

Departamento de Anatomía Patológica  
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"



Cysts

# DETECCIÓN DE *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* EN LAVADOS BRONCOALVEOLARES DE PACIENTES VIH/SIDA

TRABAJO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO ACADÉMICO DE  
MÁSTER EN BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA

**Autora: Lic. Ledy X. López Fuentes**

La Habana  
2013

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA.**

**DETECCIÓN DE *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*  
EN LAVADOS BRONCOALVEOLARES DE  
PACIENTES VIH/SIDA**

**Trabajo de Tesis presentado en opción al título de  
MÁSTER EN BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**

**AUTORA: LIC. LEDY X. LÓPEZ FUENTES**

**LA HABANA**

**2013**

**INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL “PEDRO KOURÍ”  
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA**

**DETECCIÓN DE *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* EN  
LAVADOS BRONCOALVEOLARES DE  
PACIENTES VIH/SIDA.**

**Trabajo de Tesis presentado en opción al título de  
MÁSTER EN BACTERIOLOGÍA-MICOLOGÍA**

**AUTORA: LIC. LEDY X. LÓPEZ FUENTES**

**Tutores: Lic. Yaxsier de Armas Rodríguez, Dr.C  
Dra. Virginia Capó de Paz, Dr.C**

**Asesores: Dr. Gerardo Martínez Machín  
Dr. Enrique José Calderón Sandubete, Dr.C**

**LA HABANA**

**2013**

*DEDICATORIA*

***A MI ADORABLE HIJA,  
FUENTE DE INSPIRACIÓN Y AMOR.***

## *AGRADECIMIENTOS*

## **Agradecimientos**

Son muchos a los que agradecer, desde que comencé este largo camino.

Un especial agradecimiento a mi tutor, Dr.C Yaxsier de Armas, por su ayuda desinteresada e incondicional, por su sensibilidad humana y por su apoyo infinito, ya que sin él nada de esto hubiese sido posible. Gracias a la Dra.C Virginia Capo, por ser ejemplo de dedicación y consagración, gracias por la ayuda en mi formación profesional durante todos estos años.

Al Dr. Gerardo Martínez, gracias por sus aportes y el tiempo empleado.

A Idael, contigo el camino ha sido difícil, pero sin ti; hubiera sido imposible.

A Anamays, por su apoyo en todo momento como amiga incondicional. Siempre estuvo ahí, presente en todo momento.

A mis amigos, compañeros y profesores todos, por sus enseñanzas en estos años y por el día a día.

A mis abuelos, por sus enseñanzas diarias de la vida porque aunque no estén entre nosotros para mí siempre estarán presentes.

Mi gratitud para mis compañeros del laboratorio de Anatomía Patológica por su apoyo en la realización de este trabajo: Anita, Marielvys, Jenny y Víctor.

Mis agradecimientos para Lianet y Ernesto por su apoyo.

A mis compañeros de la Subdirección de Atención Médica.

A todos los que de una forma u otra hicieron posible la realización de este trabajo.

Muchas gracias.

*RESUMEN*

## RESUMEN

Neumocistosis es el nombre de la enfermedad causada por *Pneumocystis jirovecii* considerada la manifestación inicial más común de sida en los pacientes inmunodeprimidos. En Cuba, existe poca información sobre el conocimiento del microorganismo, así como de la enfermedad que produce. En este trabajo, se realizó un estudio de corte transversal con la finalidad de detectar *P. jirovecii* en muestras de lavado broncoalveolar de pacientes VIH/sida. Se compararon tres grupos de técnicas diagnósticas: tinción, inmunofluorescencia y moleculares. Las técnicas de tinción (Giemsa y azul de toluidina) mostraron resultados negativos al microorganismo en la totalidad de las muestras examinadas mientras que por inmunofluorescencia, directa e indirecta, se obtuvieron resultados variables 40 y 24%, respectivamente. Por otra parte, la técnica de la PCR simple del gen mt LSU ARNr identificó una prevalencia de PcP de 16%, mientras que la PCR anidada determinó 28% de colonización por *P. jirovecii*. La secuenciación nucleotídica del gen mt LSU ARNr demostró un ligero predominio del genotipo 2 y la dihidropteroato sintetasa ausencia de mutaciones puntuales asociadas a la resistencia al cotrimoxazol. Este trabajo pretende brindar datos importantes para el empleo de las técnicas diagnóstico en los diferentes niveles del sistema de salud cubano, así como generar estrategias para el control de la PcP en Cuba.

*ABREVIATURAS*

## ABREVIATURAS

### A

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico

### B

B3: Solución amortiguadora de lisis.

B5: Solución amortiguadora de lavado.

$\beta$ -tubulina: beta tubulina.

BW: Solución amortiguadora de lavado (siglas en inglés).

BW5: Solución amortiguadora de lavado tipo 5 (siglas en inglés)

### C

C: Citosina.

CDC: Centro para la Prevención y el Control de las enfermedades (siglas en inglés).

CTX: Cotrimoxazol

### D

DHFR: Dihidrofolato reductasa (siglas en inglés).

DHPS: Dihidropteroato sintetasa (siglas en inglés).

DNT: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

### E

EB: Tampón de elusión

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

EE.UU.: Estados Unidos de América.

### F

FQ: Fibrosis quística.

FFPE: Tejido fijado en formol y embebido en parafina

### G

GMS: Coloración de plata metenamina de Gomori

### H

HE: Coloración de hematoxilina y eosina.

### I

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

IFD: Inmunofluorescencia directa

IFI: Inmunofluorescencia indirecta

ITS: Espaciador interno de transcripción del ARN ribosómico (siglas en inglés).

## **K**

kDa: Peso molecular de las proteínas, expresado en kilo Dalton ( $10^3$  Dalton ).

## **L**

LBA: lavados broncoalveolares.

## **M**

MSG: Glicoproteína mayor de superficie (siglas en inglés).

MLA: análisis multilocus (siglas en inglés)

mt LSU rRNA: Subunidad mayor del ARN ribosómico mitocondrial (siglas en inglés).

mt SSU rRNA: Subunidad menor del ARN ribosómico mitocondrial (siglas en inglés).

## **P**

PcP: Neumonía causada por *Pneumocystis jirovecii*.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés).

PE: Tampón de lavado

PB: Tampón mezcla

## **R**

RAPD: amplificación al azar del ADN polimórfico (siglas en inglés).

REA: endonucleasas de restricción (siglas en inglés)

RFLP: Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (siglas en inglés).

pb: Número de bases que componen un fragmento de gen.

## **S**

SMX: Sulfametoxazol.

SOD: Superóxido dismutasa (por sus siglas en inglés)

## **T**

T CD4+: Linfocitos T CD4+

T1: Tampón de reacción lisis.

TA: Temperatura ambiente.

TARGA: Terapia antirretroviral de gran actividad.

TMP: Trimetoprim

## **V**

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.

## **W**

wild type: Genotipo salvaje (término en inglés)

*ÍNDICE*

## ÍNDICE

RESUMEN	
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
Objetivos.....	5
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>7</b>
II.1. Historia del microorganismo.....	8
II.2. Taxonomía.....	10
II.3. Ciclo de vida.....	10
II.4. Prevalencia e incidencia de la enfermedad.....	11
II.5. <i>Pneumocystis jirovecii</i> en Cuba.....	12
II.6. Colonización por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	13
II.7. Reservorio.....	13
II.8. Transmisión.....	14
II.9. Manifestaciones clínicas.....	14
II.10. Tratamiento y profilaxis.....	15
II.11. Método de diagnóstico por microscopía óptica.....	16
II.11.2. Examen de observación directa al microscopio.....	16
II.11.3. Métodos de tinción.....	16
II.11.4. Métodos de Inmunofluorescencia.....	17
II.11.5. Caracterización Molecular.....	18
II.12. Genes estudiados en <i>P. jirovecii</i> .....	19
II.13. Métodos de tipificación molecular.....	20
<b>III MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
III.1. Diseño del estudio.....	23
III.2. Muestra.....	23
III.3. Método de observación directa al microscopio.....	24
III.4. Métodos de tinción.....	24
III.5. Métodos de Inmunofluorescencia.....	24
III.6. Extracción de ADN.....	24
III.7. Iniciadores.....	25

III.8. Reacción en cadena de la polimerasa para el mt LSU rRNA.....	26
III.9. Reacción en cadena de la polimerasa para la DHPS.....	27
III.10. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del gen de la DHPS.....	27
III.11. Reacción en cadena de la polimerasa para el gen de la $\beta$ actina.....	28
III.12. Detección de los productos amplificados por PCR.....	38
III.13. Purificación del Producto de PCR.....	29
III.14. Reacción de secuenciación.....	29
III.15. Secuenciación.....	29
III.16. Métodos empleados para analizar y comparar secuencias.....	30
III.17. Análisis estadístico.....	30
III.18. Aspectos éticos.....	30
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>48</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>50</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
Anexos	

## *INTRODUCCIÓN*

## I.Introducción

Neumocistosis es el nombre de la enfermedad causada por *Pneumocystis jirovecii* (conocido anteriormente como *Pneumocystis carinii*) se considera la enfermedad más común en los pacientes con sida e inmunodeprimidos. Aún, en estos tiempos de terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) y quimioprofilaxis, se le reconoce como uno de los principales patógenos que ocasionan mortalidad entre la población VIH/sida (Calderón *et al.*, 2013).

*P. jirovecii* es un hongo atípico, extracelular, ubicuo y unicelular. Usualmente se encuentra restringido a los pulmones, aunque se demuestra su presencia en otras regiones del cuerpo. En la actualidad se registran casos de neumonía por *Pneumocystis* (PcP, siglas en inglés) en todos los continentes del mundo. Este microorganismo no se ha podido cultivar de ninguna muestra clínica, lo que dificulta el estudio de susceptibilidad a las drogas y el conocimiento sobre la epidemiología de la enfermedad que produce, así como su biología (Calderón *et al.*, 2011).

Ante la imposibilidad de su cultivo microbiológico, la regla de oro para su diagnóstico es la demostración de cualquiera de sus formas de estadio de vida por técnicas tintoriales microscópicas e inmunofluorescencia en muestras clínicas. Las técnicas microscópicas a pesar de ser sencillas y rápidas carecen de sensibilidad y dependen en gran medida de la selección correcta de las muestras analizadas, así como de las habilidades del diagnosticador (Calderón *et al.*, 2010). Otras técnicas se emplean para detectar la presencia del microorganismo en diferentes muestras clínicas (lavados broncoalveolares (LBA), esputos inducidos y espontáneos, exudados y lavados orales y nasofaríngeos, biopsias y tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (FFEP)). Una de ellas, el empleo de anticuerpos monoclonales, se utiliza para aumentar la sensibilidad y especificidad de detección de este patógeno (Calderón *et al.*, 2010). Por otra parte, los métodos moleculares basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, siglas en inglés) han revolucionado el diagnóstico de *P. jirovecii*, pues con poca cantidad de material genético se logra brindar resultados rápidos y confiables, superiores a los obtenidos por las técnicas convencionales (Calderón *et al.*, 2011). Dentro de los genes más ampliamente estudiados del patógeno, se encuentra el loci que codifica para la subunidad mayor del ARN ribosómico de la mitocondria (mt LSU rRNA, siglas en inglés). El mismo posee múltiples copias en el genoma del patógeno y

es una diana atractiva para la identificación del microorganismo, así como para los estudios de epidemiología molecular (de Armas *et al.*, 2012a). El gen que codifica para la dihidropteroato sintetasa (DHPS, siglas en inglés) es otro de los genes utilizados para identificar y caracterizar este microorganismo. La DHPS es una enzima clave en la ruta metabólica de la síntesis del folato del patógeno. Varios autores asocian mutaciones puntuales en las posiciones 55 y 57 del gen de la DHPS con la posible resistencia al cotrimoxazol, fármaco de elección para tratar la PcP (De Armas *et al.*, 2012a; Calderón *et al.*, 2011; Matos y Esteves, 2010b).

La identificación de *P. jirovecii* por métodos moleculares como la PCR permite demostrar la presencia de este patógeno en diferentes muestras biológicas de individuos sin manifestaciones clínicas ni radiológicas de PcP. Este fenómeno se conoce como colonización y ha revolucionado la epidemiología de *Pneumocystis* pues estas personas pueden actuar como reservorio del microorganismo y transmitirlo a otros individuos susceptibles. La colonización por *P. jirovecii* es frecuente en pacientes con infección por el VIH, con prevalencia desde 46% hasta 68%. En estos individuos se identifican factores de riesgos como son los niveles de  $CD4^+ < 50 \text{ cel/mm}^3$ , la ausencia de quimioprofilaxis con cotrimoxazol, el tabaquismo y la ciudad de residencia (Calderón *et al.*, 2011).

Por otra parte, los LBA son muestras excelentes para diagnosticar *P. jirovecii* en pacientes VIH/sida, pues contienen suficiente carga del microorganismo (cuando existe infección) en el hábitat natural y específico del patógeno. Varios trabajos avalan esta afirmación, por lo que resulta interesante desarrollar técnicas moleculares que utilicen como material de partida los LBA (Summah *et al.*, 2013; Orsi *et al.*, 2012; McTaggart *et al.*, 2012).

Es importante mencionar que en Cuba *P. jirovecii* es el principal agente infeccioso que define sida en los pacientes VIH positivos. En las instituciones de salud del país no se cuenta con un método de diagnóstico sensible y específico para detectar el microorganismo en muestras clínicas de estos pacientes. Por esta razón, el diagnóstico de la PcP se realiza en el país mediante examen clínico y radiológico, lo cual conlleva a errores frecuentes (De Armas *et al.*, 2013; Calderón *et al.*, 2011). Por otra parte, no se dispone de información que refleje la utilidad de las técnicas convencionales, inmunofluorescencia y moleculares en los LBA, ni tampoco la población que se

encuentra colonizada por el microorganismo. Finalmente, se desconoce la distribución de genotipos de *P. jirovecii* y el estado de la resistencia a las sulfamidas en pacientes con infección por el VIH. Las razones anteriormente explicadas son la justificación para desarrollar el presente estudio.

## *OBJETIVOS*

**Objetivo General:**

Detectar *Pneumocystis jirovecii* en lavados broncoalveolares de pacientes VIH/sida.

**Objetivos Específicos:**

- (1) Comparar métodos de tinción, de inmunofluorescencia y moleculares para la detección de *P. jirovecii* en lavados broncoalveolares de pacientes VIH/sida.
- (2) Determinar la prevalencia de infección y colonización por *P. jirovecci* en muestras de lavados broncoalveolares de pacientes VIH/sida.
- (3) Caracterizar genóticamente muestras de *P. jirovecii* procedentes de lavados broncoalveolares, mediante el empleo del gen subunidad mayor del ARNr mitocondrial y el gen de la dihidropteorato sintetasa.
- (4) Identificar las mutaciones puntuales en el gen de la dihidropteorato sintetasa de *P. jirovecci* en los casos con PcP.

## *REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA*

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### II.1. Historia del microorganismo

El término *Pneumocystis* fue originalmente creado en 1912, (Delanöe y Delanöe, 1912) pero la historia de este microorganismo comienza antes, cuando se observa por primera vez en 1909 por Carlos Chagas (1879-1934) (Chagas, 1909). Sin embargo, Chagas interpreta de modo erróneo que los quistes del patógeno eran parte del ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Un año después, Antonio Carini (1872-1950) hizo una descripción similar de quistes en el pulmón de ratas infectadas con *Trypanosoma lewisi* (Carini, 1910). No obstante, no conforme con las evidencias observadas, envió muestras histológicas a Charles Louis Alphonse Laveran, uno de los parasitólogos de mayor prestigio mundial en la época, para que examinara dichas preparaciones (Calderón *et al.*, 2011; Delanöe y Delanöe, 1912).

El matrimonio Delanöe, observaron quistes similares en los pulmones de ratas que no estaban infestadas por *Trypanosoma*. De esta forma, en 1912 pudieron aclarar que los peculiares quistes observados por Chagas y Carini correspondían a un nuevo género y especie desconocidos sin relación con los tripanosomas, al que decidieron denominar *Pneumocystis carinii*. *Pneumo-* por su tropismo por el pulmón; *-cystis* por su morfología característica, y *carinii* en honor del Dr. Antonio Carini que les había facilitado las muestras histológicas (Calderón *et al.*, 2011).

Después de esta nueva clasificación, tanto Carini como Chagas se retractan de sus descripciones originales y aportan datos que sustentan la investigación del matrimonio francés. Por otra parte, Chagas modifica su descripción inicial del ciclo vital de *Trypanosoma cruzi*. Los pocos estudios que continuaron a estas descripciones estaban orientados a conocer la distribución de *Pneumocystis* en el reino animal. Su presencia en una gran variedad de mamíferos (ratas, cobayos, monos y conejos en Brasil, ratas y ratones en Gran Bretaña y ratones en Suiza) sin evidencia de enfermedad, hizo cuestionar su patogenicidad (Porter, 1915). Esto conllevó a una disminución del interés científico por este microorganismo y a considerarlo como una curiosidad biológica, lo que llevo consigo un gran silencio en los años venideros con escasas de publicaciones médicas (Calderón *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2002).

En 1938 Ammich y Benecke reconocen una forma de neumonía de origen desconocido que afectaba típicamente a niños prematuros o malnutridos, a la cual denominaron neumonía intersticial de células plasmáticas. Durante la Segunda Guerra Mundial esta infección adquirió proporciones epidémicas que marcarían los años posteriores en Europa Central. Sin embargo, no relacionaron al patógeno con dicha infección (Ammich, 1938; Benecke, 1938). Por otra parte, dos científicos holandeses, van der Meer y Brug demuestran por primera vez una asociación histológica entre la neumonía intersticial de células plasmáticas y *Pneumocystis*, aunque su descubrimiento pasó casi inadvertido. Diez años después, tres investigadores checos, Vaněk, Jírovec y Lukes hallaron la etiología de esta forma de neumonía, por lo que se consideran con frecuencia como los primeros descubridores del microorganismo (Calderón *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2002).

En 1974, Peter Walzer recopila datos de 194 casos confirmados de neumocistosis. Esta investigación demostró que la malnutrición es un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad y la misma se presentaba no solo en los niños, sino también en los pacientes con leucemias, linfomas, tumores sólidos y con trasplantes, lo que abrió las puertas a la investigación en esos grupos poblacionales (Walzer *et al.*, 1974). Dos años después, Frenkel demuestra que existen diferencias inmunológicas entre los sueros de ratas y humanos infectados por *Pneumocystis*. Esta hipótesis plantea que a pesar de no poseer diferencias morfológicas distinguibles entre estas especies de *Pneumocystis* eran diferentes (Frenkel, 1976). El nuevo nombre propuesto para la especie que infecta al hombre sería *Pneumocystis jirovecii* en honor al científico checo Otto Jirovec, el cual en 1951 relacionara el patógeno con la neumonía que aparecía en los niños prematuros y malnutridos (Calderón *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2002).

Sandra Ford, auxiliar de farmacia del centro para la prevención y el control de las enfermedades (CDC, siglas en inglés) de EE.UU. nota un incremento inusual de las peticiones de pentamidina para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis* que le llegaban desde Nueva York y constata que no correspondían a sujetos con causas conocidas de inmunodepresión. Este hallazgo constituye la primera evidencia de la eclosión de la epidemia de sida y muestra como un patógeno oportunista descubre los primeros casos de sida (Calderón *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2002).

Actualmente se reconoce a *Pneumocystis* como uno de los principales patógenos oportunistas que afectan tanto a pacientes infectados por el VIH como a sujetos que presentan cualquier otra causa de inmunosupresión (Calderón *et al.*, 2013).

## **II.2. Taxonomía**

La clasificación taxonómica de *Pneumocystis* es problemática desde su descubrimiento, con grandes discusiones y polémicas. Ha cambiado a largo de los años, tras su identificación inicial como un protozoo capaz de infectar a un gran número de animales. Tres detalles fundamentales avalaban esta errónea clasificación: las características morfológicas, su resistencia a los antifúngicos clásicos y su respuesta al tratamiento con pentamidina. Sin embargo, estudios ultraestructurales planteaban su relación con el reino Fungi (Calderón *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2002).

La primera evidencia molecular de que *Pneumocystis* es un hongo fue aportada por Edman y colaboradores en 1988, quienes encontraron que la secuencia nucleotídica del gen 16 S del ARN ribosomal del microorganismo presenta mayor homología con su similar en los hongos que con la de los protozoos (Edman *et al.*, 1988). Además, otros genes importantes como la subunidad mayor del ARN ribosómico mitocondrial y otros siete genes mitocondriales contiguos muestran una significativa similitud con sus respectivos genes en los hongos. Su ubicación taxonómica actual es en el Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Clase: Pneumocystidomycetes, Orden: Pneumocystidales y Familia: *Pneumocystidaceae* (Calderón *et al.*, 2011).

## **II.3. Ciclo de vida**

El ciclo de vida de *Pneumocystis* se revisó recientemente (Aliouat-Denis *et al.*, 2009), la ausencia de proliferación de este hongo atípico en medios de cultivos tradicionales impide esclarecer detalles importantes de su biología. Se describen tres formas morfológicas interrelacionadas en su ciclo de vida: las tróficas, las esporocíticas y los quistes maduros (Figura 1). Cada una de ellas difiere en cuanto a tamaño, diámetro de la pared celular, así como en la filopodia (proyecciones citoplasmática). También existen diferencias como la forma del estadio, las cuales varían desde irregular en la forma trófica, hasta ovoide en el resto de las formas morfológicas. Se considera que las formas tróficas son el estadio más abundante en el ciclo de vida del organismo, que representa de 90 a 95% de la población de *Pneumocystis* en el pulmón del paciente infectado. La formación del complejo sinaptonémico en el núcleo de esporocitos tempranos, sugiere

división mitótica del ciclo sexual. Con las evidencias actuales, se plantea tanto la forma asexual como sexual como modo de multiplicación del patógeno (Calderón *et al.*, 2011; Matsumoto y Yoshida, 1984).

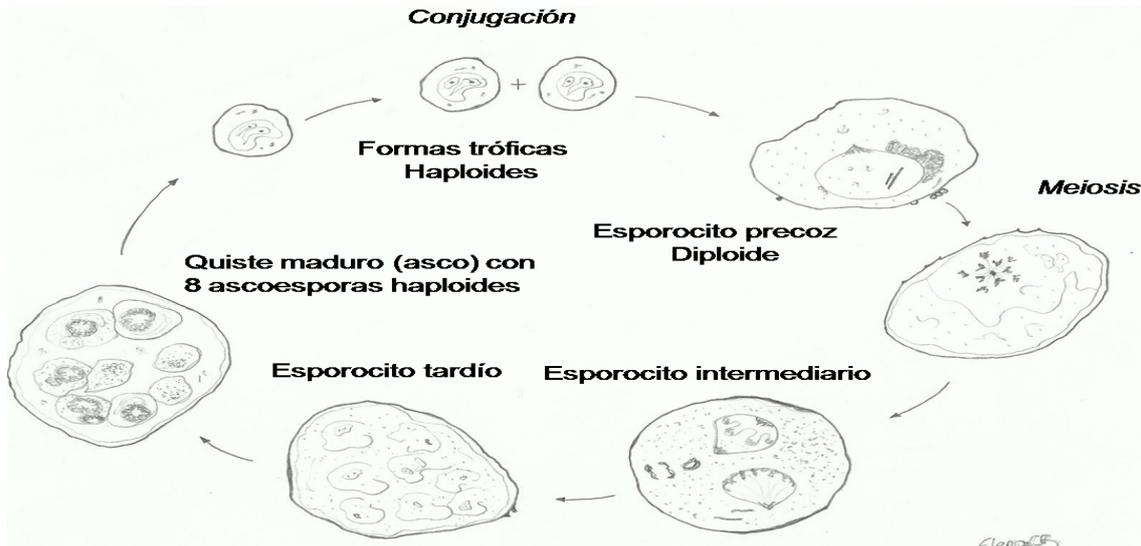


Figura 1. Ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii* (Tomado del artículo: Calderón Sandubete E, de Armas Rodríguez Y, Capó de Paz V. *Pneumocystis jirovecii*: cien años de historia. Rev Cub Med Trop. 2011;63(2):97-116) .

#### II.4. Prevalencia e incidencia de la enfermedad

Hasta los años 80 del siglo pasado, la PcP no era frecuente y se asociaba con síndromes de inmunodeficiencias o situaciones de intensa inmunosupresión, particularmente con la quimioterapia del cáncer. Sin embargo, con la pandemia del VIH emergió como la enfermedad más común definitoria de sida en los países industrializados. Se estima que hasta 60% de los pacientes con sida eran identificados por presentarla y 80% de los pacientes con niveles de linfocitos T CD4<sup>+</sup> menores que 200 células/mm<sup>3</sup> podían desarrollar esta enfermedad (Calderón *et al.*, 2013; Helweg-Larsen, 2004).

En la era de la terapia antirretroviral existió una franca disminución de muchas infecciones oportunistas y entre ellas la PcP. Los casos de la enfermedad disminuyeron 3,2% por año desde 1992 hasta 1995 con la utilización de quimioprofilaxis, y después

con la introducción de la TARGA. La tasa continuó en descenso con valores de 21,5% por año desde 1996 hasta 1998 (Morris *et al.*, 2004). En la actualidad, la PcP presenta una incidencia de 9,5 episodios por 100 personas al año en pacientes infectados por el VIH y se observa en más de 50% de los pacientes con sida (Calderón *et al.*, 2013).

Actualmente, la PcP está en franco aumento en sujetos inmunodeprimidos no infectados con el VIH, como pacientes con cáncer, hemopatías malignas, afecciones inflamatorias crónicas para las cuales se utiliza tratamiento con fármacos inmunodepresores y receptores de trasplante de cualquier tipo. La incidencia de la enfermedad entre estos grupos de pacientes puede alcanzar hasta 40%, con 50% de mortalidad (De Armas *et al.*, 2013).

A pesar de los escasos trabajos publicados, la literatura consultada reconoce que la PcP es una enfermedad creciente en los países en vías de desarrollado. En algunos de ellos se considera esta infección como un serio problema de salud, con importantes implicaciones para su futuro control. Se estima, que para el 2025 la situación de la enfermedad en estos países, en los cuales el VIH sigue en ascenso, adquiera proporciones preocupantes (Calderón *et al.*, 2013).

## **II.5. *Pneumocystis jirovecii* en Cuba**

En Cuba pocos estudios abordan esta problemática, hasta la actualidad existen solo cinco artículos científicos publicados. El primer caso de PcP en el país se describe en 1969 por Rodríguez-Vigil (Rodríguez-Vigil, 1969). Años después, Razón y colaboradores describieron la infección en siete niños malnutridos, lo que facilitó el primer acercamiento a la clínica y la epidemiología de la enfermedad (Razón-Behar *et al.*, 1977). Por su parte, Menéndez-Capote y Millán-Marcelo calcularon una tasa de 45% de PcP entre 40 pacientes VIH/sida ingresados en el Hospital del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK) entre julio de 1988 a julio de 1989 (Menéndez-Capote y Millán-Marcelo, 1992). Sin embargo, estos resultados se basaron solo en los síntomas clínicos y patrones radiológicos de los pacientes. Seis años después, Arteaga y sus colegas mediante el empleo de técnicas de tinción, identifican 32% de *P. jirovecii* en FFEP de 211 fallecidos por sida. Este estudio se desarrolló en casos con intensa

inmunodepresión, cuyas necropsias se realizaron en el IPK en el periodo de 1986-1998 (Arteaga *et al.*, 1998). Hernández-Puentes y colaboradores describieron un caso fatal de infección por *P. jirovecii* en una mujer con asma bronquial (Hernández-Puentes *et al.*, 2010). Recientemente, de Armas y otros analizaron 514 necropsias de individuos con sida en un periodo de 14 años (1995-2008) para determinar la distribución de genotipos del patógeno en los fallecidos. Esta serie de casos constituye la más completa de la que se tiene referencia en el país para el estudio de la PcP (de Armas *et al.*, 2012).

## **II.6. Colonización por *Pneumocystis jirovecii***

En muestras biológicas de individuos sin manifestaciones clínicas ni radiológicas de neumonía, se identifica ácido desoxirribonucleico (ADN, siglas en inglés) de *P. jirovecii* mediante métodos sensibles como la PCR; ese fenómeno se conoce como colonización (Morris, 2012). Aunque no está esclarecida la importancia biológica de este estado, se describe que las personas colonizadas actúan como reservorio y pueden transmitir el patógeno a otros individuos susceptibles. Diferentes prevalencias 46,0-68,0% se describen en población general y en pacientes seropositivos al VIH colonizados por *P. jirovecii* (de Armas *et al.*, 2013; Vargas *et al.*, 2011).

Otro grupo importante de pacientes colonizados son aquellos con enfermedad pulmonar crónica, entre los que la prevalencia de colonización oscila desde 21,5% en los pacientes con fibrosis quística (FQ) hasta 40,5% en los casos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales, este fenómeno se observa en 33,8%; que varía entre 19,8% descrito en la sarcoidosis y 37,8% observado en la neumopatía intersticial idiopática. Además, 10% de los niños sanos y 15% de aquellos con síntomas respiratorios pueden estar colonizados por el patógeno (Wissmann *et al.*, 2010). Un mejor conocimiento de la epidemiología de la PcP resulta esencial para poder trazar estrategias correctas, para la prevención de la enfermedad en las poblaciones de riesgo donde este patógeno actúa.

## **II.7. Reservorio**

El ADN de *Pneumocystis* se detecta en aguas de charcas y en el aire circundante en huertos; incluso en muestras obtenidas en habitaciones de pacientes con PcP, lo cual sugiere su capacidad infectiva. Sin embargo, ningún reservorio ambiental se encuentra hasta ahora, aunque no puede excluirse esta posibilidad (Calderón *et al.*, 2011)

El estudio comparativo del material genético de *Pneumocystis* de diferentes mamíferos, demuestra que se trata de especies distintas. Trabajos experimentales realizados con modelos de animales evidencian la imposibilidad de que se produzcan infecciones cruzadas entre especies. Esto demuestra que la PcP en el hombre es una antroponosis, donde el único reservorio es el propio ser humano (Wissmann *et al.*, 2010).

## **II.8. Transmisión**

El modo exacto de transmisión de un individuo a otro no ha sido del todo esclarecido y la forma infectiva del parásito aún no se identifica; en el caso de *Pneumocystis* se propone un modelo de transmisión similar al que se describe para *Mycobacterium tuberculosis*. Se plantea la vía aérea como vehículo, ya que las formas tróficas del parásito, con un tamaño de 2 a 4  $\mu\text{m}$ , son similares al bacilo tuberculoso (1-3  $\mu\text{m}$ ), las cuales pueden ser expectoradas por el paciente infectado y mediante gotitas de Pflugge son inhaladas por los sujetos susceptibles (Ng *et al.*, 1997). Sin embargo, publicaciones recientes demuestran que los quistes desempeñan un papel protagónico en la transmisión (Cushion, 2010). Varios autores consideran que la transmisión directa entre individuos por vía aérea constituye la forma de transmisión más importante de esta infección (Damiani *et al.*, 2012; Choukri *et al.*, 2010; Cushion, 2010).

La transmisión vertical transplacentaria de *Pneumocystis* se demuestra en conejos, pero no parece ocurrir en ratas y ratones con inmunodeficiencia severa. En 2009, se constata la primera evidencia molecular de la existencia de transmisión transplacentaria en humanos, lo cual abre las puertas a un nuevo campo de investigación en *Pneumocystis* con implicaciones en la clínica y en la epidemiología del microorganismo (Montes-Cano *et al.*, 2009).

## **II.9. Manifestaciones clínicas**

La PcP se presenta casi siempre con fiebre, tos y disnea de esfuerzo. La tos normalmente es seca y no productiva. La disnea al inicio es al esfuerzo moderado, por lo que puede pasar inadvertida y progresar de modo gradual. La fatiga es una de las principales quejas en los pacientes con infección, mientras que el dolor torácico, los escalofríos y la sudoración nocturna son menos frecuentes. La hemoptisis también se ha registrado en los pacientes aquejados por esta infección, pero en menor proporción. Por otra parte, en la exploración clínica puede detectar taquicardia, cianosis, y crepitantes

finos en la auscultación de los afectados (Roembke *et al.*, 2013; Sarkar *et al.*, 2013; Calderón *et al.*, 2011).

La presentación clínica de la PcP difiere en sus características entre individuos con infección VIH de aquellos inmucomprometidos por otras razones (Calderón *et al.*, 2011). De manera general, los pacientes con infección por VIH presentan un desarrollo subagudo con síntomas más prolongados de la infección; típicamente incluyen el establecimiento de tos seca y disnea con fiebre o sin esta, de 1 a 2 semanas de evolución. Al examen físico puede apreciarse taquipnea, taquicardia y, en ocasiones cianosis; pero la auscultación torácica en general es normal, con presencia a veces de algunos sibilantes (De Castro *et al.*, 2012; Sarkar *et al.*, 2013).

En cambio, en pacientes sin infección por VIH, la enfermedad tiene un comienzo más rápido con pocos días de desarrollo clínico y mayor gravedad, caracterizada frecuentemente con una marcada hipoxemia (Tasaka *et al.*, 2012). En los individuos trasplantados, la infección se presenta a menudo con un cuadro clínico fulminante consistente en fiebre, tos, disnea e insuficiencia respiratoria. Por otra parte, en individuos con trasplantes cardíaco-pulmonares los síntomas pueden estar ausentes debido a la denervación del pulmón trasplantado. Se señala además que sujetos con inmunodepresión secundaria al tratamiento de enfermedades neoplásicas o trasplantes, la enfermedad tiene una presentación subaguda, de más de 24 h y menos de una semana. En el caso de pacientes con trasplantes de órganos sólidos la PcP puede ocurrir también con un desarrollo crónico (Tasaka *et al.*, 2010).

## **II.10. Tratamiento y profilaxis**

La asociación de trimetoprim (TMP) y sulfametoxazol (SMX) se denomina cotrimoxazol (CTX), el cual constituye el fármaco de elección tanto para el tratamiento como para la profilaxis de la PcP en pacientes con y sin infección por VIH (Calderón *et al.*, 2013). Sin embargo, las reacciones adversas son frecuentes, sobre todo en pacientes con infección VIH, y pueden obligar a cambios en el tratamiento o a emplear esquema de desensibilización. Por otra parte, se detectan mutaciones en el gen de la DHPS homólogas de las que en otros microorganismos inducen resistencia a este grupo de fármacos. En *P. jirovecii* estas mutaciones están aparentemente asociadas al uso previo

de sulfamidas y podrían indicar también la presencia de fenotipos del patógeno resistentes a las mismas (de Armas *et al.*, 2012b). Existen alternativas al CTX para el tratamiento y la profilaxis de la PcP, que incluyen la dapsona, la pentamidina y la atovacuona entre otras, pero la información disponible sobre su eficacia es más limitada. Recientemente en un número reducido de pacientes con PcP se describe la efectividad de la caspofungina (Porollo *et al.*, 2012).

### **II.11. Método de diagnóstico por microscopia óptica**

Ante la ausencia de un sistema de cultivo *in vitro* para *P. jirovecii*, la base para el diagnóstico de la PcP es la visualización de los diferentes estadios del ciclo de vida de este patógeno en las muestras respiratorias obtenidas de los pacientes (Calderón *et al.*, 2011). Para el diagnóstico microscópico de *P. jirovecii* las muestras clínicas más empleadas son los lavados broncoalveolares (LBA), el esputo espontáneo o inducido y la biopsia pulmonar transbronquial. Recientemente, se comienzan a estudiar otras muestras biológicas como lavados orofaríngeos, exudados nasales o aspirados nasofaríngeos que aún no se utilizan de forma rutinaria en la clínica para evitar técnicas invasivas como las necesarias para obtener LBA o biopsias (Calderón *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2010).

#### **II.11. 1. Examen de observación directa al microscopio**

Técnica descrita por Bava y colaboradores en el 2002. Su fundamento versa en la observación de estructuras en forma de "panal de abeja" en muestras de LBA de pacientes con sospecha clínica de PcP. Esta metodología es importante para los laboratorios de países en vías de desarrollo, pues es menos costosa que el resto de las tinciones empleadas (Bava *et al.*, 2002). Un estudio interesante desarrollado por estos propios autores utilizando el examen de observación directa al microscopio detectaron 35% de pacientes con *P. jirovecii* (Bava *et al.*, 2002).

#### **II.11.2. Métodos de tinción**

Se describen en la literatura varios métodos de visualización microscópica para identificar *Pneumocystis*. Para biopsias y autopsias resultan de mucha utilidad las técnicas de tinción convencionales (hematoxilina y eosina), así como las especiales (Plata metenenamina de Gomori (GMS, siglas en inglés), giemsa, azul de toluidina O, Papanicolaou, violeta crisol y blanco de calcoflúor) para todo tipo de muestra clínica

(Calderón *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2010). La GMS tiñe de color oscuro la pared de los quistes de *Pneumocystis* y permite la cuantificación del patógeno en la muestra. También, el azul de toluidina y el violeta crisol muestran afinidad por los componentes de la pared del quiste. Con este último método, se han obtenido buenos resultados en estudios con animales, sin embargo, para estudios con humanos su utilización está poco extendida. El azul de toluidina por su parte, colorea de violeta rojizo los componentes de la pared y los investigadores lo emplean como técnica de tamizaje. La Giemsa permite identificar tanto los quistes como los trofozoitos, colorea los núcleos de ambas formas de color rosado y contrasta con el azul que adquiere el citoplasma (Calderón *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2010). La tinción de Papanicolaou es una técnica muy empleada por los citohistopatólogos, que puede generar información importante para detectar *Pneumocystis*. Sun y colaboradores demuestran la efectividad del método al detectar 8 muestras positivas entre 13 casos confirmados de la enfermedad. No obstante, debe prestarse especial atención cuando esta metodología es utilizada en muestras donde la carga parasitaria es baja, porque genera falsos positivos por la baja sensibilidad de la técnica. Por otra parte, este método no tiñe específicamente al microorganismo, sino las masas de moco espumoso que envuelve a las agrupaciones de *Pneumocystis* (Sun *et al.*, 1986).

### **II.11.3. Métodos de inmunofluorescencia**

Esta técnica utiliza anticuerpos monoclonales específicos contra determinantes antigénicos de la pared de los quistes y trofozoitos de *P. jirovecii*. Tiene una sensibilidad cercana a 100% y una especificidad alrededor de 96%. Los anticuerpos monoclonales tienen mayor sensibilidad y especificidad en las muestras de esputo inducido que las técnicas de tinción convencionales, pero esta diferencia es mucho menor cuando se emplean muestras de LBA. Los resultados obtenidos con esta técnica dependen del tipo de muestra que se utiliza en cada caso (Calderón *et al.*, 2011).

Hay que señalar que la inmunofluorescencia es más cara y consume más tiempo para brindar un resultado que las técnicas de tinción convencionales. Además, pueden existir reacciones cruzadas de antígenos de *Pneumocystis* con antígenos de *Aspergillus* sp. y publicaciones recientes constatan un alto porcentaje de falsos positivos con esta metodología (Calderón *et al.*, 2011; Procop *et al.*, 2004). Por otra parte, resulta prudente revisar, sobre todo en regiones donde *Paracoccidioides brasiliensis* es endémica, un

resultado positivo para *P. jirovecii* por esta técnica porque se han encontrado casos de reacciones cruzadas (Calderón *et al.*, 2011; Silletti *et al.*, 1996). De especial interés resulta el hecho de la detección de quistes vacíos por esta técnica, los cuales pueden persistir en el tejido pulmonar por espacio de 4 a 6 semanas después de un tratamiento efectivo. Finalmente, esta técnica se emplea en la detección de *P. jirovecii* en personas inmunocompetentes con infecciones pulmonares crónicas, con menor sensibilidad que las técnicas moleculares (Calderón *et al.*, 2011).

Por otra parte, el blanco de calcoflúor es una tinción fluorescente, rápida y útil en cualquier tipo de muestras. Esta técnica contrasta los elementos micóticos con gran claridad, debido a la unión de esta sustancia a la quitina de la pared fúngica. Además, requiere menor entrenamiento para el diagnóstico de PcP que el examen directo en fresco, sin embargo, tiene falsos positivos con fibras vegetales, colágeno o elastina (Calderón *et al.*, 2011).

#### **II.11.4. Caracterización Molecular**

Los estudios moleculares, tales como la PCR, la secuenciación del ADN y el análisis de los fragmentos de restricción tienen un importante impacto en el conocimiento de la biología de las diferentes especies de *Pneumocystis*, así como en la epidemiología de la PcP en los humanos (Matos y Esteves, 2010a). Los constantes avances en esta área de investigación demostraron que los organismos conocidos como *Pneumocystis* no solo son una especie de protozoo, sino un género de hongo compuesto por diferentes especies, las cuales están estrechamente adaptadas a sus diversos hospederos mamíferos. Además, identificaron que *P. jirovecii* afecta específicamente a humanos y que no hay infecciones cruzadas con otros mamíferos (Calderón *et al.*, 2011). De la misma manera, estas investigaciones evidenciaron que el hombre es el único reservorio del patógeno y que la colonización por el mismo es transitoria durante el transcurso de su vida (Wissmann *et al.*, 2010; de Armas *et al.*, 2013). Por otra parte, los métodos moleculares aportan evidencias de que la transmisión del patógeno es de persona a persona y evidencian que la resistencia a la sulfamida aparece como un proceso emergente y que se debe tener en consideración (Choukri *et al.*, 2010; Matos y Esteves, 2010b).

## II.12. Genes estudiados en *P. jirovecii*

Hasta ahora se han estudiado aproximadamente 16 genes de *Pneumocystis* con diferentes objetivos, entre los que se destacan: diagnóstico, estudios de patrones de transmisión, severidad de la infección, fracaso del tratamiento, profilaxis en los pacientes con PcP y determinación del estado de colonización (Maitte *et al.*, 2013).

El primer gen que se identifica y se evalúa para uso diagnóstico es el mt LSU ARNr. También se utiliza para analizar los casos de episodios recurrentes de infección por el microorganismo y para documentar la transmisión persona-persona y vertical (de Armas *et al.*, 2012; Matos y Esteves, 2010a; Montes-Cano *et al.*, 2009). Por otra parte, el gen mt LSU ARNr se emplea para la evaluación de la latencia y reactivación frente a la transmisión reciente y en la investigación de individuos colonizados (Damiani *et al.*, 2013; Wakefield *et al.*, 2003). De la misma manera, gracias a dicha metodología, se demuestra la presencia de *Pneumocystis* en muestras clínicas como LBA, esputos inducidos, enjuagues orales, aspirados traqueales y nasofaríngeos y biopsias de tejido; en exteriores rurales como huertos y aguas estancadas, así como en el polvo de las casas, habitaciones y vestíbulos de hospitales (Calderón *et al.*, 2011; Wakefield, 2002). Este gen está presente en varias copias en el genoma del microorganismo, es estable en el tiempo y se describen seis genotipos (variantes polimórficas) en dicha secuencia (Calderón *et al.*, 2011). Por esta razón, se considera el gen mt LSU ARNr una diana atractiva para estudios de epidemiología molecular en diferentes regiones geográficas del mundo (Esteves *et al.*, 2010).

Otro de los genes mitocondriales estudiado es el que codifica para la subunidad menor del ARN ribosómico de la mitocondria (mt SSU rRNA, siglas en inglés), el cual se utiliza en la clasificación de las diferentes especies de *Pneumocystis* que afectan al resto de los hospederos mamíferos y en el análisis multilocus de poblaciones con VIH/sida (de Armas *et al.*, 2012a). El gen de la citocromo b mitocondrial, es otra diana mitocondrial empleada en estudios moleculares. La proteína codificada por este gen es clave en el sistema de transporte electrónico y sitio de acción de la atovacuona, droga de segunda línea en la profilaxis y tratamiento de la PcP. Las mutaciones encontradas en este gen se asocian con la exposición previa a dicho fármaco en los pacientes con sida, lo que sugiere una posible emergencia de resistencia a la atovacuona (Maitte *et al.*, 2013).

Los genes nucleares (ITS1 e ITS2, espaciador interno de transcripción del ARN ribosómico) son los que presentan el mayor polimorfismo genético. Hasta el momento, se han descrito 21 genotipos del ITS1 y 29 del ITS2. Estos genes son de utilidad diagnóstica y de aplicabilidad en estudios de epidemiología molecular, incluyendo análisis de agrupamiento, transmisión persona-persona, las recaídas a los tratamientos, los estudios filogenéticos y la severidad de la infección (Helweg-Larsen, 2004; Wakefield *et al.*, 2003).

Entre los genes que codifican dianas específicas de fármacos, dos son los más estudiados, fundamentalmente debido a su implicación en la resistencia a las drogas anti-*Pneumocystis*. El gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR, siglas en inglés) y el gen de la DHPS codifican para enzimas claves en el metabolismo del ácido fólico (Calderón *et al.*, 2013, Calderón *et al.*, 2011). Estudios previos, parecen indicar que el TMP actúa sobre la DHFR, mientras que el SMX lo hace sobre la DHPS. El uso prolongado del CTX, tanto para profilaxis como para el tratamiento, ejerce una fuerte presión de selección sobre la DHPS, lo que provoca mutaciones puntuales no sinónimas en este gen, vinculadas a la resistencia a este fármaco (Calderón *et al.*, 2010; Durand-Joly *et al.*, 2005).

Entre los genes estudiados para la caracterización genética de *Pneumocystis* la proteína mayor de superficie (MSG, siglas en inglés) desempeña un papel importante. Esta macromolécula codifica para una familia de genes multicopia con expresión diferencial. Estudios preliminares de análisis multilocus, que emplean la MSG, logran discernir entre el cuadro clínico de PcP y el estado de colonización de un individuo (Ripamonti *et al.*, 2009).

### **II.13. Métodos de tipificación molecular**

El método más sensible para la detección y caracterización de *Pneumocystis* es la secuenciación directa de los fragmentos ADN obtenidos tras la amplificación de una secuencia específica por PCR. Esta se considera la técnica de referencia en los estudios de epidemiología molecular, de acuerdo al número de diferentes genotipos presente en un gen determinado (Calderón *et al.*, 2010, Helweg-Larsen, 2004).

El análisis del polimorfismo de simple cadena es el método de tipificación más utilizado después de la secuenciación directa. Su fundamento versa sobre el concepto de que los

cambios específicos en la secuencia de los nucleótidos pueden afectar la migración de los fragmentos de ADN cuando se analizan en electroforesis en gel (Olsson *et al.*, 2001).

Otro de los métodos de tipificación que se utiliza es el análisis de los polimorfismos mediante endonucleasas de restricción (REA, siglas en inglés). Consiste en digerir un fragmento de ADN, obtenido tras PCR mediante una enzima de restricción que es específica para una secuencia de nucleótidos que puede estar presente o ausente en dicho fragmento. Este método se emplea para detectar mutaciones puntuales en el gen de la DHPS, enzima clave involucrada en la resistencia a la sulfamida en el patógeno (de Armas *et al.*, 2012; Calderón *et al.*, 2011; Matos y Esteves, 2010b).

El más novedoso de los métodos de tipificación molecular es la técnica de PCR en tiempo real, que difiere del PCR convencional, en que justamente permite cuantificar y conocer la dinámica del proceso de amplificación del ADN en el mismo momento en que se desarrolla la reacción. Además, evita contaminaciones debido a la menor manipulación de la muestra y se desarrolla en menor tiempo que la PCR convencional. Su capacidad para cuantificar la carga del microorganismo en cada muestra permite discriminar entre el estado de colonización e infección (Damiani *et al.*, 2013).

Recientemente, se describe un nuevo esquema de tipificación molecular mediante el empleo de cuatro genes del microorganismo (mt LSU ARNr, ITS, beta tubulina ( $\beta$ -tubulina) y superóxido dismutasa (SOD, por sus siglas en inglés)). Esta metodología denominada análisis multilocus (MLST, siglas en inglés) permite discriminar *P. jirovecii* en individuos infectados por el patógeno con una probabilidad de 0,987 (Maritte *et al.*, 2013).

## *MATERIALES Y MÉTODOS*

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### III.1. Diseño del estudio

Para desarrollar la presente investigación se diseñó un estudio de corte transversal, cuya finalidad fue detectar *P. jirovecii* en las muestras de LBA de pacientes sida.

#### III.2. Muestra

El universo de estudio quedó constituido por 25 muestras de LBA correspondiente a igual número de pacientes. A estos se les realizó la broncoscopia en el Salón de Endoscopia del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), durante el periodo de enero de 2006 hasta enero de 2007 las que fueron conservadas a -20 °C hasta su procesamiento.

Criterios de inclusión para la selección de los casos: Pacientes cubanos con sida y síntomas respiratorios que en el periodo de diciembre de 2006 a enero de 2007 se les realizó la broncoscopia en el IPK.

Criterio de exclusión de los casos: Se excluyen todos los pacientes con sida y síntomas respiratorios:

- No cubanos.
- Aquellos que se les realizó la broncoscopia fuera del IPK y llegó la muestra al centro.
- No incluido en el periodo diciembre 2006 a enero 2007.

Métodos empleados.

La detección de *P. jirovecii* se realizó mediante dos métodos de tinción: Giemsa y azul de toluidina. Además, se emplearon los métodos de inmunofluorescencia directa e indirecta, así como la PCR convencional. La técnica de referencia para identificar infección por *P. jirovecii* en el actual estudio fue la PCR simple del gen mt LSU ARNr (Calderón *et al.*, 2010). Para determinar la colonización por *P. jirovecii* se empleó la PCR anidada del gen mt LSU ARNr (Khodadadi *et al.*, 2013).

### **III. 3. Método de observación directa al microscopio**

Se centrifugaron cada uno de los LBA a 2 500 g. Del precipitado obtenido se tomó una muestra de 20 µL y se extendió sobre una lámina portaobjeto. Se dejó secar a temperatura ambiente y luego se realizó la observación directa al microscopio. Se debe observar un estructura en forma de panal de abeja, lo que demuestra la presencia de *P. jirovecii* en la muestra (Bava *et al.*, 2002).

### **III. 4. Métodos de tinción**

Se utilizaron los métodos de tinción giemsa y azul de toluidina. Para el método de Giemsa se siguieron los siguientes pasos. El precipitado obtenido después de la centrifugación, se extendió en una lámina portaobjeto y se dejó secar a temperatura ambiente. La lámina se introdujo en un recipiente con metanol 100% (calidad biología molecular) hasta cubrir completamente su contenido por 5 min. Posteriormente, se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, se adicionó la solución de Giemsa y se observan al microscopio las formas tróficas y los núcleos de los quistes de color rosado. Con esta técnica no se observa ninguna coloración en los quistes de *P. jirovecii* (Luna, 1968).

Para el método de azul de toluidina, se siguieron los mismos pasos previamente descritos para la observación directa al microscopio. Solo que el precipitado extendido se cubrió con etanol absoluto 100% (calidad biología molecular) y se aplicó después de secado el contenido de la solución de azul de toluidina donde se observan los quistes de color azul y núcleos de color azul fuerte (Luna, 1968).

### **III.5. Métodos de inmunofluorescencia**

Se emplearon los métodos de Inmunofluorescencia indirecta (BIO-RAD Monofluo™ KIT *P. jirovecii*, REF 72738) (IFI) e Inmunofluorescencia directa DFA (LIGHT Diagnostics™ *Pneumocystis carinii*, Cat. No. 3195) (IFD). Las técnicas se desarrollaron según lo descrito por el fabricante utilizando para cada método láminas de controles positivos (Anexo 1 y 2).

### **III.6. Extracción de ADN**

Se realizó la extracción de ADN de los LBA de cada uno de los casos seleccionados mediante el empleo del estuche comercial de Qiagen (Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al precipitado obtenido mediante centrifugación del LBA,

se le añadió 180 µL de tampón de reacción lisis (T1) y 25 µL de proteinasa K (14 mg/mL) y se incubó el homogenizado por 3 h a 56 °C. A la muestra se le añadió 200 µL de solución B3, según lo descrito por el fabricante y se incubó a 70 °C (Tersor, España) durante 10 min. Luego, se le añadieron 210 µL de etanol absoluto a la muestra y se agitó inmediatamente el contenido del vial, el cual se transfirió a una columna de extracción con su correspondiente colector (vial eppendorf® de 2 mL). Se centrifugó la mezcla resultante a 10 000 g por 1 min y se desechó el eluato. Posteriormente, se adicionó 500 µL de solución amortiguadora de lavado (BW, siglas en inglés) y se repitió nuevamente el paso anterior. La columna se colocó en un nuevo colector y se le añadió 600 µL de solución amortiguadora de lavado tipo 5 (BW5, siglas en inglés); el contenido se centrifugó a 10 000 g por 1 min. Nuevamente se centrifugó, ahora a 14 000 g por 1 min y se desechó el contenido remanente de la columna de extracción. A esta se le añadió 75 µL de agua destilada estéril y se dejó reposar durante 2 min. Finalmente, se obtuvo el ADN por centrifugación de la columna a 14 000 g por un min. El ADN se conservó a -20°C hasta el momento de su utilización.

### **III.7. Iniciadores**

Los iniciadores empleados en la PCR y secuenciación nucleotídica de los dos genes utilizados en este estudio se diseñaron por Invitrogen (Life Technologies S.A., Madrid, España) y algunas de sus características se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencia de los iniciadores empleados en el estudio para la caracterización, restricción enzimática y secuenciación de las muestras de los LBA de los pacientes sida analizados en el estudio.

Gen	Talla molecular (pb)	Secuencia 5'-3'
mt LSU rRNA	347	GATGGCTGTTTCCAAGCCCA
	260	GTGTACGTTGCAAAGTACTC GTGAAATACAAATCGGACTAGG TCACTTAATATTAATTGGGGAGC
DHPS	370	GCGCCTACACATATTATGGCCATT TAAAT C GGAAC TTTCAACTTGGCAACCAC
$\beta$ actina	202	CCT TCC TGG GCA TGG AGT CCT G GGA GCA ATG ATC TTG ATC TTC

### III.8. Reacción en cadena de la polimerasa para el mt LSU ARNr

Se desarrolló una PCR anidada, cuya secuencia diana fueron los fragmentos de 347 pb y 260 pb para la primera y segunda reacción de amplificación del gen mt LSU ARNr, respectivamente. La mezcla de reacción tanto para la primera como para la segunda PCR (50  $\mu$ L) contuvo Tris/HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, deoxirribonucleótidos (dNTP) 200  $\mu$ M, iniciador (ver Tabla. 1) 0.5  $\mu$ M, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) y 5  $\mu$ L de ADN molde. El perfil de amplificación fue el mismo para ambas reacciones: 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1,5 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra TGradient (Whatman Biometra, Göttingen, Alemania). El producto amplificado se conservó a -20 °C hasta el momento de su empleo para realizar la secuenciación.

### III.9. Reacción en cadena de la polimerasa para la DHPS

Se utilizó como secuencia diana un fragmento de 370 pb del gen que codifica para la dihidropteroato sintetasa de *P. jirovecii*. La mezcla de reacción (50 µL) contuvo Tris/HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP 400 µM, iniciador (ver Tabla. 1) 0.4 µM, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido), y 5 µL de ADN molde. El perfil de amplificación fue: 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 57 °C y 1.5 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra TGradient (Whatman Biometra, Göttingen, Alemania). El producto amplificado se conservó a -20 °C hasta el momento de su empleo para realizar la restricción enzimática.

### III.10. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del gen de la DHPS

Se utilizaron 10 µL de cada uno de los productos de la reacción (370 pb), los cuales fueron escindidos con 1 µL de *Acc I* (10 U/µL) y 1 µL de *Hae III* (10 U/µL) (Roche Diagnostics, Alemania) en 2.5 µL de tampón de reacción para cada enzima utilizada, además se añadieron 6.5 µL de agua destilada estéril para completar la mezcla de reacción hasta un volumen final de 20 µL. Ambas enzimas de restricción actuaron a las temperaturas óptimas para cada una: 37 °C para *Hae III* y 60 °C para *Acc I* (Roche Diagnostics, Alemania). La interpretación de los resultados de los estudios de restricción se realizó según lo descrito por Costa y colaboradores en el 2006. (Costa *et al.*, 2006)

Se consideraron genotipo salvaje (wild type, término en inglés) y se interpretó como un microorganismo (*P. jirovecii*) con ausencia de resistencia a las sulfamidas, aquel fragmento de 370 pb con secuencias nucleotídicas que fueron reconocidas (55A/57C) y escindidas por las dos enzimas utilizadas en el experimento. Cada una de estas enzimas de restricción generaron dos fragmentos de 229 y 141 pb con la enzima *AccI* y dos fragmentos de 221 y 131 pb con *Hae III*, los cuales se visualizaron en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Por otra parte, se consideró genotipo mutado y se interpretó como un microorganismo (*P. jirovecii*) con posible resistencia a las sulfamidas, aquel fragmento de 370 pb sin secuencias nucleotídicas que pueden ser reconocidas y escindidas por las dos enzimas utilizadas en el experimento. La actividad

de ambas enzimas es inhibida por las mutaciones que ocurren en las posiciones 55 y 57 debido a cambios nucleotídicos. Los resultados se clasificaron en simples mutantes (solo en la posición 55 ó solo en la posición 57) ó dobles mutantes (cambios en ambas posiciones). Para el genotipo mutado se observó un fragmento de 370 pb en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Costa *et al.*, 2006). En cada reacción de restricción se utilizó como control positivo una muestra con genotipo salvaje y otra con genotipo mutado previamente analizado en el laboratorio.

### **III.11. Reacción en cadena de la polimerasa para el gen de la $\beta$ actina**

Se utilizó como secuencia diana un fragmento de 202 pb del gen que codifica para secuencia de la  $\beta$  actina (GenBank No de acceso NM\_007393.3). La mezcla de reacción (50  $\mu$ L volumen final) contuvo Tris/HCl (pH 8.3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, dNTP 400  $\mu$ M, iniciadores (ver Tabla 1) 0.5  $\mu$ M, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa y 5  $\mu$ L de ADN molde. El perfil de amplificación fue: 94°C por 3 min, 40 ciclos de 1 min a 94°C, 2 min a 51°C y 1.5 min a 72°C, con una extensión final de 7 min a 72°C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra TGradient (Whatman Biometra, Göttingen, Alemania).

### **III.12. Detección de los productos amplificados por PCR**

Una vez concluidas todas las PCR antes descritas, se tomaron 8  $\mu$ L de cada uno de los productos de la reacción de amplificación y se mezclaron con 2  $\mu$ L de tampón estabilizador de muestra 6X (EDTA 500 mM, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0.01%). Estos productos se detectaron en geles de agarosa al 1.5% en TBE 1X (Tris 0.089M, ácido bórico 0.089M, EDTA 0.002M) mediante tinción con bromuro de etidio (10 mg/mL). La corrida se realizó a 90 V durante 1 h en cámara electroforética (Mupid® One, BDC, Bélgica), con el empleo del marcador de peso molecular PCR 100 bp (Low Ladder, Sigma, EEUU), cuyo rango de bandas oscila entre 100 y 1 000 pares de bases (pb). La visualización de las bandas se realizó por exposición del gel a la luz ultravioleta en un equipo transiluminador (Macrovue 2011, LKB, Suecia). Los tamaños de los fragmentos amplificados para el gen mt LSU ARNr fueron de 347 y 260 pb para la primera y segunda reacción respectivamente y 370 para la DHPS. Se siguió el mismo procedimiento para visualizar las bandas obtenidas en las reacciones de restricciones enzimáticas (Sambrook *et al.*, 1989).

### **III.13. Purificación del Producto de PCR**

Los productos de PCR amplificados fueron purificados utilizando el estuche comercial Qiaquick PCR purification Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Primero se añadieron 5 volúmenes de tampón PB (tampón mezcla) a cada producto de reacción. Luego la mezcla se adicionó a la columna de purificación y se centrifugó durante 1 min a 18 000 g. Se descartó el eluato y se añadieron 750  $\mu$ L de tampón PE (tampón de lavado), se volvió a centrifugar durante 1 min a 18 000 g y el eluato se descartó nuevamente. Se centrifugó una vez más a igual velocidad durante 1 min para eliminar todos los residuales de los pasos anteriores. Para la obtención del ADN purificado, la columna se colocó en un tubo de colecta de 1.5 mL y se añadieron 50  $\mu$ L de tampón EB (tampón de elusión) y se dejó reposar durante 1 min. Finalmente, se centrifugó la columna nuevamente durante 1 min a 18 000 g y se recobró el producto del PCR purificado.

### **III.14. Reacción de secuenciación**

Las reacciones de secuenciación se prepararon añadiendo 1  $\mu$ L de cada uno de los iniciadores empleados en la PCR (5 pmol/ $\mu$ L) y 8  $\mu$ L de la mezcla de reacción de secuencia DTCS Quick Star Master Mix (Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Quick Start Kit, de Beckman Coulter, EE.UU.). Las cantidades de agua y ADN variaron en dependencia de la concentración del producto amplificado purificado para completar un volumen final 20  $\mu$ L de reacción. El programa de amplificación utilizado fue el recomendado por el fabricante que consiste en 30 ciclos con los siguientes pasos: 96°C por 20 s, 50°C por 20 s y 60°C por 4 min.

### **III.15. Secuenciación**

Una vez concluida la reacción de secuenciación, se realizó la purificación del producto siguiendo el protocolo recomendado en el estuche comercial (Beckman Coulter, EE.UU.). Primeramente, se realizó una precipitación del ADN con 1  $\mu$ L glicógeno (20 mg/mL), 2  $\mu$ L de acetato de sodio (3M), 2  $\mu$ L EDTA (100mM) y 60  $\mu$ L de etanol absoluto. Luego de una centrifugación a 18 000 g a 4 °C durante 30 min, al precipitado obtenido se le realizaron dos lavados con etanol al 70% para eliminar las sales de la

precipitación. El producto se dejó secar y se resuspendió en 40 µL de formamida. La separación de los productos obtenidos en la reacción de secuencia se realizó en un secuenciador automático de electroforesis capilar (Beckman Coulter modelo CEQ™8800, EE.UU.).

Se secuenciaron los productos amplificados de la primera y segunda reacción de amplificación del gen mt LSU ARNr y se determinó el polimorfismo atendiendo a las posiciones 85 y 248.

### **III.16. Métodos empleados para analizar y comparar secuencias.**

Se obtuvo la secuencia consenso de cada caso analizado (de ambas cadenas) utilizando el programa Clustal X con ajuste manual. Los datos correspondiente a cada secuencia se alinearon entre ellos y con una secuencia tipo de *P. jirovecii* (previamente descrita en el banco de genes) se determinó el polimorfismo en las posiciones 85 y 248 para el gen mt LSU ARNr usando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) versión 4.1 disponible en (<http://www.megasoftware.net>).

### **III.17. Análisis estadístico**

Para el almacenamiento de la información se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel. Se calcularon los porcentajes de muestras positivas para cada uno de los métodos de detección, así como para la prevalencia de infección/colonización.

### **III.18. Aspectos éticos**

Los pacientes involucrados en la actual investigación brindaron su consentimiento informado por escrito para que los LBA se utilizaran con fines investigativos. La identidad de los pacientes nunca será revelada y la información solo será del conocimiento y manejada por los investigadores que desarrollan el proyecto. Se anexa el modelo de consentimiento informado aplicado a los pacientes (Anexo 3).

## *RESULTADOS*

#### IV. RESULTADOS

La observación microscópica directa de los LBA de cada uno los pacientes examinados no presento en ninguno de los 25 casos estructuras en forma de panal de abeja, lo que corresponde a la ausencia de *P. jirovecii*. Con respecto, a las técnicas de Giemsa y azul de toluidina todos los casos examinados resultaron negativos.

El análisis de las técnicas de inmunofluorescencia en los 25 LBA de los pacientes con sida mostró porcentajes diferentes para cada uno de los métodos utilizados. Con la IFD se detectó *P. jirovecii* en 10 de los 25 casos examinados para 40% (Figura.2). Con la IFI se obtuvo resultado positivo para *P. jirovecii* en 24% de los casos (6/25) (Figura.3). La coincidencia para ambas técnicas resultó en 60% de casos positivos para *P. jirovecii* (Tabla.2).

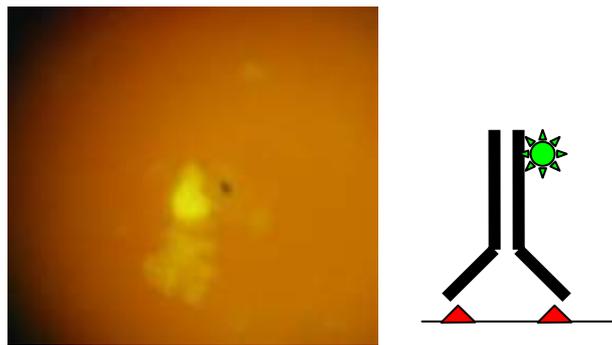


Figura. 2. Detección de *P jirovecii* por anticuerpo monoclonal demostrada mediante la técnica de IFD en LBA.

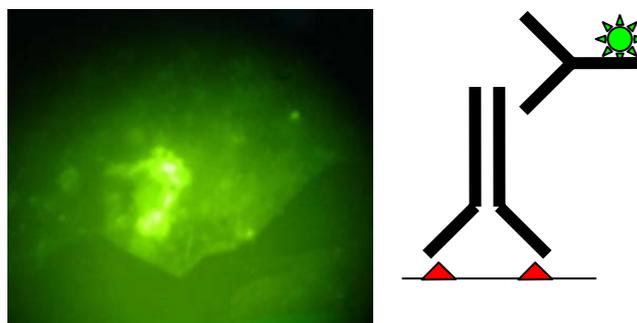


Figura.3. Detección de *P jirovecii* por anticuerpo policlonal específico demostrada mediante la técnica de IFI en LBA.

Tabla 2. Distribución por casos de los resultados positivos por las técnicas de inmunofluorescencia directa e indirecta en los lavados broncoalveolares de los pacientes sida.

<b>No de pacientes*</b>	<b>IFD</b>	<b>IFI</b>
<b>1</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>4</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>7</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>10</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>13</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>14</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>18</b>	<b>+</b>	<b>-</b>
<b>21</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>24</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>25</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>Control positivo de la técnica**</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

IFD:Inmunofluorescencia directa; IFI: Inmunofluorescencia indirecta; +: Resultado positivo; -: Resultado negativo; \*: Número de cada paciente positivo según orden de la muestra estudiada; \*\*: Lavado broncoalveolar obtenido de rata con neumonía por *P. carinii*.

El fragmento de 347 pb del gen mt LSU ARNr se logró amplificar en 4 de los 25 casos analizados para 16% (Figura. 4). Se considera que este es el mismo valor de la prevalencia de infección por *P. jirovecii* teniendo en cuenta que la PCR simple es la técnica de referencia utilizada en este estudio.

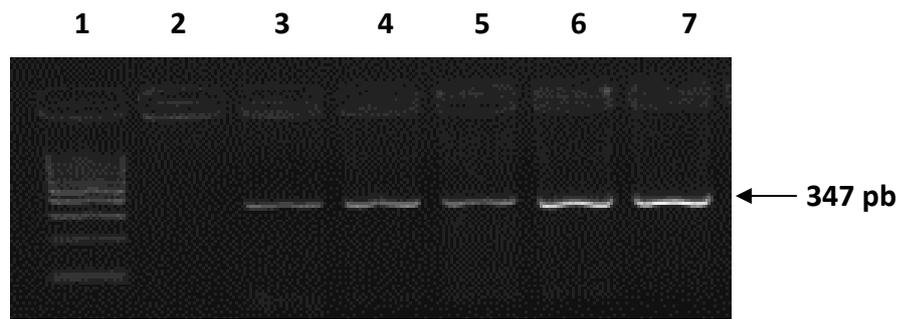


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento de 347 pb de mt LSU ARNr de *P. jirovecii*. Línea 1: marcador de peso molecular (100 pb, Promega EE.UU.), línea 2: control negativo de la reacción, líneas 3-6: muestras de LBA positivas; línea 7: control positivo de la reacción.

Con el empleo de la PCR anidada del gen mt LSU ARNr, que amplifica un fragmento de 260 pb, se obtuvo resultado positivo en 7 de las 25 muestras investigadas para 28% (Figura. 5). Este es el mismo valor que el porcentaje de casos positivos de colonización por *P. jirovecii* en las muestras analizadas. Se utiliza la PCR anidada como la técnica empleada para la detección de la colonización por *P. jirovecii*.

Con respecto a la distribución de genotipos del mt LSU ARNr en los cuatro LBA estudiados de los pacientes infectados por *P. jirovecii* se identificaron los genotipos 1 y 2 con 50% de ocurrencia. Al analizar las variantes genéticas en los siete individuos colonizados, se halló un 57% del genotipo 2 y 43% del genotipo 1. En la actual investigación no se detectó infecciones mixtas de genotipos en muestras de un mismo paciente.

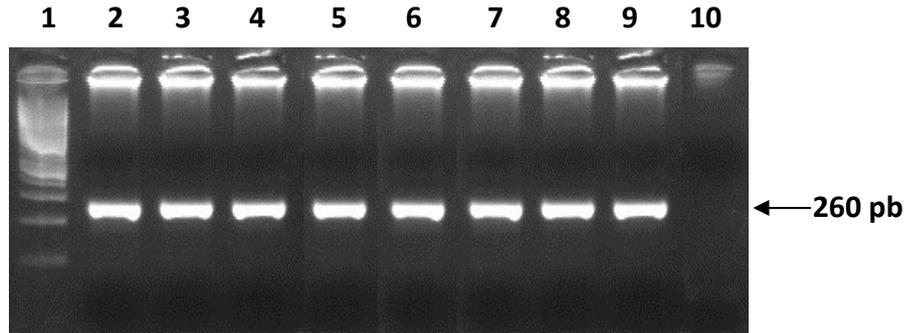


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento de 260 pb de mt LSU ARNr de *P. jirovecii*. Línea 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.). Líneas 2-8: muestras de LBA positivas; Línea 9: control positivo de la reacción; línea 10: control negativo de la reacción.

Con el empleo de los iniciadores para amplificar el gen que codifica para la DHPS (ver Tabla. 1), se obtuvo un fragmento de 370 pb en las cuatro muestras de los cuatro pacientes infectados por *P. jirovecii* (Figura 6). En los 7 casos colonizados no se logró amplificar el gen de la DHPS en ninguno de ellos.

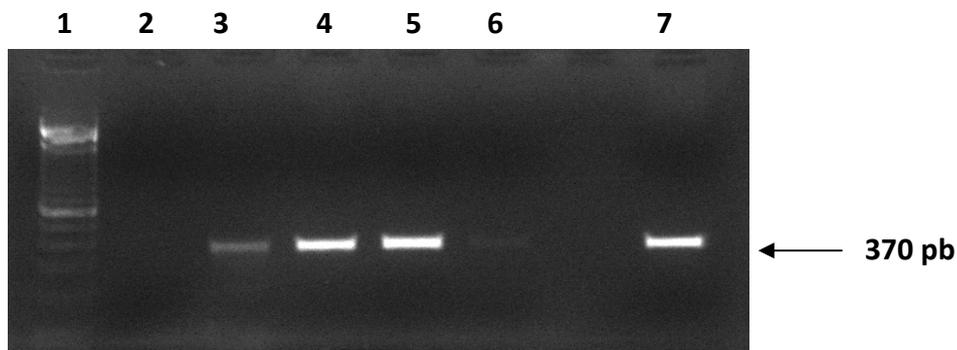


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento de 370 pb del gen de la DHPS de *P. jirovecii*. Línea 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.). Línea 2: control negativo de la reacción; Líneas 3-6 muestras de LBA positivas, línea 7: control positivo de la reacción.

En los cuatro casos en que se logró la amplificación del gen de la DHPS con la obtención del fragmento de 370 pb, se demostró la ausencia de mutaciones puntuales en este gen. En las electroforesis realizadas se observaron los patrones correspondientes al genotipo salvaje al aplicar la restricción enzimática (Figura 7). Dos fragmentos de 221 y 131 pb con *Hae* III, los cuales pueden ser visualizados en geles de agarosa teñidos con

bromuro de etidio (Figura 7). La no presencia de mutaciones puntuales en el gen de la DHPS sugiere la ausencia de resistencia a sulfamidas en los microorganismos (*P. jirovecii*) analizados de las muestras seleccionadas.

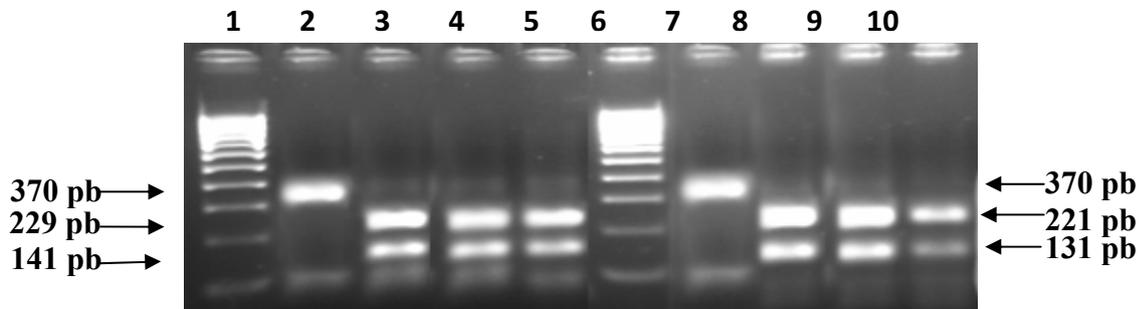


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de los patrones de restricción del producto de 370 pb de la PCR del gen de la DHPS de *P. jirovecii*. Líneas 1 y 6: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.), línea 2: Control de genotipo mutado con la enzima *Acc 1*, línea 7: Control de genotipo mutado con *Hae III*, línea 3: Control de genotipo salvaje con la enzima *Acc 1*, línea 8: Control de genotipo salvaje con *Hae III*, líneas 4 y 5: Patrones de restricción de las muestras con la enzima *Acc 1*, líneas 9 y 10: Patrones de restricción de las muestras con la enzima *Hae III*.

## ***DISCUSIÓN***

## V. DISCUSIÓN

La PcP se considera una de las infecciones oportunistas que con mayor frecuencia afectan a los pacientes VIH/sida. Aunque se utiliza la TARGA y la quimioprofilaxis en estos pacientes, este microorganismo ocasiona un impacto negativo a nivel mundial, fundamentalmente en aquellas personas que desconocen su infección por el VIH, así como las que tienen mala adherencia al tratamiento antirretroviral (Calderón *et al.*, 2013). En los países en vías de desarrollo la dificultad de acceder a los servicios de salud y los problemas técnicos-operacionales para su diagnóstico inciden en el aumento de los casos de PcP en esas regiones geográficas (De Armas *et al.*, 2011).

Los intentos realizados por cultivar el microorganismo han sido infructuosos, lo cual repercute negativamente en el conocimiento de la biología, genética y epidemiología de la enfermedad que produce el patógeno (de Armas *et al.*, 2013). Aunque se emplean varias muestras respiratorias (exudados nasales y orales, esputos espontáneos e inducidos, biopsias pulmonares y LBA) para su diagnóstico, son los LBA los que muestran los mejores resultados (Calderón *et al.*, 2011; de Armas *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2010). Sin embargo, la obtención de los LBA es un proceder invasivo para el paciente y en muchos países del mundo no se cuenta con esta metodología para el diagnóstico de rutina de la PcP (de Armas *et al.*, 2011).

En Cuba, se conoce poco sobre la PcP y su diagnóstico se basa en los hallazgos clínicos-radiológicos de los pacientes (de Armas *et al.*, 2013). Esta situación conlleva a errores importantes que pueden repercutir en un mal diagnóstico y una incorrecta prescripción de tratamiento (de Armas *et al.*, 2013; Calderón *et al.*, 2011). Por esa razón, se necesita contar con métodos de laboratorios que proporcionen seguridad y garantía de un diagnóstico confiable y preciso del patógeno. La presente investigación compara por primera vez en Cuba diferentes métodos de diagnósticos (tinción, inmunofluorescencia y moleculares) en muestras de LBA de pacientes con sida.

Uno de los métodos utilizados en el actual estudio es la observación directa al microscopio de las muestras de LBA analizadas. Con esta metodología no se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los 25 casos examinados. Esta técnica se basa en la observación de los exudados espumosos originados en el alvéolo pulmonar de pacientes

con PcP, que muestran una morfología microscópica de "panal de abejas" lo cual permite un diagnóstico fiable de la infección por *P. jirovecii*. La técnica además de ser rápida es de bajo costo, lo que representa una alternativa para los laboratorios con escasos recursos económicos donde se atienden a pacientes con sida en situaciones de inmunosupresión avanzada. La sensibilidad de las técnicas depende del tipo y la cantidad de muestra utilizada, así como del número de microorganismos presentes, aspecto pudo haber influido en los resultados obtenidos en el actual estudio. Hasta el momento y en las búsquedas realizadas en la literatura, este trabajo constituye el segundo reporte a nivel internacional que emplea esta metodología para el estudio de la PcP. Anteriormente, Bava y colaboradores obtuvieron resultados novedosos al aplicar esta técnica en Argentina. Dichos autores detectaron 35% de muestras positivas para *P. jirovecii* en secreciones respiratorias provenientes de pacientes ingresados en la unidad de cuidados intensivos del Hospital "Francisco J. Muñiz" con inmunosupresión avanzada. Sin embargo, los propios autores recomiendan un entrenamiento previo y una adecuada toma de la muestra para garantizar la fiabilidad de los resultados (Bava *et al.*, 2002).

En el presente estudio se emplearon además las técnicas de tinción de Giemsa y azul de toluidina para detectar *P. jirovecii* en las muestras de LBA de pacientes VIH/sida. El azul de toluidina revela la presencia de los quistes de *P. jirovecii* en las muestras, mientras que la Giemsa identifica las formas tróficas del microorganismo (Bava *et al.*, 2003). Con ambas metodologías no se obtuvieron resultados positivos en ninguno de los 25 casos examinados. Un estudio desarrollado en Turquía, tampoco demostró la presencia de *P. jirovecii* por la técnica de Giemsa en 50 pacientes inmunocomprometidos con síntomas respiratorios (Tosun *et al.*, 2013). Por otra parte, Mwita y colaboradores identificaron mediante el empleo de la técnica de azul de toluidina 10.4% de pacientes positivos a *P. jirovecii* en individuos VIH de Tanzania (Mwita *et al.*, 2012). Varios autores describen en la literatura científica que estas técnicas son muy utilizadas en los laboratorios que realizan procedimientos de rutina para el diagnóstico, debido a su relativo bajo costo (comparadas con la inmunofluorescencia y moleculares) y la rapidez. Sin embargo, documentan también su baja sensibilidad a medida que disminuye la carga del patógeno en la muestra (Tosun *et al.*, 2013; Mwita *et al.*, 2012; Calderón *et al.*, 2011; Bava *et al.*, 2003). Brancart y colaboradores demostraron mediante la comparación de la PCR en tiempo real y la

técnica de plata metenamina de Gomori que se necesitan alrededor de  $5 \times 10^3$  quistes/mL de LBA para obtener un resultado positivo de *P. jirovecii*. Estos resultados evidencian que debe existir una elevada carga del patógeno para detectar al microorganismo mediante los métodos de tinción (Brancart *et al.*, 2005). De la misma manera, Saksirisampant y colaboradores demostraron en un estudio desarrollado en Tailandia que los métodos de tinción pueden brindar resultados falsos negativos en 35 a 70% de los casos. Estos planteamientos evidencian que para la interpretación de los resultados se requiere tener en cuenta varios factores: el tipo de muestra utilizada (esputo espontáneo o inducido, lavado oral, LBA), la carga del microorganismo presente en las mismas, si el paciente se encuentra infectado o colonizado por el patógeno y la experiencia del observador (Saksirisampant *et al.*, 2002). Las técnicas de tinción pueden ser una alternativa económica, rápida y efectiva para el diagnóstico de la PcP siempre y cuando se conozcan las fortalezas y las debilidades que poseen cada una de estas técnicas convencionales (de Armas *et al.*, 2013; Calderón *et al.*, 2011).

Otra técnica empleada en la actual investigación es la inmunofluorescencia con principios diferentes: el método directo e indirecto. La IFD es más sensible y menos específica que la IFI porque con solo un quiste se puede informar como positiva la muestra. La IFI es menos sensible pero más específica pues se requiere observar 5 o más quistes en la muestra para interpretarla como positiva, lo que puede resultar en falsos negativos (Calderón *et al.*, 2010).

El estuche comercial de diagnóstico empleado para IFD reconoce directamente la proteína de 82 kDa de la pared de los quistes de *P. jirovecii* (Linder *et al.*, 1986). Los resultados obtenidos con esta técnica demuestran que posee una mayor sensibilidad que las técnicas convencionales. Sin embargo, consume más tiempo para brindar un resultado y es más costosa (Rodiño *et al.*, 2011). La diferencia de sensibilidad entre los métodos convencionales y las técnicas de inmunofluorescencia se reduce cuando se emplea LBA para el diagnóstico, lo que refuerza la importancia de emplear la muestra clínica óptima (Calderón *et al.*, 2011; Procop *et al.*, 2004).

El otro método de inmunofluorescencia empleado fue la IFI, el cual emplea un conjugado que reconoce a un anticuerpo monoclonal primario que previamente se ha puesto a reaccionar con antígenos específicos de la pared del patógeno (proteínas de membranas 65 kDa) (Arastéh *et al.*, 1998). En el presente estudio, se obtuvieron valores

diferentes al comparar ambas técnicas de inmunofluorescencia. Con la IFD se logró detectar 40% de casos positivos de *P. jirovecii* en las muestras examinadas, mientras que una proporción menor se obtuvo con la IFI (24%). Una posible explicación para estas diferencias se encuentra en el criterio para brindar un resultado positivo para cada una de las técnicas utilizadas según lo descrito por cada uno de los fabricantes y que se basa en el número de quistes que son necesarios para considerar una muestra positiva. Por otra parte, se describe que la IFD puede mostrar reacciones cruzadas de antígenos de *Pneumocystis* con antígenos de otros hongos tales como: *Aspergillus* sp. y *Paracoccidioides brasiliensis* (Calderón *et al.*, 2011; Silletti *et al.*, 1996). Además, artículos recientes constatan un alto porcentaje de falsos positivos con esta metodología (Calderón *et al.*, 2011; Procop *et al.*, 2004). Es válido mencionar que la IFD puede detectar la presencia de quistes vacíos, que persisten en el tejido pulmonar por espacio de cuatro a seis semanas después de un tratamiento efectivo, por lo que resulta necesario conocer la historia de tratamiento del paciente antes de brindar un resultado (Armbruster *et al.*, 1995). No obstante las técnicas de inmunofluorescencia pueden ser utilizadas como métodos de tamizaje cuando las técnicas convencionales muestren resultados negativos y se mantenga la sospecha clínica-radiológica de una infección por *P. jirovecii* (Calderón *et al.*, 2010).

El último grupo de métodos utilizados en el presente estudio fue el molecular, basado en la amplificación por la PCR de la secuencia del gen que codifica para el mt LSU ARNr. Es válido destacar que este tipo de metodología brinda resultados específicos, rápidos y confiables. Sin embargo, su empleo en laboratorios de escasos recursos y que se dedican al diagnóstico de rutina de *P. jirovecii* resulta difícil y limitado su instauración, debido al alto costo de la técnica, a la necesidad de contar con un personal calificado y a la infraestructura que necesitan los laboratorios (Calderón *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2010). Un importante estudio que compara nueve métodos moleculares con diferentes secuencias dianas, demostró que la PCR que utiliza como diana molecular el gen mt LSU ARNr mostró la mayor sensibilidad (Robberts *et al.*, 2007). Varios artículos constatan la utilidad de este gen para estudios de epidemiología molecular, de transmisión entre los pacientes y para el diagnóstico (Esteves *et al.*, 2010; Durand-Joly *et al.*, 2005, Olson *et al.*, 2001). En el actual trabajo, la PCR simple amplificó un fragmento de 347 pb del gen mt LSU ARNr en 16% de los casos analizados. Valor inferior a los obtenidos por las dos técnicas de inmunofluorescencia empleadas en la

actual investigación. Estos resultados no coinciden con la mayoría de los estudios descritos en la literatura, donde se describe que la PCR detecta más casos positivos de *P. jirovecii* que la IF. Tosun y colaboradores determinan porcentajes de 14 y 22% de casos positivos de *Pneumocystis* por IFI y PCR, respectivamente (Tosun *et al.*, 2013). De la misma manera, un estudio llevado a cabo en 131 pacientes con VIH en Etiopía demostró que la PCR posee mayor sensibilidad que las técnicas de inmunofluorescencia (29,4% vs 21,4%, respectivamente) (Aderaye *et al.*, 2008). Una explicación para los resultados obtenidos en la presente investigación podría ser la posibilidad de una inhibición de la PCR en los casos que resultaron positivos por IFI e IFD. Sin embargo, el control interno de inhibición de la  $\beta$  actina demostró lo contrario. Otra posible explicación a esta discrepancia puede ser que se deba a un exceso de la carga del microorganismo en esas muestras que podrían haber inhibido la PCR. Sin embargo, si se hubiera tenido una elevada carga positiva del patógeno suficiente para inhibir la PCR del gen mitocondrial mayor debió haber sido detectada por los métodos de tinción, los cuales brindaron resultados negativos en la totalidad de los casos. El posible argumento para justificar tales diferencias radica en la posibilidad de generar falsos positivos mediante el empleo de las técnicas de inmunofluorescencia. Procop y colaboradores, en un estudio interesante evaluaron 313 muestras por cuatro métodos diferentes y demostraron que la técnica de IFI generó un 5,3% de falsos positivos (Procop *et al.*, 2004). Por lo que se recomienda, tener en cuenta los resultados del actual estudio a la hora de valorar un resultado positivo por técnicas de inmunofluorescencia.

El diagnóstico de la PcP se debe realizar de manera integral basado en las características clínicas-radiológicas del paciente, la historia epidemiológica, la enfermedad de base y otros métodos complementarios de laboratorio que podrían reforzar la sospecha de la enfermedad. A pesar de ser una técnica costosa la PCR del gen mt LSU ARNr demostró ser la variante más útil para la detección de *P. jirovecii*. Recientemente, un estudio que evaluó costo-efectividad de métodos diagnósticos para la PcP, concluyó que el empleo de la PCR en muestras menos invasivas para el paciente (esputo espontáneo o inducido) proporciona mejores resultados (costo-efectividad) que cualquier estudio que utilice métodos convencionales de tinción e inmunofluorescencia a partir de LBA, así como los estudios radiológicos (Harris *et al.*, 2010).

El valor de 16% de casos positivos del presente estudio corresponde justamente a la prevalencia de la infección por *P. jirovecii* en los pacientes VIH/sida, ya que se toma

dicha metodología como técnica de referencia, así como la coincidencia de los tres métodos utilizados en la muestra analizada (Calderón *et al.*, 2010). Este es el primer estudio en Cuba que describe la prevalencia de *P. jirovecii* en muestras de LBA de pacientes VIH/sida. Previos trabajos desarrollados en el país identificaron diferentes prevalencias, sin embargo se analizó como población de estudios fallecidos por sida con *P. jirovecii* (de Armas *et al.*, 2012; Arteaga *et al.*, 1998). Arteaga y colaboradores, mediante el empleo de técnicas de tinción, encontraron 32% de PcP entre 211 fallecidos por sida con severa inmunodepresión, cuyas necropsias se realizaron en el IPK en el periodo de 1986-1998 (Arteaga *et al.*, 1998). Por otra parte, de Armas y colaboradores describieron 8.0% de mortalidad por *Pneumocystis* en 514 necropsias realizadas en el periodo de enero 1995-mayo de 2008. Recientemente, un estudio desarrollado en Uganda mediante PCR identificó una baja prevalencia (3.9%) de *P. jirovecii* en 129 pacientes VIH con baciloscopía negativa para la tuberculosis (Taylor *et al.*, 2012). Mayores prevalencias que las descritas en la presente investigación se constatan en la literatura. Se identifica 62.7% de positividad de *Pneumocystis* entre 59 individuos malayos con VIH/sida (Jamaiah *et al.*, 2012). Resulta muy importante conocer que casi el 20% de los pacientes con síntomas respiratorios de este estudio están infectados con *Pneumocystis*, lo que conllevaría al trazado de tareas para el control de esta infección en los hospitales de Cuba.

Por otra parte, esta investigación alerta a los médicos cubanos de la necesidad de tener siempre en mente la posibilidad de la infección por este patógeno. El actual estudio presenta una limitación en este sentido debido al reducido número de muestras de LBA que se analizan, por lo que se requiere incorporar mayor cantidad de casos para investigaciones futuras. No obstante, brinda elementos importantes de la epidemiología del microorganismo que pueden ser tomadas en cuenta para el diseño de intervenciones y abordajes futuros para el estudio de esta infección.

Otro de los hallazgos obtenidos en la actual investigación es el hecho de contar con 28% de individuos VIH/sida colonizados que fueron detectados mediante el empleo de la PCR anidada del gen mt LSU ARNr. Este dato es de extraordinaria importancia pues se describe que el individuo colonizado puede desarrollar una PcP. Además el sujeto colonizado es reservorio del organismo y puede transmitirlo a un individuo susceptible. De la misma manera, el simple hecho de estar colonizado por *Pneumocystis* genera en el pulmón del hospedero una respuesta tisular que provoca daño alveolar (de Armas *et al.*,

2013; Morris *et al.*, 2008). Diferentes prevalencias de individuos colonizados se describen en la literatura con valores de hasta 69% (Huang *et al.*, 2003). La colonización por *Pneumocystis* es frecuente entre los pacientes con VIH (Davis *et al.*, 2008), por lo que sería interesante su estudio en un mayor número de muestras con la finalidad de brindar nuevos elementos a la epidemiología de esta enfermedad en nuestro entorno. El presente estudio presenta la primera evidencia científica de la alta colonización por *P. jirovecii* en pacientes VIH/sida en Cuba.

En la actual investigación se caracterizó el microorganismo por dos de los genes más estudiado de *P. jirovecii*. El gen mt LSU ARNr se emplea por ser considerado un locus altamente informativo, polimórfico y estable en el tiempo (de Armas *et al.*, 2012b; Calderón *et al.*, 2011). Hasta la fecha, se han descrito siete genotipos basados en el polimorfismo existente en las posiciones 81, 85 y 248 de un fragmento amplificado de este gen (de Armas *et al.*, 2012a).

Con respecto a la posición 81, esta ha sido la menos estudiada para el análisis del polimorfismo genético del patógeno, pues solo se han encontrado dos bases nitrogenadas en ese sitio (C y T), con la C como la base más descrita. Tsolaki y colaboradores son los únicos investigadores que describen la existencia de la T en esa posición (Tsolaki *et al.*, 1998). En cuanto a la composición nucleotídica presente en las posiciones 85 y 248 se han descrito cinco posibles combinaciones del mt LSU ARNr. A, T y C son generalmente las bases nitrogenadas reportadas en la 85, para la cual ningún estudio, ha identificado la presencia de G (de Armas *et al.*, 2012a). La posición 248 del gen es menos polimórfica, solo dos variantes se describen: C y T, con predominio de la C en los genotipos descritos. De esa manera, se conoce que 85C/248C corresponde al genotipo 1, 85A/248C al 2, 85T/248C es el genotipo 3, 85C/248T y 85A/248T son asignados a los genotipos 4 y 5, respectivamente. Los diferentes genotipos pueden combinarse en una misma muestra de un mismo paciente y es lo que se conoce como infección mixta (de Armas *et al.*, 2012b; Esteves *et al.*, 2010; Beard *et al.*, 2000).

En el actual estudio, de las cinco posibles combinaciones que se han descrito para el gen mt LSU ARNr se identificaron solo 2 genotipos (1 y 2) tanto en infectados como en colonizados. Este estudio demostró una paridad (50%) entre los genotipos 1 y 2 en los infectados, mientras que se describe un ligero incremento del genotipo 2 en los

colonizados (57%). Estos datos corroboran la hipótesis de la estrecha y activa transmisión de *P. jirovecii* en Cuba, debido a la similitud de los genotipos encontrados entre los pacientes analizados (de Armas *et al.*, 2012a). Además, coinciden con los descritos en ciudades como Sevilla, Lisboa, Londres y Sydney, donde se describe una circulación del genotipo 1, lo que se corresponde con el que más comúnmente se reporta en Europa (Esteves *et al.*, 2008; Montes-Cano *et al.*, 2004). Por otra parte, se constata que el genotipo 2 es el que se documenta con mayor frecuencia (42,0%) en La India y EE.UU. (Gupta *et al.*, 2011; Beard *et al.*, 2000), lo que demuestra que existe una distribución heterogénea de genotipos del patógeno a nivel mundial (de Armas *et al.*, 2012a; Gupta *et al.*, 2011, Esteves *et al.*, 2008; Montes-Cano *et al.*, 2004; Beard *et al.*, 2000). Las diferencias en la distribución de genotipos del mt LSU ARNr se deben propiamente a factores inherentes de cada área o región, donde predominan, las características climáticas y geográficas que influyen directamente en la distribución, circulación y transmisión de diferentes genotipos de *P. jirovecii* (de Armas *et al.*, 2012a; Gupta *et al.*, 2011, Esteves *et al.*, 2008; Montes-Cano *et al.*, 2004; Beard *et al.*, 2000). Es válido destacar, que regiones geográficas similares, con condiciones climáticas parecidas tienen tendencias al predominio del mismo genotipo (de Armas *et al.*, 2012b; Beard *et al.*, 2000).

Sin embargo, los resultados del presente estudio no coinciden con lo descrito previamente por de Armas y colaboradores en el mismo país (de Armas *et al.*, 2012a). Estos autores analizaron la distribución de genotipos de *P. jirovecii* en 514 necropsias de fallecidos por sida en un periodo de 14 años, identificando un 88,5% de genotipo 3. Estas evidencias sugieren un papel más virulento para el genotipo 3, al menos para las muestras de cubanos fallecidos con *P. jirovecii*. No obstante, otros estudios (cohorte prospectivos) se deben desarrollar para corroborar esta hipótesis, lo que representaría un hallazgo sumamente interesante para la comprensión de la epidemiología de la enfermedad que produce este patógeno.

El segundo gen evaluado en este trabajo es el que codifica para la DHPS, enzima clave en el metabolismo del ácido fólico y con implicación en la resistencia a las sulfamidas. El CTX, combinación de TMP y SMX, constituye el fármaco de elección para la profilaxis y el tratamiento de la PcP. La existencia de mutaciones puntuales en este gen en el caso de *Pneumocystis*, coincide con lo descrito en otros microorganismos como

*Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Neisseria meningitidis* y *Plasmodium falciparum* (Matos y Esteves, 2011).

El análisis de la resistencia en *Pneumocystis* se realiza de manera indirecta, ya que es un patógeno que no se puede cultivar. Las primeras descripciones sobre este aspecto fueron aportadas por Lane y colaboradores en 1997 (Lane *et al.*, 1997). Fundamentalmente, dos posiciones (55 y 57) son las involucradas en la resistencia a las sulfamidas, donde todas las mutaciones reportadas son cambios no sinónimos que resultan en sustituciones aminoacídicas (principalmente cambio de 55Treonina (Thr) por Alanina y 57Prolina (Pro) por Serina) (Matos y Esteves, 2011). Resulta genotipo salvaje aquella muestra que presenta en la posición 55 el aminoácido Thr y Pro en la posición 57. La ausencia de resistencia en los microorganismos es característica del genotipo salvaje. (Matos y Esteves, 2011).

En esta investigación, las cuatro muestras amplificadas por el gen mt LSU ARNr también brindaron resultado positivo por el gen de la DHPS. Esto ratifica que estos cuatro pacientes estaban infectados por el microorganismo. El gen de la DHPS se encuentra en una única copia en el genoma del patógeno, por lo que su amplificación depende de la carga del microorganismo en la muestra. En cambio, el gen mt LSU ARNr posee múltiples copias en las mitocondrias de *P. jirovecii*, por lo que resulta más factible su amplificación. En ninguna de las 7 muestras analizadas de los individuos colonizados se logró la amplificación del gen de DHPS, probablemente debido a la baja carga del microorganismo en los LBA analizados como ha sido propuesto por otros autores (Matos y Esteves, 2011; Esteves *et al.*, 2010a).

Las cuatro amplificaciones obtenidas por la PCR-370 pb de la DHPS, resultaron ser genotipo salvaje, lo cual indica la ausencia de mutaciones puntuales en este gen en los LBA estudiados. Este hallazgo, a pesar de contar con un número reducido de muestras, resulta de extraordinaria importancia para nuestro país. Es ante todo, el primer estudio en Cuba en pacientes con VIH/sida en muestras de este tipo que aborda la situación de la resistencia a las sulfamidas en *P. jirovecii*. Además, sugiere que en nuestro entorno no existe hasta el momento resistencia a este fármaco a pesar de utilizarse como quimioprofilaxis y tratamiento en los pacientes VIH/sida. Estos resultados coinciden con los descritos previamente por de Armas y colaboradores en un estudio de 14 años

en fallecidos cubanos por sida con *P. jirovecii* (de Armas *et al.*, 2012b). De la misma manera, otros autores de países en vías de desarrollo como Brasil, La India, China y Colombia describen bajas prevalencias de mutaciones puntuales en dicho gen (Muñoz *et al.*, 2012; Tyagi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009; Wissmann *et al.*, 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos en la actual investigación discrepan de los descritos por Monroy-Vaca y colaboradores en 163 hisopados nasales de niños cubanos con síndrome coqueluche. Estos autores detectaron 18% de las muestras de *P. jirovecii* con mutaciones puntuales en el gen de la DHPS, lo que se considera la primera evidencia de resistencia al CTX en Cuba (Monroy-Vaca *et al.*, 2013). Por esta razón, se necesitan realizar futuras investigaciones con un mayor número de pacientes con VIH/sida y PcP y extender los estudios de resistencia a otros grupos poblacionales donde la presencia de *P. jirovecii* está aumentando a nivel mundial (diabéticos, trasplantados, pacientes con cáncer) (de Armas *et al.*, 2013). Por otra parte, resulta interesante conocer la prescripción del CTX en nuestro entorno para tratar infecciones ocasionadas por otros microorganismos, lo cual podría generar resistencia cruzada en los casos con *P. jirovecii* (Dini *et al.*, 2010).

Este trabajo pretende brindar datos importantes para el empleo de técnicas diagnósticas en los diferentes niveles del sistema de salud cubano. Además, muestra la distribución de genotipos del microorganismo sugiriendo hipótesis interesante que ayudarían a comprender mejor la epidemiología del microorganismo. Por otra parte, muestra evidencia de la eficacia del cotrimozaxol como fármaco de primera línea para combatir la neumocistosis. Los resultados de este trabajo generarían importantes estrategias para el control de la PcP en Cuba.

## *CONCLUSIONES*

## VI. CONCLUSIONES

1. Este estudio permitió corroborar que la PCR que emplea el gen que codifica para la subunidad mayor del ARN ribosomal de la mitocondria de *P. jirovecii* es la técnica de mayor utilidad para detectar el patógeno en las muestras analizadas de pacientes en comparación con la tinción y la inmunofluorescencia, lo que coincide con lo reportado en la literatura internacional.
2. Con este primer estudio se pudo determinar la prevalencia de infección y de colonización en el pequeño grupo de LBA de pacientes VIH/sida en Cuba, lo que permite un mayor conocimiento de la epidemiología del patógeno.
3. La caracterización genética de *P. jirovecii* en muestras de LBA, mediante el empleo del gen mt LSU ARNr, demostró un ligero predominio del genotipo 2 en los pacientes VIH/sida estudiados y genotipo salvaje mediante el gen de la DHPS.
4. No existieron mutaciones en el gen de la DHPS vinculadas a la resistencia a sulfamidas en las muestras analizadas, lo que sugiere que el CTX continua siendo el fármaco de elección para la neumositocis a pesar de ser evaluado en una muestra pequeña.

## *RECOMENDACIONES*

## VII. RECOMENDACIONES

- Realizar una cohorte prospectivo que involucre mayor número de muestras de LBA.
- Caracterizar genéticamente las muestras de LBA con *P. jirovecii* empleando otras dianas moleculares (subunidad menor del ARNr mitocondrial (mt SSU rRNA)) y la secuencia del espaciador interno de transcripción del ARN (ITS1 e ITS2).

## *REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ammich O. Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. Virchows Arch Pathol Anat 1938;302:539-54.

Armbruster C, Pokieser L, Hassl A. Diagnosis of *Pneumocystis carinii pneumonia* by bronchoalveolar lavage in AIDS patients. Comparison of Diff-Quik, fungifluor stain, direct immunofluorescence test and polymerase chain reaction. Acta Cytol. 1995;39(6):1089-93.

Aratés KN, Simon V, Musch R, Weiß ROP, Przytarsky K, Futh UM, *et al.* Sensitivity and specificity of indirect immunofluorescence and Grocott technique in comparison with immunocytology (alkaline phosphatase anti alkaline phosphatase=APAAP) for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* in broncho-alveolar lavage (BAL). Eur J Med Res. 1998;3(2):359-63.

Aliouat-Denis CM, Martinez A, Aliouat el M, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E. The *Pneumocystis* life cycle. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009;104(3):419-26.

Aderaye G, Woldeamanuel Y, Asrat D, Lebbad M, Beser J, Worku A, *et al.* Evaluation of Toluidine Blue O staining for the diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* in expectorated sputum sample and bronchoalveolar lavage from HIV-infected patients in a tertiary care referral center in Ethiopia. Infection. 2008;36(3):237-43.

Arteaga Hernández E, Capó de Paz V, Pérez Fernández-Terán ML. Micosis oportunistas invasivas en el sida. Un estudio de 211 autopsias. Rev Iberoam Micol 1998;15(1):33-5.

Benecke E. Eigenartige Bronchiolenerkrankung im ersten Lebensjahr. Verh Dtsch Ges Pathol 1938;31:402-6.

Bava AJ, Cattaneo S, Bellegarde E. Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wet mount preparations. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2002;44(5):279-82.

Bava AJ, Moreno D, Bellegarde E. Comparación de 3 técnicas para el diagnóstico de la neumocistosis pulmonar en pacientes con SIDA. Rev Argen Microbiol. 2005;37(3): 150-2.

Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, *et al.* Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. Emerg Infect Dis 2000;6(3):265-72.

Cushion MT. Are members of the fungal genus pneumocystis (a) commensals; (b) opportunists; (c) pathogens; or (d) all of the above? PLoS Pathog. 2010 23;6(9):e1001009.

Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet JC, Nevez G, Garin YJ, Derouin F, Totet A. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with Pneumocystis pneumonia. Clin Infect Dis. 2010;51(3):259-65.

Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrer V, Respaldiza-Salas N, de la Horra-Padilla C, *et al.* Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. Protist. 2002;153(3):303-10.

Calderón EJ, Gutiérrez-Rivero S, Durand-Joly I, Dei-Cas E. *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther. 2010;8(6):683-701.

Calderón Sandubete E, De Armas Rodríguez Y, Capó de Paz V. *Pneumocystis jirovecii*: cien años de historia. Rev Cubana Med Trop. 2011;63(2):97-116.

Calderón EJ, De Armas Y, Panizo MM, Wissmann G. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Latin America. A public health problem? Expert Rev Anti Infect Ther. 2013;11(6):565-70.

Carini A. Formas de eschizogonia do trypanosoma lewisi. Bol Soc Med Cir Sao Paulo 1910;18:204.

Chagas C. Nova tripanozomiazaea humana. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909;1:159-218.

Costa MC, Esteves F, Antunes F, Matos O. Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in immunocompromised patients: preliminary results. J Eukaryot Microbiol 2006;53 (Suppl 1):104-5.

Damiani C, Choukri F, Le Gal S, Menotti J, Sarfati C, Nevez G, Derouin F, Totet A. Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis jirovecii*. Emerg Infect Dis. 2012 ;18(5):877-8.

Damiani C, Le Gal S, Da Costa C, Virmaux M, Nevez G, Totet A. Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1->3)- $\beta$ -D-glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* colonization. J Clin Microbiol. 2013;51(10):3380-8.

Davis JL, Welsh DA, Beard CB, Jones JL, Lawrence GG, Fox MR, *et al.* Pneumocystis colonisation is common among hospitalised HIV infected patients with non-Pneumocystis pneumonia. Thorax. 2008;63(4):329-34.

De Armas Y, Friaza V, Capó V, Durand-Joly I, Govín A, de la Horra C, Dei-Cas E, Calderón EJ. Low genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* among Cuban population based on two-locus mitochondrial typing. Med Mycol. 2012a;50(4):417-20.

De Armas Y, Capó V, Govín A, López LX, Friaza V, Durand-Joly I, *et al.* Caracterización genética de *Pneumocystis jirovecii* en fallecidos por sida, IPK, 1995-2008. Biotecnol Apl 2012b;29(3):198-9.

De Armas Y, Capó V, Calderon E. *Pneumocystis jirovecii* en Cuba: Qué sabemos realmente? Rev Cubana Med Trop. 2013;65(2).

Delanöe P, Delanöe M. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. CR Acad Sci (Paris) 1912;155:658-60.

De Castro N, Scemla A, Gallien S, Molina JM. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients. Rev Mal Respir. 2012;29(6):793-802.

Dini L, du Plessis M, Freaan J, Fernandez V. High prevalence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from patients with *Pneumocystis pneumonia* in South Africa. J Clin Microbiol 2010;48(6):2016-21.

Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. FEMS Immunol Med Microbiol 2005;45(3):405-10.

Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, Costa MC, Calderón EJ, Antunes F, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. Clin Microbiol Infect 2008;14(4):356-62.

Esteves F, Gaspar J, Tavares A, Moser I, Antunes F, Mansinho K, Matos O. Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. Infect Genet Evol. 2010;10(2):192-9.

Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature 1988;334(6182):519-22.

Frenkel JK. *Pneumocystis jirovecii* n.sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. Natl Cancer Inst Monogr 1976;43:13-30.

Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Agarwal SK, Samantaray JC, Kumar L, *et al.* Genotypic variation of *Pneumocystis jirovecii* isolates in India based on sequence diversity at mitochondrial large subunit rRNA. Int J Med Microbiol 2011;301(3):267-72.

Harris JR, Marston BJ, Sngrujee N, DuPlessis D, Park B. Cost-effectiveness analysis of diagnostic options for *Pneumocystis pneumonia* (PcP). Plos One. 2011;6(8):e23158.

Helweg-Larsen J. *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. Dan Med Bull 2004;51(3):251-73.

Hernández Puentes YZ, Paula Piñera BM, Salinas Olivares M, Vila González W, Casa de Valle Castro M. Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. Rev Cubana Med Mil 2010;39(2). Disponible en: [www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572010000200013&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572010000200013&script=sci_arttext).

Huang L, Crothers K, Morris A, Groner G, Fox M, Turner JR, *et al.* Pneumocystis colonization in HIV-infected patients. J Eukaryot Microbiol. 2003;50 Suppl:616-7.

Jamaiah I, Rohela M, Tok EL, Tan CL, Tan WH, Teo WS, *et al.* *Pneumocystis carinii* (jirovecii) pneumonia (PCP): the most common opportunistic infection observed in HIV/AIDS cases at the University Malaya Medical Centre, Kuala Lumpur, Malaysia. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2012;43(4):825-31.

Khodadadi H, Mirhendi H, Mohebbali M, Kordbacheh P, Zarrinfar H, Makimura K. Pneumocystis jirovecii Colonization in Non-HIV-Infected Patients Based on Nested-PCR Detection in Bronchoalveolar Lavage Samples. Iran J Public Health. 2013;42(3):298-305.

Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, *et al.* Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis 1997;175(2):482-5.

Li K, He A, Cai WP, Tang XP, Zheng XY, Li ZY, *et al.* Absence of Pneumocystis jirovecii dihydropteroate synthase gene mutations among samples from a group of AIDS patients in China. Scand J Infect Dis. 2009;41(2):152-4.

Luna LG. Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3ra. ed. McGraw Hill Publications. New York; 1968.

Matsumoto Y, Yoshida Y. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. J Protozool 1984;31(3):420-8.

Menéndez-Capote R, Millán-Marcelo JC. Infecciones y otros procesos oportunistas en un grupo de pacientes cubanos en el estadio IV de VIH. *Rev Cubana Med Trop* 1992;44(1):17-9.

Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, *et al.* Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg Infect Dis* 2004;10(10):1713-20.

Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(2):297-317.

Monroy-Vaca EX, de Armas Y, Illnait-Zaragozí MT, Toraño G, Diaz R, Vega D, *et al.* Prevalence and genotype distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban infants and toddlers with whooping cough. *J Clin Microbiol.* 2013 (PMID:24131683)

McTaggart LR, Wengenack NL, Richardson SE. Validation of the MycAssay Pneumocystis kit for detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage specimens by comparison to a laboratory standard of direct immunofluorescence microscopy, real-time PCR, or conventional PCR. *J Clin Microbiol.* 2012;50(6):1856-9.

Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* genotypes in the Spanish population. *Clin Infect Dis* 2004;39(1):123-8.

Montes-Cano MA, Chabe M, Fontillon-Alberdi M, de-Lahorra C, Respaldiza N, Medrano FJ, *et al.* Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(1):125-7.

Matos O, Esteves F. *Pneumocystis jirovecii* multilocus gene sequencing: findings and implications. *Future Microbiol.* 2010a;5(8):1257-67.

Matos O, Esteves F. Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite.* 2010b;17(3):219-32.

Maitte C, Leterrier M, Le Pape P, Miegerville M, Morio F. Multilocus sequence typing of *Pneumocystis jirovecii* from clinical samples: How many and which loci should be used? J Clin Microbiol. 2013;51(9):2843-9.

Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. J Infect Dis 2008;197(1):10-7.

Muñoz C, Zuluaga A, Restrepo A, Tobón A, Cano LE, Gonzalez A. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012 ;72(3):204-13.

Mwita J, Mugusi F, Pallangyo K. Pneumocystis pneumonia and pulmonary tuberculosis among HIV-infected patients at Muhimbili National Hospital, Tanzania. East Afr J Public Health. 2012;9(1):10-2.

Ng VL, Yajko DM, Hadley WK. Extrapulmonary pneumocystosis. Clin Microbiol Rev. 1997;10(3):401-18. Review.

Olsson M, Strålin K, Holmberg H. Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Clin Microbiol Infect 2001;7(9):492-7.

Orsi CF, Gennari W, Venturelli C, La Regina A, Pecorari M, Righi E, Machetti M, Blasi E. Performance of 2 commercial real-time polymerase chain reaction assays for the detection of *Aspergillus* and *Pneumocystis* DNA in bronchoalveolar lavage fluid samples from critical care patients. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;73(2):138-43.

Procop GW, Wilson M. Infectious disease pathology. Clin Infect Dis. 2001;32:1589-601.

Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, Artymyshyn RL, Katanik MT, Weinstein MP. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four stain methods. J Clin Microbiol. 2004 Jul;42(7):3333-5.

- Porter A. The occurrence of *Pneumocystis carinii* in mice in England. *Parasitology* 1915;8:255.
- Porollo A, Meller J, Joshi Y, Jaiswal V, Smulian AG, Cushion MT. Analysis of current antifungal agents and their targets within the *Pneumocystis carinii* genome. *Curr Drug Targets*. 2012;13(12):1575-85.
- Rodríguez Vigil E. Neumonía intersticial por *Pneumocystis carinii*. *Rev Cubana Ped* 1969;41:317.
- Razón Behar R, Cubero Menéndez O, Vásquez Ríos B, Chao Barreiro A, Gala Valiente M, Cubeñas Chala YD. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Rev Cubana Med Trop* 1977;29(3):103-14.
- Rodiño J, Rincón N, Aguilar YA, Rueda ZV, Herrera M, Vélez LA. Microscopic diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in bronchoalveolar lavage and oropharyngeal wash samples of immunocompromised patients with pneumonia. *Biomedica*. 2011;31(2):222-31.
- Roembke F, Heinzow HS, Gosseling T, Heinecke A, Domagk D, Domschke W, *et al*. Clinical outcome and predictors of survival in patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia - results of a tertiary referral center. *Clin Respir J*. 2013. doi: 10.1111/crj.12042.
- Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58(4):385-92.
- Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, Huang L, Schuegger R, Sing A, *et al*. Restriction Fragment Length Polymorphism Typing Demonstrates Substantial Diversity among *Pneumocystis jirovecii* Isolates. *J Infect Dis* 2009;200(10):1616-22.

Silletti RP, Glezerov V, Schwartz IS. Pulmonary *Paracoccidioidomycosis* misdiagnosed as *Pneumocystis pneumonia* in an immunocompromised host. *J Clin Microbiol*. 1996;34(9):2328-2330.

Sarkar P, Rasheed HF. Clinical review: Respiratory failure in HIV-infected patients - a changing picture. *Crit Care*. 2013;17(3):228.

Summah H, Zhu YG, Falagas ME, Vouloumanou EK, Qu JM. Use of real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients: a meta-analysis. *Chin Med J (Engl)*. 2013;126(10):1965-73.

Sun T, Chess Q, Tanenbaum B. Morphologic criteria for the identification of *Pneumocystis carinii* in Papanicolaou-stained preparations. *Acta Cytol*. 1986;30(1):80-2.

Tasaka S, Tokuda H, Sakai F, Fujii T, Tateda K, Johkoh T, *et al*. Comparison of clinical and radiological features of pneumocystis pneumonia between malignancy cases and acquired immunodeficiency syndrome cases: a multicenter study. *Intern Med*. 2010;49(4):273-81.

Tasaka S, Tokuda H. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J Infect Chemother*. 2012;18(6):793-806.

Taylor SM, Meshnick SR, Worodria W, Andama A, Cattamanchi A, Davis JL, *et al*. Low prevalence of *Pneumocystis pneumonia* (PCP) but high prevalence of pneumocystis dihydropteroate synthase (dhps) gene mutations in HIV-infected persons in Uganda. *PLoS One*. 2012;7(11):e49991.

Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36(1):90-3.

Tyagi AK, Mirdha BR, Luthra K, Guleria R, Mohan A, Singh UB, *et al.* Dihydropteroate synthase (DHPS) gene mutation study in HIV-Infected Indian patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. J Infect Dev Ctries. 2010;4(11):761-6.

Tosun I, Buruk K, Dede R, Kaklıkaya N. Investigation of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory samples of immunocompromised patients with PCR, IFA and Giemsa staining methods. Mikrobiyol Bul. 2013;47(1):195-7.

Vargas SL, Pizarro P, López-Vieyra M, Neira-Avilés P, Bustamante R, Ponce CA. Pneumocystis colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. Clin Infect Dis. 2010;50(3):e19-21.

Walzer PD, Perl DP, Krogstead DJ, Rawson P, Schultz MG. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. Ann Intern Med 1974;80(1):83-93.

Wakefield AE. *Pneumocystis carinii*. Br Med Bull. 2002;61:175-88.

Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE, Denis CM, Miller RF. Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. J Infect Dis. 2003;187(6):901-8.

Wissmann G, Alvarez-Martinez MJ, Meshnick SR, Dihel AR, Prolla JC. Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. J Eukaryot Microbiol. 2006 Jul-Aug;53(4):305-7.

Wissmann G, Morilla R, Friaza V, Calderón E, Varela JM. Human reservoirs of *Pneumocystis*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(1):38-43.

***ANEXOS***

## ANEXO 1

**Protocolo de Inmunofluorescencia indirecta (BIO-RAD Monofluo™ KIT *P. jirovecii*, REF 72738 aplicado a las muestras de LBA de pacientes sida en el presente .**

1. Se centrifugaron los LBA durante 15 minutos a 3 000 g y se lavó el material particulado/granulable en agua destilada. Se repitió dos veces el paso anterior, comprobando que el gránulo estuvo completamente resuspendido entre los lavados. Se aplicó vórtex.
2. Luego se extendió 10-20 µl del contenido sobre la superficie total de un pozo/hueco y se dejó evaporar a 37°C hasta quedar seco. Las muestras se recubrieron con 1-2 gotas de acetona (calidad biología molecular) y se dejó evaporar a temperatura ambiente.
3. Los preparados se enjuagaron en un chorro de agua destilada para eliminar las sales de la muestra, las que reducen la eficacia de la digestión de enzimas. Se dejó secar al aire las preparaciones.
4. Se diluyó la enzima reconstituida 1 en 10 con su diluyente. Se recomienda diluir solamente la enzima reconstituida que haga falta para uso inmediato.
5. Extensión de 20 µl de enzima diluida por encima de las muestras secas y fijadas, se verifica que toda la superficie quede bien cubierta por el reactivo.
6. Incubar las muestras exactamente durante 30 minutos en una cámara humidificada calibrada a 37°C. Si se continúa durante más de 30 minutos, el resultado será una excesiva digestión de los oocistos. Los oocistos podrían observarse menos característicos y más difíciles de identificar.
7. Enjuagar las muestras con agua destilada en un chorro de agua por encima de la superficie. No se debe dirigir el chorro directamente a la muestra.
8. Enjuagar con papel adsorbente y dejar secar al aire.
9. Agregar 15 µl de anticuerpo anti-*P. jirovecii* a las muestras. Asegurarse de que toda la superficie quede cubierta con el reactivo. Incubar en una cámara humidificada durante 15 minutos a 37°C.

10. Enjuagar las muestras tal como se explica en el apartado 7, luego repetir el paso 8.
11. Agregar a las muestras 15µl de anticuerpo conjugado FITC anti-ratón. Asegurarse de que toda la superficie quede cubierta con el reactivo. Incubar en una cámara humidificada durante 15 minutos a 37°C.
12. Repetir los pasos 7 y 8 nuevamente.
13. Colocar una gota de vehículo de absorción en cada muestra y aplicar un cubridor del tamaño apropiado. Invertir la lámina en papel absorbente y presionar ligeramente para excluir el exceso de vehículo de absorción y las burbujas de aire.
14. Examinar la muestra para ver si hay oocistos de color verde naranja brillante o medio brillante, la observación puede ser de modo uniforme o no uniforme. A los residuos celulares se puede aplicar contracolorante azul de Evans, que tendrán una fluorescencia roja. Examinar toda la superficie de la muestra.
15. El resultado será positivo si se observa más de 5 oocistos en la muestra. El estuche brinda controles positivos para comprobar la calidad del ensayo.

## ANEXO 2

### **Protocolo de Inmunofluorescencia directa DFA (LIGHT Diagnostics™ *Pneumocystis carinii*, Cat. No. 3195)**

1. Dejar los portaobjetos con la muestra, los portaobjetos de control y todos los reactivos hasta que alcancen la temperatura ambiente.
2. Coloque con cuidado una gota de (40µl) del reactivo PCP DFA en cada pocillo del portaobjeto. Si fuera necesario, use la parte del lateral de un aplicador para extender el reactivo hasta cubrir toda la superficie del pocillo. Evite raspar la superficie del pocillo mientras pipetea o extiende el reactivo. Incube los portaobjetos en una cámara húmeda durante 15 minutos a 37°C (también se puede incubar durante 30 minutos a 37°C).
3. Elimine el exceso del reactivo y lave sumergiendo al portaobjeto, con agitación suave, en un recipiente de Coplin lleno con reactivo de lavado durante 1 a 2 minutos. Repita el lavado en otro recipiente lleno con reactivo de lavado durante 1 a 2 minutos. No enjuague el portaobjeto con una piseta, se puede desprender los quistes o los agregados de quistes.
4. Agregue 3-4 gotas del medio de preparación a la superficie y coloque un cubreobjeto.
5. Examine los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia a 400X en busca de células que muestre la fluorescencia de color verde manzana del FITC.
6. El resultado será positivo si se observa un quiste en la muestra. El estuche brinda controles positivos para comprobar la calidad del ensayo.

## ANEXO 3

### CONSENTIMIENTO INFORMADO

#### Información a los pacientes.

**Protocolo de Investigación:** “Caracterización genética de muestras de *Pneumocystis*

*jirovecii* detectadas en lavados broncoalveolares de pacientes cubanos con sida.

El Ministerio de Salud Pública (MINSAP) y el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"(IPK), se proponen realizar una investigación acerca de la prevalencia de *Pneumocystis jirovecii* (uno de los principales patógenos respiratorios que afectan a los individuos con VIH/sida) en los pacientes con sida.

**Este consentimiento informado consta de 2 partes:**

- Hoja informativa (para compartir información sobre el estudio con usted)
- Certificado de consentimiento (para su firma, si usted elige autorizar)

#### **Parte I: Hoja informativa**

##### *Introducción*

En el IPK ingresan pacientes con infecciones epidémicas poco usuales en nuestro medio, algunas veces traídas de otros países, y pacientes con VIH/sida. Por lo tanto, los agentes infecciosos que pueden producir la muerte a los pacientes que acuden a nuestro centro son poco usuales y no son suficientemente conocidas sus características y su biología.

Por este medio, le estamos brindando información para que con su decisión autorice al empleo de sus fluidos para fines investigativos, lo cual nos permita contar con la posibilidad de realizar esta investigación. Este documento puede contener palabras que usted no comprenda. Por favor, tome su tiempo para realizar las preguntas que necesite relacionadas con el estudio antes de decidir participar. A nosotros nos gustaría invitarlo a colaborar en este estudio, pero solo si usted comprende todo sobre el mismo.

### ***Propósito y descripción de la investigación***

El propósito de la investigación es conocer más sobre este agente infeccioso, sobre su epidemiología y biología para diseñar métodos de diagnóstico temprano más certeros, para establecer acciones preventivas con el fin de evitar la propagación de la enfermedad, así como, conocer la sensibilidad a los antibióticos para instaurar un mejor tratamiento. Esta investigación será útil para conocer aspectos clínicos y epidemiológicos, y permitirá diseñar estrategias apropiadas para el control de estas infecciones en la población cubana. Se utilizarán los LBA que se colectarán durante la estancia suya en el Hospital para estudios investigativos microscópicos, microbiológicos y de biología molecular. Siempre se protegerá la identidad del paciente.