com anticorpos monoclonais em 50 secreções respiratórias obtidas por lavagem broncoalveolar e processadas de forma consecutiva no Laboratório de Parasitologia, entre os dias 19 de janeiro de 2011 e 25 de fevereiro de 2011. As mesmas pertenciam a pacientes com AIDS e diagnóstico presuntivo de PCP, e em todas elas a pesquisa da presença de esfregãos espumosos por microscopia a fresco foi negativa. Nenhuma das amostras processadas resultou positiva para *Pneumocystis jiroveci* com a IFD. Com base nos resultados obtidos foi concluído que a microscopia a fresco permanece como um método rápido, econômico, simples e seguro para o diagnóstico da PCP nos pacientes com AIDS internados em diferentes Salas do Hospital Muñiz. Do mesmo modo que num estudo prévio, revelou possuir uma sensibilidade similar à IFD nos pacientes avaliados.

Palavras chave: microscopia a fresco * imunofluorescência direta * pneumocistose * *Pneumocystis jiroveci*

Introducción

La neumocistosis pulmonar (PCP) es una de las infecciones oportunistas más frecuentes entre los pacientes con SIDA y otros inmunocomprometidos graves (1). La falta de desarrollo de su agente causal, *Pneumocystis jiroveci*, en los medios habitualmente empleados en el laboratorio de diagnóstico, obliga a emplear la microscopia como método de diagnóstico (2).

La presencia de exudados esponjosos de origen alveolar (Figura 1), observables mediante la microscopia en fresco, se asocia a la existencia de PCP (3), mientras que diversas técnicas de tinción ofrecen posibilidades de diagnóstico con variable sensibilidad y especificidad (4).

La inmunofluorescencia directa (IFD) con anticuerpos monoclonales, pone en evidencia la presencia tanto de trofozoitos como de quistes de *P. jiroveci*, lo que aumenta su sensibilidad con respecto a las anteriores (5).

El propósito de este estudio fue evaluar el valor de la microscopia en fresco en el diagnóstico de la PCP, y comparar sus resultados con los de la inmunofluorescencia directa, aplicadas ambas a secreciones respiratorias obtenidas por lavado broncoalveolar de pacientes con SIDA y patología pulmonar compatible con PCP.

Materiales y Métodos

Se evaluaron los resultados obtenidos con la aplicación de la inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales a 50 muestras de secreciones respiratorias,

que resultaron negativas para la búsqueda de exudados espumosos por microscopia en fresco.

Las muestras fueron obtenidas por lavado broncoalveolar (LBA) en la Unidad Endoscopia del Hospital Muñiz y pertenecían a pacientes VIH positivos con presunción diagnóstica de PCP, en el periodo comprendido entre el 19 de enero y el 25 de febrero de 2011.

Los LBAs fueron remitidos al Laboratorio de Parasitología del Hospital Muñiz en cantidad aproximada a los 10 mL, contenidos en tubos cónicos de plástico con tapa a rosca, estériles. Se centrifugaron a 1.500 rpm durante 15 min y con el sedimento se realizaron preparaciones para la microscopia en fresco e IFD, estas últimas en portaob-

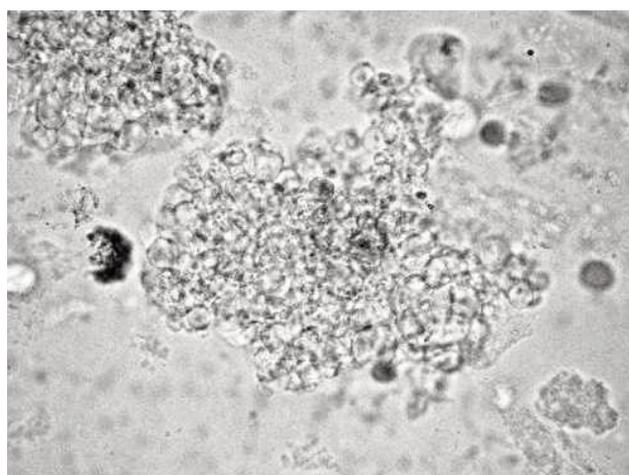


Figura 1. Exudado espumoso presente en el concentrado de un lavado broncoalveolar, observado por microscopia en fresco (400x).

jetos proporcionados por el fabricante del equipo. Aquellos materiales que resultaron positivos por la presencia de exudados espumosos fueron excluidos del estudio.

La técnica de IFD se realizó con el equipo LIGHT DIAGNOSTICS™ PCP Antibody Reagent, 50 tests (Millipore - EEUU). El portaobjeto con la muestra se fijó con metanol, se cubrió con el reactivo de detección (anticuerpos monoclonales anti - *Pneumocystis* marcados con isotiocianato de fluoresceína) y se incubó en cámara húmeda durante 30 min a 37 °C. Se lavó luego con agua destilada, se secó al aire y se observó en un microscopio de epifluorescencia (Alphaphot modelo 2 YS2H, Nikon, Japón) con una longitud de onda de 490-500 nm y un filtro de barrera de 510-530 nm. En todos los casos fueron empleados controles positivos, que correspondieron a muestras de LBAs en los cuales se identificaron quistes de *P. jiroveci* por la aplicación de una modificación rápida de la técnica de Grocott (6).

Resultados

Se resumen en Tabla I y no revelan diferencias entre aquellos obtenidos por la aplicación de ambas técnicas, en la totalidad de las muestras.

Discusión y Conclusiones

Si bien el diagnóstico de la PCP en el laboratorio requiere de métodos simples, la obtención de las muestras necesita de preferencia de un procedimiento invasor (LBA), el cual no siempre puede ser aplicado al paciente. Las muestras alternativas, como el esputo inducido(8) o expectorado, presentan una sensibilidad menor, motivo por el cual se emplean en condiciones particulares (7).

En el laboratorio, la observación de exudados espumosos en la microscopia en fresco o bien la aplicación de diferentes técnicas de coloración a preparaciones fijadas, permiten visualizar uno de los estadios evolutivos de su agente causal: trofozoitos o quistes (4). La IFD aventaja a las tinciones, ya que permite observar tanto unos como otros, lo cual eleva su sensibilidad.

Los resultados obtenidos en el presente estudio coinciden con las conclusiones obtenidas en investigaciones previas (9) (10), ya que no se presentaron falsos negativos en ninguno de los LBAs procesados, respecto de la microscopia en fresco.

Si bien esta última técnica, aplicada a las secreciones respiratorias de pacientes con SIDA (poseedores de altas cargas de patógenos), resulta una técnica sencilla, efectiva y económica para el diagnóstico de la PCP, requiere de un entrenamiento previo del observador. La confusión de los exudados espumosos con artefactos presentes en las muestras puede llevar a resultados falso positivos, sobre todo cuando no se dispone de técnicas alternativas de diagnóstico (3).

Por otro lado, a pesar de sus ventajas, la IFD requiere de la compra de un equipo comercial y de un microscopio de fluorescencia, que no siempre están disponibles en laboratorios de baja complejidad. Sin embargo, su elevada sensibilidad la transforma en una herramienta importante al aplicarla en individuos con bajos grados de inmunodepresión, en los cuales la carga de *P. jiroveci* puede ser mucho menor.

Se concluye que la microscopia en fresco constituye un método rápido, económico, sencillo y seguro para el diagnóstico de la PCP en los pacientes con SIDA internados en el Hospital Muñiz. Al igual que en un estudio previo, se obtuvieron resultados similares a los de la IFD en los pacientes evaluados. La confirmación de los casos positivos mediante una modificación rápida de la técnica de Grocott confiere mayor especificidad al hallazgo de los exudados espumosos en la microscopia en fresco (7).

CORRESPONDENCIA

VAUSTAT, CLAUDIA DANIELA
E-mail: danielavau@hotmail.com

Referencias bibliográficas

- Phair J, Muñoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A. The rise of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS cohort study group. *New Engl J Med* 1990; 322: 161-5.

Tabla I. Resultados de la aplicación de la IFD en 50 LBAs negativos para la búsqueda de exudados espumosos con microscopia en fresco, para el diagnóstico de la PCP. Pacientes con SIDA y diagnóstico presuntivo de PCP internados en el Hospital Muñiz (2011)

	Elementos observados	Resultado negativo	Resultado positivo	% de especificidad
Examen en fresco	Exudados espumosos	50	0	100
IFD	Quistes y trofozoitos	50	0	100

2. Bava AJ. El diagnóstico de certeza de la neumocistosis pulmonar (PCP). Boletín de noticias PEEC. Fundación Bioquímica Argentina. Mayo 2002: 1-2.
3. Bava AJ, Castro Zorrilla L, Troncoso D. Empleo de la microscopía en fresco en el diagnóstico de la neumocistosis. Rev Argent Infect 1997; 10: 12-5.
4. Hadley WK, Ng V. *Pneumocystis*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, ed. Manual of Clinical Microbiology. 6 ed. Washington: ASM Press; 1995. p. 738-48.
5. Homer KS, Wiley EL, Smith AL, McCollough L, Clark D, Nightingale SD *et al*. Monoclonal antibody to *Pneumocystis carinii*: comparison with silver stain in bronchial lavage specimens. Am J Clin Pathol 1992; 97: 619-24.
6. Bava AJ. Coloración rápida para la identificación de quistes de *Pneumocystis carinii* en materiales respiratorios. Acta Bioquím Clín Latinoam 2003; 37: 189-92.
7. Joos L, Chhajed N, Wallner J, Battegay M, Steiger J, Gratwohl A, *et al*. Pulmonary infections diagnosed by BAL: A 12-year experience in 1066 immunocompromised patients. Resp Med 2007; 101: 93-7.
8. La Rocque RC, Katz JT, Perruzzi P, Badén LR. The utility of sputum induction for diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* immunocompromised patients without human immunodeficiency virus. Clin Infect Dis 2003; 37: 1380-3.
9. Bava AJ, Moreno D, Bellegarde E. Comparación de 3 técnicas para el diagnóstico de la neumocistosis pulmonar en pacientes con SIDA. Rev Argent Microbiol 2005; 37: 3: 150-2.
10. Bava AJ, Cattáneo S, Bellegarde E. Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wet mount preparations. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2002; 44: 279-82.

Aceptado para su publicación el 12 de julio de 2011