

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

EPIDEMIOLOGÍA DE LA COLONIZACIÓN POR
PNEUMOCYSTIS EN POBLACIÓN GENERAL

Memoria presentada por Rosa María Yang Lai para optar al grado de
Doctor en Medicina y Cirugía

Sevilla, junio de 2013

**EPIDEMIOLOGÍA DE LA COLONIZACIÓN POR
PNEUMOCYSTIS EN POBLACIÓN GENERAL**

Memoria presentada por Rosa María Yang Lai para optar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía

Sevilla, junio de 2013



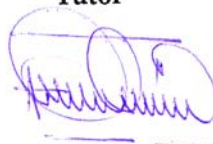
**Francisco J.
Medrano Ortega**
Profesor Asociado de
Medicina

Directores



**Enrique Calderón
Sandubete**
Profesor Asociado de
Medicina

Tutor



Eduardo Lissen Otero
Catedrático de Medicina

**Departamento de Medicina
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

谨以此献给我敬爱的父母

杨洋

A mis padres, con cariño

Junio de 2013

Este trabajo ha sido financiado por ERA-NET Pneumocystis pathoGenoMics y la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI 70/04 y PI 0391/07).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis directores y tutor de tesis sus consejos y dirección, sin cuyo apoyo y entusiasmo no habría sido posible la realización de este trabajo.

Agradezco a los miembros integrantes del grupo de epidemiología clínica y molecular, CIBER de Epidemiología y Salud Pública, Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), su inestimable ayuda durante todo el proceso de elaboración de la memoria.

Agradezco a los miembros del centro de salud de El Coronil y a su director, Alfonso Medrano, por su apoyo e inestimable colaboración.

Agradezco a la población de El Coronil por su participación.

Gracias a Gao Lin por sus consejos.

EPIDEMIOLOGÍA DE LA COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS* EN POBLACIÓN GENERAL

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Perspectiva histórica.....	11
1.2 Taxonomía.....	17
1.3 Biología	
1.3.1 Organismo.....	19
1.3.2 Microbiología.....	19
1.3.3 Genética.....	21
1.4 Ciclo de vida.....	25
1.5 Métodos de diagnóstico.....	28
1.6 Clínica y tratamiento de la neumonía por <i>Pneumocystis</i>	36
1.7 Epidemiología	41
1.7.1 Reservorio.....	41
1.7.2 Mecanismos de transmisión.....	42
1.7.3 Epidemiología de la neumonía por <i>Pneumocystis</i>	50
1.7.4 Colonización por <i>Pneumocystis</i>	54
2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	71
3. MATERIAL Y MÉTODOS	77
3.1. Ámbito y población de estudio.....	79
3.2. Diseño	82
3.2.1. Cálculo del tamaño muestral.....	82
3.2.2. Intervención.....	85
3.2.3. Seguimiento.....	87
3.3. Variables de estudio.....	89
3.4. Procesamiento y análisis de las muestras	
3.4.1. Obtención de muestras de lavado orofaríngeo y procesamiento inicial.....	92
3.4.2. Técnicas de laboratorio.....	92
3.5. Detección de <i>Pneumocystis jirovecii</i> mediante PCR anidada	93
3.6. Detección del gen DHPS mediante touchdown PCR.....	94
3.7. Caracterización genotípica de <i>P. jirovecii</i>	95
3.7.1. Secuenciación directa del gen mtLSU rRNA.....	95
3.7.2. RFLP del gen DHPS.....	97

3.8.	Algoritmo diagnóstico y criterios de interpretación de los resultados.....	99
3.9.	Controles de calidad.....	101
3.10.	Detección de <i>P. jirovecii</i> mediante PCR a tiempo real.....	102
3.11.	Variables biológicas.....	103
3.12.	Recogida y análisis de datos.....	103
3.13.	Aspectos éticos.....	105
4.	RESULTADOS	107
4.1.	Sujetos de estudio	109
4.1.1.	Sujetos incluidos.....	109
4.1.2.	Sujetos no incluidos.....	112
4.2.	Prevalencia de colonización por <i>Pneumocystis</i> en la población general.....	113
4.3.	Relación entre colonización por <i>P. jirovecii</i> y variables sociodemográficas, clínicas y biológicas.....	119
4.4.	Distribución de genotipos del patógeno y prevalencia de sujetos colonizados con mutaciones asociadas a la resistencia al cotrimoxazol.....	132
5.	DISCUSIÓN	135
5.1.	Limitaciones.....	139
5.2.	Prevalencia de colonización.....	145
5.3.	Factores asociados a la colonización.....	151
5.4.	Distribución de genotipos.....	155
5.5.	Perspectivas futuras.....	167
6.	CONCLUSIONES	169
7.	BIBLIOGRAFÍA	173
8.	ANEXOS	199

Epidemiología de la colonización por *Pneumocystis* en población general

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Perspectiva histórica

Pneumocystis jirovecii, anteriormente conocido como *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*, continúa siendo uno de los patógenos oportunistas más importantes que afectan a individuos inmunodeprimidos, tanto con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) como con otras causas de inmunodepresión. En estos individuos la infección por *P. jirovecii* produce una neumonía grave (PcP: *Pneumocystis Pneumonia* en sus siglas en inglés) con una alta tasa de morbimortalidad. Desde la primera evidencia de este microorganismo aportada por Carlos Chagas a principios del siglo pasado (Chagas, 1909), se han producido importantes avances en nuestro conocimiento sobre la epidemiología, biología y genética de este patógeno; avances que han condicionado cambios en su clasificación taxonómica y en la comprensión de la historia natural de la PcP (Calderón *et al.*, 2010).

En el momento de su descubrimiento, y después durante muchos años, *Pneumocystis* fue considerado un protozoo, aunque actualmente está aceptada su clasificación como un hongo atípico. Por otra parte, se pensaba que *Pneumocystis* era una sola especie que infectaba a todos los mamíferos y, por tanto, que la PcP en la especie humana podría ser una zoonosis, siendo el reservorio cualquiera de los mamíferos que pueden cohabitar con el hombre. Sin embargo, estudios genéticos utilizando técnicas de biología molecular pusieron de manifiesto que existían diversas especies de *Pneumocystis* con una estrecha afinidad por su huésped. Por otra parte, el desarrollo de técnicas moleculares para la identificación de *Pneumocystis* ha permitido estudiar mejor su epidemiología y poner en evidencia

que la PcP constituye sólo la punta del iceberg de la infección por *P. jirovecii* en la especie humana (Dei- Cas, 2000).

Los microorganismos actualmente denominados *Pneumocystis* fueron observados por primera vez en 1909 por Carlos Chagas (1879-1934) mientras investigaba una nueva enfermedad que estaba afectando a los trabajadores del tendido del ferrocarril en el estado brasileño de Minas Gerais. Chagas observó la presencia de numerosos quistes en los pulmones de cobayas que fallecían a los cinco días de ser inoculados con sangre procedente de pacientes infectados por un nuevo tripanosoma humano. Estos quistes fueron interpretados erróneamente como una parte del ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*, que él denominó por ello *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909). Un año después, Antonio Carini (1872-1950), director en ese momento del Instituto Pasteur de Sao Paulo, hizo una descripción de quistes con características similares en el pulmón de ratas infectadas con *Trypanosoma lewisi* (Carinii, 1910). Sin embargo, ante la posibilidad de que los quistes pertenecieran a un organismo desconocido, Carini envió muestras histológicas a su colega del Instituto Pasteur de París, Charles Louis Alphonse Laveran, uno de los parasitólogos de mayor prestigio mundial que había recibido el Premio Nobel en 1907 por sus estudios sobre paludismo.

En el Instituto Pasteur dos discípulos de Laveran, el matrimonio Delanöe, investigando en ratas de las cloacas de París que no estaban infectadas por tripanosomas, observaron quistes similares en los pulmones de estos animales. De esta forma en 1912 pudieron aclarar, revisando las publicaciones previas y las preparaciones de Carini, que esos peculiares quistes observados por Chagas y Carini correspondían en realidad a un nuevo género y especie desconocidos sin relación

con los tripanosomas. El matrimonio Delanöe sugirió para el nuevo microorganismo el nombre de *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 sus preparaciones histológicas (Delanöe & Delanöe, 1912). El matrimonio continuó sus investigaciones y realizaron numerosos experimentos, los cuales revelaron que el nuevo organismo se transmitía por vía aérea, confirmaron su tropismo por el pulmón y sugirieron su afinidad con la familia de las *Coccidia*, organismos del orden de los esporozoos.

Después de la comunicación de los resultados de su trabajo, tanto Carini (Carini & Maciel, 1914) como Chagas (Chagas, 1913) se retractaron de sus descripciones originales aportando datos que sustentaban la investigación del matrimonio francés; por su parte, Chagas tuvo que modificar su descripción inicial del ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*. En 1913, Aragao sugirió que este nuevo organismo debería colocarse dentro del género *Klossiella*, aunque reconoció su semejanza con otro protozoo encontrado en el intestino de los ratones, el *Cryptosporidium* (Aragao, 1913). Comenzaban así las dudas sobre su ubicación como protozoo.

Los pocos estudios que siguieron a estas descripciones estuvieron orientados a conocer la distribución de *Pneumocystis* en el reino animal. Su presencia en una gran variedad de mamíferos (ratas, cobayas, monos y conejos en Brasil, ratas y ratones en Gran Bretaña y ratones en Suiza) sin evidencia de enfermedad hizo cuestionar su patogenicidad (Aragao, 1913; Coles, 1915; Porter, 1915; Galli, 1917). Esto conllevó una disminución del interés científico por este microorganismo y a considerarlo como una curiosidad biológica, por lo que en las dos décadas siguientes

las publicaciones médicas sobre este tema fueron escasas y un gran silencio acompañó a este microorganismo (Calderón *et al.*, 2002).

Aunque ya en 1911, Chagas había descrito la presencia de los quistes típicos de *Pneumocystis* en la primera autopsia de un sujeto fallecido con tripanosomiasis americana (Chagas, 1911), tuvieron que pasar más de veinte años antes de que pudiera relacionarse a *Pneumocystis* con alguna enfermedad en el hombre. En 1938 Ammich y Benecke reconocieron una forma de neumonía de etiología desconocida que afectaba típicamente a niños prematuros y/o malnutridos que se denominó neumonía intersticial de células plasmáticas y que adquirió proporciones epidémicas en Europa Central en el prelude de la segunda Guerra Mundial y en los años inmediatamente posteriores (Ammich, 1938; Benecke, 1938). En pleno apogeo de la guerra, 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 prácticamente desapercibido (Van der Meer & Brug, 1942). Una década después, tres investigadores checos, Vanêk, Jírovec y Lukes relacionan de nuevo a *Pneumocystis* con esta forma de neumonía, siendo considerados frecuentemente como sus primeros descubridores (Vanêk *et al.*, 1953).

Considerada hasta ese momento como una infección infantil, no es hasta los años 60 cuando comienzan a describirse en EE.UU. los primeros casos de PcP en pacientes adultos sometidos a quimioterapia o radioterapia por procesos neoplásicos, así como sujetos con defectos congénitos de la inmunidad (Rubin & Zak, 1960). Entonces no se disponía de estudios que evaluaran el impacto real de la PcP. Sería en 1974, cuando Peter Walzer realizó el primer estudio amplio

recopilando datos de 194 casos confirmados de PcP. Esta investigación arrojó que la malnutrición era un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad y demostró además que la enfermedad podía presentarse en los pacientes con leucemias, linfomas, tumores sólidos y trasplantados, lo que abrió las puertas a la investigación en esos grupos poblacionales (Walzer *et al.*, 1974).

Los años entre 1970 y 1980 fueron muy importantes en el estudio de *Pneumocystis*, ya que unido al conocimiento alcanzado mediante la microscopía electrónica y los métodos de tinción existentes (plata metenamina de Gomori y Giemsa) (Murphy *et al.*, 1977), aparecieron los primeros estudios con anticuerpos aislados de sueros de ratas. Los resultados fueron realmente sorprendentes, pues los anticuerpos procedentes de los sueros de ratas no reaccionaban con *Pneumocystis* obtenidos de humanos, pero si lo hacían con otros procedentes de ratas (Kim *et al.*, 1972). Estas diferencias inmunológicas condujeron a Frenkel en 1976, a plantear la hipótesis de que la especie de *Pneumocystis* que afectaba al hombre era diferente de la que infectaba a las ratas, a pesar de no poseer diferencias morfológicas distinguibles. El nuevo nombre propuesto sería *Pneumocystis jirovecii* en honor al científico checo Otto Jirovec, quien, como se ha comentado previamente, en 1951 relacionó al patógeno con la neumonía que aparecía en los niños prematuros y malnutridos (Frenkel, 1976).

Más tarde, en febrero de 1981, Sandra Ford, una auxiliar de farmacia de los Centros para la prevención y control de las enfermedades (CDC, siglas en inglés) de EE.UU., notó un incremento inusual de las peticiones de pentamidina para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis* que le llegaban desde Nueva York y se dio cuenta además que no correspondían a sujetos con causas conocidas de

inmunodepresión. Envío una carta a sus superiores alertándolos de estos hechos, que constituían la primera evidencia de la eclosión de la epidemia de SIDA (Calderon *et al.*, 2002). Se descubría de esa manera los primeros casos de SIDA gracias a la infección de pacientes por patógeno oportunista.

Desde ese momento y hasta la actualidad 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.

1.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica de *Pneumocystis* ha sido problemática desde su descubrimiento y ha cambiado a largo de los años. Como hemos comentado, tras su identificación y durante muchos años *Pneumocystis* fue considerado un protozoo, debido a sus características morfológicas, su resistencia a los antifúngicos clásicos y su respuesta al tratamiento con pentamidina. Sin embargo, en 1970, Vavra y Kucera sugieren, basados en sus estudios ultraestructurales, que *Pneumocystis* puede ser un hongo (Vavra & Kucera, 1970), planteando un prolongado debate sobre la naturaleza de este microorganismo que se vería esclarecido con el advenimiento de las técnicas de biología molecular.

La primera evidencia molecular de que este microorganismo es un hongo fue aportada por Edman y colaboradores. Estos investigadores encontraron que la secuencia nucleotídica del gen 16S del ARN ribosómico de *Pneumocystis* presentaba mayor similitud al de los hongos que al de los protozoos (Edman *et al.*, 1988). Estos mismos resultados fueron corroborados por Stringer y sus colegas un año más tarde (Stringer *et al.*, 1989). Además, otros genes importantes como la subunidad mayor del ARN del ribosoma mitocondrial (mt LSU rRNA, siglas en inglés) y otros siete genes contiguos mitocondriales mostraron una significativa homología con sus respectivos genes en los hongos. Otras evidencias importantes fueron identificadas, entre otras, se destaca la presencia en *Pneumocystis* de un tercer factor de elongación en la síntesis proteica, elemento necesario para realizar este proceso en los hongos, que se encuentra ausente en el resto de los organismos eucariotas. Finalmente, la timidilato sintasa y la dihidrofolato reductasa (DHFR) en

Pneumocystis son dos enzimas diferentes, mientras en los protozoos es una proteína individual con doble función (Stringer, 1996).

Las técnicas moleculares también evidenciaron que existía una gran heterogeneidad genética en *Pneumocystis*, heterogeneidad que está clara y estrictamente correlacionada con la especie del huésped (Dei-Cas *et al.*, 1998). Para reflejar estas diferencias se propuso en 1994 de forma provisional, mientras se describían o redescibían cada una de las especies del género *Pneumocystis*, un sistema trinomial que utilizaba la denominación *Pneumocystis carinii* en todos los casos seguida de “forma specialis” (f. sp.). En este sistema, el microorganismo que infecta a los humanos correspondía a *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*, mientras que *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* es una de las especies que infecta a las ratas y *Pneumocystis carinii* f. sp. *murine* la que infecta al ratón (Stringer *et al.*, 2002).

Sin embargo, ya en 1976 Frenkel había propuesto el nombre de *Pneumocystis jiroveci* para designar al patógeno que afecta al hombre. En aquel momento el organismo fue clasificado como protozoo y el nombre se encontraba en concordancia con la Nomenclatura Internacional de Códigos Zoológicos. Sin embargo, al demostrarse que *Pneumocystis* pertenecía al reino de los hongos, su nombre debía corresponder con la Nomenclatura Internacional de Códigos Botánicos (ICBN, International Code of Botanical Nomenclature), lo que condicionó que el nombre anterior se cambiara por el de *Pneumocystis jirovecii* (ICBN artículos 32.7 y 60.11), que es la denominación actualmente aceptada. La ubicación taxonómica actual de *Pneumocystis jirovecii* es en el Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Clase: Pneumocystidomycetes, Orden: Pneumocystidales y Familia: Pneumocystidaceae (Redhead *et al.*, 2006).

1.3. Biología

1.3.1. Organismo

Pneumocystis jirovecii es un hongo atípico, extracelular, ubicuo, unicelular, no cultivable y con marcado estenoxenismo. Habitualmente se encuentra confinado en los pulmones, aunque se ha demostrado su presencia en otras regiones del cuerpo. En la actualidad se han registrado casos de PcP en todos los continentes del mundo, excepto en la Antártica (Kovacs & Masur, 2009).

1.3.2. Microbiología

El principal obstáculo en el conocimiento de la biología de *Pneumocystis* radica en la incapacidad para conseguir su crecimiento continuo en medios de cultivo *in vitro* (James *et al.*, 2002). En 1979, Bartlett *et al.* consiguieron mantener el microorganismo durante un breve período de tiempo en una línea celular de mamíferos cocultivada (Bartlett *et al.*, 1979) y en 1990, Cushion *et al.* en un medio axénico de cultivo (Cushion *et al.*, 1990). Posteriormente, utilizando otra vez líneas celulares de mamíferos cocultivadas, se logró mantener la infectividad en animales experimentales durante 42 días, aunque el número de microorganismos disminuía a los diez días de cultivo (Mirovsky & Fishman, 1993). Finalmente, Merali *et al.* comunicaron el hallazgo de un método de cultivo continuo de *Pneumocystis carinii* en medio axénico (Meralli *et al.*, 1999). Sin embargo, este método no ha podido ser reproducido en otros laboratorios, quedando el cultivo de *P. jirovecii* como un reto aún pendiente de ser alcanzado (Calderón *et al.*, 2011).

Un aspecto esencial que ha ayudado a esclarecer algunas cuestiones sobre la biología de *Pneumocystis* ha sido el desarrollo de modelos animales de neumocistosis en varias especies de mamíferos. Estos modelos son de suma importancia para estudios bioquímicos, evaluaciones de fármacos y para la visualización microscópica del ciclo de vida del patógeno (Dei-Cas *et al.*, 1998). La carencia de ergosterol en la membrana es otra característica fenotípica de interés en *Pneumocystis* que lo diferencia del resto de los hongos. Este lípido es el principal esteroide en la membrana de los hongos. En cambio, *Pneumocystis* presenta colesterol, encontrado fundamentalmente en las membranas de los mamíferos. La ausencia de ergosterol explica su resistencia natural a la anfotericina B, antifúngico cuyo mecanismo de acción está íntimamente relacionado con dicho lípido (James *et al.*, 2002, Wakefield *et al.*, 1998).

En cuanto a la proteómica de *Pneumocystis*, la glicoproteína mayor de superficie o MSG (*Major Surface Glycoprotein*) es la proteína más abundante y representativa del microorganismo. Se estima que constituye las tres cuartas partes de sus proteínas totales y fue la primera proteína aislada y caracterizada de este hongo. Posee un peso molecular de 120 kDa, con un porcentaje de carbohidratos entre el 5-10%, siendo la manosa el principal componente de sus hidratos de carbono (Kaneshiro, 1994). La MSG desempeña un importante papel biológico al presentar una gran variabilidad antigénica que, probablemente, permite al patógeno evadir la respuesta inmune del huésped. Otro aspecto interesante es su relevancia en el desarrollo de técnicas diagnósticas, habiéndose obtenido antígenos recombinantes de la misma que se han utilizado para estudios seroepidemiológicos y para evaluar la respuesta serológica durante la historia natural de la infección por *Pneumocystis* (Nkinin *et al.*, 2009). Otras importantes proteínas importantes en el

patógeno son PCSTE20 y PCMAPK. Se ha demostrado que estas moléculas participan en los cambios morfológicos, ciclo sexual y en la unión del hongo a las células del epitelio alveolar (Kottom *et al.*, 2003). Asimismo, las proteínas PRT1 desempeñan también una importante función biológica relacionada con la degradación de proteínas exógenas y con los procesos de variación antigénica del microorganismo (Ambrose *et al.*, 2004). La proteína de choque térmico 70 (*hsp* 70) es otra de las más abundantes en *Pneumocystis*. Esta proteína está involucrada en procesos relacionados con el estrés, teniendo un papel esencial en el metabolismo del hongo (Cushion *et al.*, 2007).

Respecto a la genómica, habría que destacar por su implicación clínica el gen de la dihidropteroato sintetasa (DHPS). Su importancia radica en su asociación con la resistencia a las sulfamidas, fármacos de elección en el tratamiento y profilaxis de esta infección. Por otra parte, la identificación de mutaciones presentes en el gen que controla la síntesis de esta enzima resulta muy útil para estudios de epidemiología molecular de *Pneumocystis* (Stein *et al.*, 2004; Friaiza *et al.*, 2010).

1.3.3. Genética

El conocimiento del genoma de *Pneumocystis* puede esclarecer aún muchas cuestiones oscuras relacionadas con la biología de este patógeno. Sin embargo, la ausencia de crecimiento *in vitro* del microorganismo ha limitado considerablemente los estudios relacionados con su polimorfismo genético. Técnicas moleculares relativamente sencillas de llevar a cabo, como la amplificación al azar del ADN polimórfico (RAPD, siglas en inglés), no han podido emplearse debido a la ausencia de cultivo continuo del microorganismo y a la mezcla del ADN

del huésped que se produce cuando se utilizan modelos animales para la obtención del patógeno (Wakefield, 1998).

A pesar de estas dificultades, con otras técnicas como la electroforesis de campo pulsado (PFGE, siglas en inglés) se ha obtenido información importante sobre el hongo. Con esta metodología, se logró dilucidar que *Pneumocystis* tiene aproximadamente 15 cromosomas lineales con un tamaño aproximado entre los 300 Kb - 700 Kb. Se estima además, que el genoma total del microorganismo tiene aproximadamente 7,7 Mb, con una composición nucleotídica rica en contenido de A/T (60-65%), así como que las regiones codificadoras del material genético contienen uno o más intrones de tamaño corto, aproximadamente 50 pb. Las regiones terminales de los cromosomas son de especial interés ya que contienen los genes que codifican antígenos de superficie del organismo (Wakefield, 2002). Para estimar la dimensión del genoma lineal de *Pneumocystis*, una simple comparación de materiales genéticos de diferentes organismos mostró que se ubica entre el genoma de *E. coli* (4.2 Mb) y el de *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mb). La comparación de genomas resulta del máximo interés para estudiar posibles asociaciones entre el contenido de genes y la forma de vida de los microorganismos considerados. Específicamente, en el caso de *Pneumocystis*, es importante su dependencia del huésped para realizar muchas funciones vitales. Al parecer, la esencia de la cuestión, radica en que una parte sustancial del genoma de *Pneumocystis* no codifica ninguna proteína, ocupando un espacio importante (10%): los espacios intergénicos (Stringer, 1998).

Estimaciones realizadas sugieren que alrededor de 6 Mb del genoma de *Pneumocystis* pueden codificar algún tipo de proteínas. Si se considera que el

promedio de las proteínas del patógeno está alrededor de los 50 Kda, este genoma pudiera codificar unas 4000 moléculas proteicas, un número similar al comunicado para *E. coli* cuyo material genético es sustancialmente menor (Stringer & Cushion, 1998). Se han depositado muchas esperanzas en los proyectos de secuenciación del genoma de *P. carinii* (<http://pgp.cchmc.org>) y de *P. jirovecii* (Cissé, 2012; Porollo *et al*, 2012), pues ayudarán a esclarecer cuestiones muy importantes sobre la biología de estos microorganismos.

1.4. Ciclo de Vida

El ciclo de vida propuesto en la actualidad (figura 1), basado en los datos obtenidos en pulmones de animales infectados, propone la existencia de una fase sexual y otra asexual que se alternan y en la que participan formas de vida morfológicamente bien diferenciadas: trofozoitos, esporocitos y quistes (Yoshida, 1989; Dei-Cas *et al.*, 2004; de Souza & Benchimol, 2005; Thomas & Limper, 2007; Aliouat-Denis *et al.*, 2009).

Las formas tróficas o trofozoitos se corresponden con las formas vegetativas de otros hongos y son células de 2-8 μm de diámetro, mononucleares y haploides. Estas células, de forma ameboidea, poseen una pared celular delgada y electrón densa de 20-25 μm que se deforma permitiendo la emisión de proyecciones citoplasmáticas o filopodios (su número varía en función de la especie), utilizadas para adherirse a los neumocitos tipo I del pulmón del hospedador. La pared celular es flexible, frágil y rica en β -1,3-glucanos y glicoproteínas, componentes que permiten a *Pneumocystis* interactuar con las células de huésped (Dei-Cas *et al.*, 2004; de Souza & Benchimol, 2005; Thomas & Limper, 2007; Aliouat-Denis *et al.*, 2009).

De las formas de vida halladas en los pulmones de pacientes infectados o en animales de laboratorio inmunosuprimidos, los trofozoitos son los mayoritarios, comprendiendo un 90-95% de la población total, y apareciendo agregados en paquetes con aspecto de nubes. Esta imagen sugiere a los investigadores la posibilidad de que los trofozoitos puedan seguir una reproducción asexual basada en la fisión binaria, previa división mitótica del material genético, resultando dos

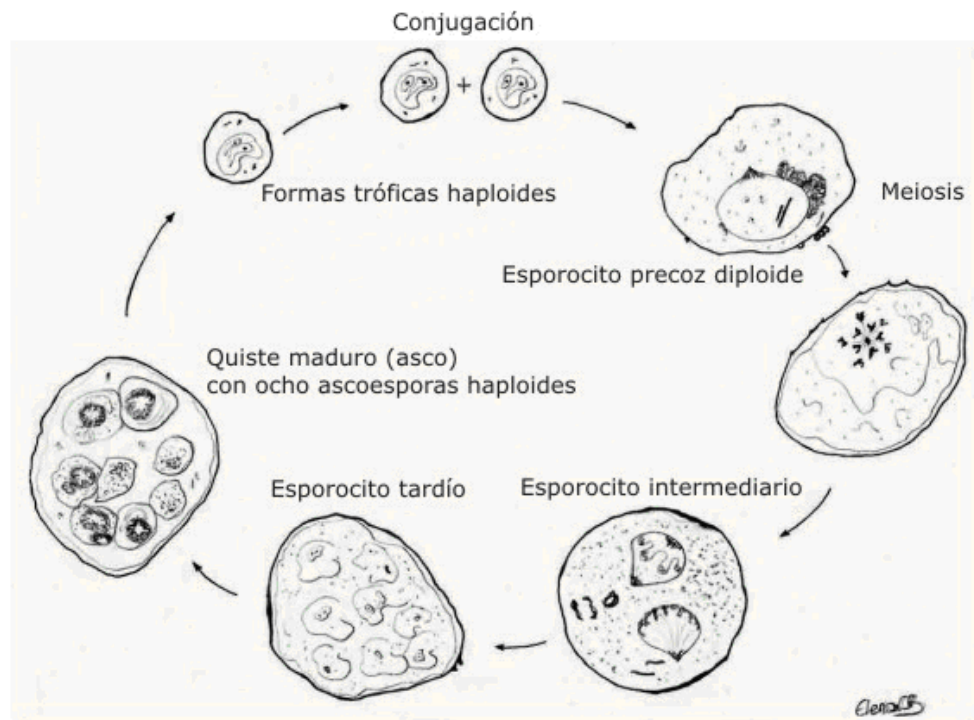
trofozoitos haploides como el progenitor (Richardson *et al.*, 1989; Cushion, 2004; de Souza & Benchimol, 2005). Sin embargo, los estudios *in vivo* sobre curvas de crecimiento del parásito, han llevado a autores como Schmatz o Aliouat a pensar que la proliferación de los trofozoitos requiere ineludiblemente el paso previo por la forma quística de *Pneumocystis* (Schmatz *et al.*, 1990; Schmatz *et al.*, 1991; Aliouat *et al.*, 1999).

El estudio del genoma de *Pneumocystis* ha permitido identificar genes homólogos a los que en otros hongos dirigen los fenómenos de conjugación, como el gen PcSte3 (homólogo a un receptor de feromonas). Esta identificación hizo pensar que los trofozoitos poseen mecanismos de reproducción sexual, mediante fusión, en la que dos de estas células se unen para formar una célula diploide, de forma ovoidal, conocida como esporocito temprano. Se piensa que el esporocito temprano entra en mitosis seguida de una meiosis para obtener finalmente ocho núcleos haploides contenidos en un esporocito tardío (Itatani, 1996; Smulian *et al.*, 2001).

Además, entre la fase de esporocito temprano y de esporocito tardío, puede distinguirse un esporocito intermedio que puede poseer entre dos y ocho núcleos. En este proceso de maduración del esporocito hasta alcanzar la forma de quiste maduro, se mantiene la morfología ovoidal, pero se producen cambios como la disminución de filopodios o la aparición y engrosamiento de una capa interna translúcida entre la pared celular electrónica densa y la membrana plasmática. Finalmente como fruto de esta maduración, la forma quística, de 4 a 7 μm de diámetro, posee una pared celular gruesa, con una superficie lisa donde escasean los filopodios y contiene ocho esporas individuales que serán liberadas para originar ocho nuevas formas tróficas. Cada espora posee una mitocondria ovoidea, un núcleo

haploide y una pared celular gruesa que recuerda a la de los trofozoitos (Dei-Cas *et al.*, 2004; de Souza & Benchimol, 2005; Thomas & Limper, 2007; Aliouat-Denis *et al.*, 2009).

Figura 1. Ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii*



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

1.5. Métodos de diagnóstico

Muestras biológicas

Debido a la imposibilidad de su cultivo, el diagnóstico de *Pneumocystis* en el laboratorio clínico viene dado por la visualización de los diferentes estadios de su ciclo de vida en muestras biológicas obtenidas de los pacientes. Se han utilizado diferentes métodos para identificar estos microorganismos en las muestras biológicas (Calderón *et al.*, 2010).

El lavado broncoalveolar (LBA) ha demostrado ser la muestra que tiene una mayor rentabilidad para el diagnóstico y actualmente es considerado el patrón oro o “gold standard” entre las muestras respiratorias (Knox & Meinke, 2009). En la práctica clínica se emplean también la biopsia transbronquial y la biopsia pulmonar. Esta última, en muchas ocasiones, sirve para confirmar la presencia de *Pneumocystis* post-mortem (Fraire *et al.*, 1996; Soeiro *et al.*, 2008). El inconveniente principal de estas muestras es que requieren técnicas invasivas para su obtención lo que ha promovido la búsqueda de otro tipo de muestras.

El esputo, ya sea espontáneo (en expectoradores crónicos, por ejemplo) o inducido, a pesar de presentar una menor sensibilidad con respecto al LBA, presenta una elevada especificidad para el diagnóstico, aportando la ventaja de no ser una prueba invasiva (del Rio C *et al.*, 1988; Silva *et al.*, 2007).

Por otra parte, en los últimos años se han comenzado a utilizar una serie de muestras biológicas no invasivas como lavados orofaríngeos, exudados nasales, así

como aspirados nasofaríngeos o endotraqueales. Estas pruebas ofrecen comodidad tanto para el paciente como para el personal que obtiene la muestra, y si bien aún no se utilizan de forma rutinaria en la clínica, han demostrado su eficacia en multitud de estudios epidemiológicos (Durand-Joly *et al.*, 2005).

De las muestras no invasivas expuestas anteriormente, cobra especial relevancia el enjuague oral o lavado orofaríngeo (LOF), debido a que su obtención es extremadamente sencilla y rápida. Esta muestra permite la aplicación de técnicas diagnósticas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polimerase Chain Reaction*, siglas en inglés) para amplificar genes de interés clínico-epidemiológico (Helweg-Larsen *et al.*, 1998) además de la monitorización de la respuesta al tratamiento frente a *Pneumocystis* (Tsolaki *et al.*, 1999).

El suero ha sido objeto de análisis en los laboratorios, y aunque tampoco se utiliza como muestra de rutina con utilidad diagnóstica, ha servido para determinar indirectamente tanto la presencia del microorganismo mediante la detección de beta-glucanos o S-adenosilmetionina, como la exposición previa al mismo identificando anticuerpos específicos (Djawe *et al.*, 2010; de Boer *et al.*, 2010).

Finalmente, *Pneumocystis* ha sido encontrado en sangre, en casos de pacientes con infección por VIH y PcP que sufren diseminación del patógeno por vía hematógica o linfática pudiéndose hallar en localizaciones extrapulmonares como hígado, bazo, nódulos linfáticos o médula ósea. No obstante, este fenómeno ocurre con una frecuencia extremadamente baja (variable según los estudios entre 0,06-2.5%) de los pacientes y es por ello que las muestras de estos tejidos no se

encuentran entre las que normalmente se usan para el estudio y diagnóstico de este microorganismo (Ng *et al.*, 1997).

Observación directa sin tinción

Como muestran los estudios de Bava *et al.*, los exudados espumosos producidos por el alveolo pulmonar de pacientes con PcP pueden ser examinados al microscopio directamente. Los lavados broncoalveolares así examinados presentan una morfología microscópica de “panal de abejas” y los resultados obtenidos comparados con los obtenidos con otras técnicas, como la tinción de Grocott o la inmunofluorescencia directa, son similares. Esta técnica presenta las ventajas de un bajo coste y sencillez operativa, no obstante requiere un especial adiestramiento por parte del observador y una cuidadosa elección de la muestra, que debe contar con una alta carga del parásito (Bava *et al.*, 2002; Bava *et al.*, 2005).

Métodos de tinción

En la literatura se han descrito varios métodos de tinción para la visualización microscópica de *Pneumocystis*. Las técnicas de tinción convencionales con hematoxilina y eosina son muy utilizadas en biopsias y autopsias, así como las especiales (plata metenamina de Grocott-Gomori, Giemsa, Azul de toluidina O, Papanicolau, Violeta crisol y Blanco de calcoflúor) para todo tipo de muestras clínicas.

La plata metanamina de Grocott-Gomori tiñe de color oscuro la pared de los quistes de *Pneumocystis* y permite la cuantificación del patógeno en la muestra.

Esta técnica se considera de referencia para la identificación de *P. jirovecii* en los LBA. 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, en humanos su utilización esta poco extendida.

El azul de toluidina por su parte, colorea de violeta rojizo los componentes de la pared y los investigadores la han empleado como técnica de cribado en los laboratorios al resultar más rápida que la plata metenamina.

La técnica de giemsa permite identificar tanto los quistes como los trofozoitos, coloreando los núcleos de ambas formas de color rosado, contrastando con el azul que adquiere el citoplasma (Calderón *et al.*, 2010; Thomas & Limper, 2004; Huang, 2005).

La prueba de Papanicolau es una técnica muy empleada por los citohistopatólogos, que puede generar información importante para detectar *Pneumocystis*. Sun *et al.* demostraron la efectividad del método al detectar ocho muestras positivas entre 13 casos confirmados de PcP (Sun *et al.*, 1986). No obstante, debe prestarse especial atención cuando esta metodología es utilizada en muestras donde la carga parasitaria es baja.

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, pues une el blanco de calcoflúor con 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 (Monheit *et al.*, 1986).

Procop y colaboradores compararon cuatro métodos de tinción para detectar *P. jirovecii* en muestras respiratorias, mostrando que el blanco de calcoflúor y la plata metenamina tenían valores predictivos positivos y negativos mayores del 90%; estos parámetros son suficientes para justificar su uso como métodos de rutina en los laboratorios clínicos (Procop *et al.*, 2004).

Inmunofluorescencia directa (ID)

Esta técnica utiliza anticuerpos monoclonales específicos contra determinantes antigénicos de la pared de los quistes y trofozoitos de *P. jirovecii*. Tiene una sensibilidad cercana al 100% y una especificidad de alrededor del 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 (Cregan *et al.*, 1990). Halford *et al.*, compararon la técnica de inmunofluorescencia directa (ID) con la tinción de plata metenamina en 384 muestras de esputo encontrando *P. jirovecii* en 31 de las muestras analizadas por la primera técnica y sólo 24 en las analizadas por la segunda (Halford *et al.*, 1994).

Hay que señalar que la técnica de ID es más cara y consume más tiempo que las técnicas de tinción convencionales. Además, pueden existir reacciones cruzadas de antígenos de *Pneumocystis* con antígenos de *Aspergillus sp.* En este sentido, publicaciones recientes constatan un alto porcentaje de falsos positivos con esta

metodología (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 ID, pues se han encontrado casos de reacciones cruzadas (Silletti *et al.*, 1996). De especial interés resulta el hecho de la detección de quistes vacíos por ID, los cuales pueden persistir en el tejido pulmonar por espacio de cuatro a seis semanas después de un tratamiento efectivo (Armbruster *et al.*, 1995). Finalmente, la ID ha sido utilizada en la detección de *P. jirovecii* en personas inmunocompetentes con infecciones pulmonares crónicas, pero resulta menos sensible que las técnicas moleculares en este tipo de pacientes (Medrano *et al.*, 2005; Vidal *et al.*, 2006).

Métodos moleculares basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La poca sensibilidad de las técnicas de tinción en muestras obtenidas de forma no invasiva y su menor sensibilidad en situaciones con poca carga parasitaria, así como el elevado coste de la inmunofluorescencia directa han obligado a desarrollar nuevas alternativas para el diagnóstico de *P. jirovecii* (Roberts *et al.*, 2007). Los métodos moleculares basados en la PCR, son una opción fiable y eficaz para los laboratorios con acceso a estas técnicas. Diferentes estudios publicados demuestran que la PCR es más sensible y específica que los métodos de tinción (Tuncer *et al.*, 1998; Pinlaor *et al.*, 2004; Rohner *et al.*, 2009).

La primera evidencia del empleo de métodos moleculares para la detección de *P. jirovecii* en muestras clínicas fue aportada por Wakefield *et al.* en 1990 (Wakefield *et al.*, 1990). Desde entonces y hasta la actualidad 14 genes del patógeno se han utilizado con fines diagnósticos y para estudios de genotipaje (Ripamonti *et*

al., 2009). En el año 2007, Robberts y colaboradores evaluaron 9 métodos moleculares en diferentes muestras clínicas provenientes de pacientes sudafricanos (Roberts *et al.*, 2007). En este estudio, la PCR anidada que emplea el gen mt LSU rRNA como diana, mostró la mayor sensibilidad para detectar *P. jirovecii*. Varios autores coinciden en señalar su elevada sensibilidad y especificidad y sugieren que el gen mt LSU rRNA puede emplearse como diana atractiva para fines diagnósticos, de epidemiología molecular y seguimiento de la terapia aplicada a los pacientes (Wakefield *et al.*, 2003; Montes-Cano *et al.*, 2004; de la Horra *et al.*, 2006). Sin embargo, es conocido que los métodos que utilizan la PCR anidada brindan una proporción apreciable de resultados falsos positivos y están sujetos a un mayor riesgo de contaminación que métodos que emplean la PCR simple (Wakefield *et al.*, 2003).

Por otra parte, se han evaluado otros genes del patógeno, obteniéndose resultados interesantes. Por ejemplo, Miller y Wakefield observaron una asociación entre la gravedad de la PcP y el genotipo encontrado en los microorganismos aislados al estudiar la región transcripta de los espacios intergénicos del operón del ARNr (ITS, internal transcribed spacer) (Miller & Wakefield, 1999). También, se ha comunicado la ausencia de genotipos específicos de la región ITS (como el A_{2c1}) en pacientes colonizados por *P. jirovecii* (Totet *et al.*, 2004b). Recientemente, Esteves y colaboradores demostraron que la presencia de citosina en la posición 85 del gen mt LSU rRNA se asociaba con una evolución favorable de la PcP (Esteves *et al.*, 2010). Por otra parte, mutaciones en el gen que codifica para la DHPS pueden indicar posible resistencia a las sulfamidas. Resultados sumamente útiles si consideramos que las pruebas de susceptibilidad frente a fármacos no se encuentran disponibles para el patógeno por la carencia del cultivo microbiológico (Stein *et al.*, 2004).

Otros estudios han evaluado la posibilidad de amplificar ADN del microorganismo en otras muestras clínicas obtenidas por métodos no invasivos para el paciente. Trabajados publicados, reflejan resultados aceptables para el diagnóstico de la infección por *P. jirovecii* al emplear muestras de esputo obtenidas tras expectoración espontánea, lavados orofaríngeos y exudados nasofaríngeos utilizando métodos basados en la PCR (Wakefield *et al.*, 1993; Nevez *et al.*, 2001; Aderaye *et al.*, 2008). Investigadores franceses describen una sensibilidad del 100% y una especificidad del 90% utilizando la amplificación mediante PCR del gen mt LSU rRNA en muestras de lavados orofaríngeos (Durand-Joly *et al.*, 2005).

Recientemente la utilización de la PCR a tiempo real en muestras clínicas y tejidos facilita la obtención de un resultado más rápido, en menos de tres horas, reduciendo asimismo la posibilidad de contaminación en las muestras. Además, esta metodología posibilita cuantificar la carga del patógeno, lo que podría servir para identificar el estado de colonización en los pacientes con baja carga parasitaria (Flori *et al.*, 2004). No obstante, hay que tener presente que un resultado positivo para *P. jirovecii* por PCR sólo indica presencia de ADN de dicho germen, no indicando infección, ni viabilidad del patógeno en la muestra analizada. Para resolver esta dificultad, se han descritos métodos basados en la amplificación del ARN mensajero del microorganismo con una sensibilidad del 100% y una especificidad del 86% (de Oliveira *et al.*, 2007).

1.6. Clínica y tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis*

Formas de presentación

La PcP puede resultar difícil de identificar y un verdadero reto si se pretende su diagnóstico sólo atendiendo a la clínica del paciente, pues diferentes infecciones comparten signos y síntomas similares a esta enfermedad (Kovacs & Masur, 2009). Clásicamente se han diferenciado cuatro formas clínicas de infección por *Pneumocystis* atendiendo a la edad y a la enfermedad de base responsable de la inmunodepresión: asintomática, infantil o neumonía intersticial de células plasmáticas, neumonitis esporádica de niños y adultos inmunocomprometidos e infección extrapulmonar, a las que actualmente habría que añadir la PcP asociada al síndrome de reconstitución inmune (Dei-Cas *et al.*, 2005; Calderon *et al.*, 2010).

Síntomas y signos

Clásicamente la PcP se presenta con fiebre, tos y disnea de esfuerzo. La tos normalmente es seca y no productiva. La disnea al inicio es a esfuerzo moderado, por lo que puede pasar desapercibida y progresar gradualmente. La fatigabilidad es una de las principales quejas en los pacientes con PcP, mientras que el dolor torácico, los escalofríos y la sudoración nocturna son menos frecuentes. Aunque con menor frecuencia, también se ha descrito la presencia de hemoptisis en los pacientes aquejados por esta infección. Por otra parte, la exploración clínica puede mostrar taquicardia, cianosis y crepitantes finos en la auscultación de los afectados (Thomas & Limper, 2004; Huang *et al.*, 2006).

La presentación clínica de la PcP difiere en sus características entre pacientes con infección VIH de aquellos inmucomprometidos por otras razones (Russian & Levine, 2001; Barry & Johnson, 2001). Globalmente los pacientes con infección VIH presentan un curso subagudo con síntomas más prolongados de la infección, que incluyen típicamente el establecimiento de tos seca y disnea con o sin fiebre de una a dos semanas de evolución. En el examen físico puede apreciarse taquipnea, taquicardia y ocasionalmente cianosis, pero la auscultación torácica generalmente es normal, presentándose en ocasiones algunos sibilantes. La presencia de hipoxemia desencadenada con el ejercicio es otro elemento presente en este tipo de sujetos. Hasta un 27% de los pacientes con infección VIH que desarrollan PcP pueden presentar una insuficiencia respiratoria que requiera ventilación mecánica (Huang, 2005).

En cambio, en pacientes sin infección VIH, la enfermedad tiene un comienzo más rápido con menor duración y mayor gravedad, caracterizada frecuentemente por una marcada hipoxemia (Rodríguez & Fishman, 2004). Un ejemplo interesante lo constituyen los pacientes trasplantados, en los cuales la infección se presenta a menudo con un cuadro clínico fulminante consistente en fiebre, tos, disnea e insuficiencia respiratoria. En la población de pacientes con trasplante pulmonar los síntomas pueden estar ausentes debido a la denervación del pulmón trasplantado. Diferentes estudios han señalado que en pacientes con inmunodepresión secundaria al tratamiento de enfermedades neoplásicas o trasplantes, la PcP tiene una presentación subaguda, de más de 24 horas y menos de una semana, aunque en trasplantados de órganos sólidos la PcP puede ocurrir también con un curso crónico (Collin & Ramphal, 1998; Sepkowitz, 2002).

Radiografía de tórax

La radiografía (Rx) de tórax es muy útil ante la sospecha de una PcP en un paciente con infección por VIH cuando muestra el patrón típico de infiltrado pulmonar intersticial difuso bilateral (Vidal *et al.*, 2006). Sin embargo, las imágenes atípicas (infiltrados unilaterales o localizados, lesiones nodulares o cavitarias) no son raras en estos pacientes. En algunos casos, entre el 10-39%, la Rx de tórax puede no mostrar alteraciones, asociándose esta característica a un mejor pronóstico de la enfermedad (Opravil *et al.*, 1994). Por otra parte, es menos frecuente que aparezcan consolidaciones de un lóbulo o segmento, nódulos o cavitaciones y muy rara la presencia de adenopatías y afectación pleural. Un patrón granulomatoso apical similar a la tuberculosis puede existir y se ha asociado a la profilaxis con la pentaminida (Jasmer *et al.*, 2000). Además, la PcP puede producir otros patrones radiológicos tales como neumotórax o infiltrado nodular (Baughman& Liming, 1998; Tansuphasawadikul *et al.*, 1999).

Tomografía axial computarizada (TAC)

La tomografía axial computarizada (TAC) de alta resolución, es más sensible que la radiografía de tórax para el diagnóstico de la PcP, con el hallazgo típico de opacidades en vidrio deslustrado, bilaterales, que suelen aparecer acompañadas de múltiples pneumatoceles. Aunque no son específicas, la ausencia de opacidades va en contra del diagnóstico de PcP. Algunos autores plantean que los hallazgos encontrados en una TAC de tórax de alta resolución en pacientes con clínica sugestiva de PcP son suficientes como para obviar procedimientos invasivos como la

broncoscopia, aunque muchos otros clínicos prefieren la identificación del organismo en las muestras clínicas (Barry & Johnson, 2001; Huang, 2005)

Otras técnicas de imagen han demostrado ser útiles en pacientes con sospecha de PcP y una radiografía de tórax normal. El empleo de tecnecio-99-dietilenetriamina penta-acetato (99mTcDPTA), y la gammagrafía con galio-67 al igual que la resonancia magnética nuclear pueden ayudar en el diagnóstico, siendo más sensible y específico el uso de 99mTcDPTA (Varthalitis *et al.*, 1993).

P. jirovecii puede diseminarse desde el pulmón a otros órganos induciendo lesiones secundarias viscerales. Las lesiones pulmonares pueden ser indetectables cuando las localizaciones extrapulmonares son diagnosticadas, como ocurre en la histoplasmosis diseminada y en otras micosis respiratorias causadas por hongos dimorfos. Los órganos afectados con más frecuencia son los ganglios linfáticos, bazo, hígado, corazón y médula ósea, aunque este patógeno se ha encontrado también en cerebro, páncreas, timo, tiroides, retina, coroides, oído externo y medio, apéndice, piel y otros órganos. Las lesiones extrapulmonares son en general nodulares, evolucionando hacia la necrosis y la calcificación, pudiendo evidenciarse en algunos casos mediante TAC. Entre un 2 y un 3% de los pacientes con infección VIH y PcP podrían desarrollar esta forma clínica que, por otra parte, resulta excepcional en pacientes sin infección VIH donde sólo se ha encontrado en estudios *post mortem* (Ng *et al.*, 1997; Telzak *et al.*, 1990).

Tratamiento y profilaxis

Desde hace años, por su alta eficacia y disponibilidad en forma oral e intravenosa, la asociación a dosis fijas de trimetoprim y sulfametoxazol (cotrimoxazol) 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.*, 2010). Sin embargo, las reacciones adversas, que habitualmente ocurren durante la segunda semana de tratamiento, son frecuentes, sobre todo en pacientes con infección VIH, y pueden obligar a cambiar la medicación, así como en casos de alergia a las sulfamidas. Por otra parte, en estos últimos años se han detectado mutaciones del gen de la DHPS homólogas de las que en otros microorganismos inducen resistencia a las sulfamidas. En *P. jirovecii* estas mutaciones están aparentemente asociadas al uso previo de sulfamidas y podrían indicar también la presencia de fenotipos del parásito resistentes a las mismas (Stein *et al.*, 2004).

Existen alternativas al cotrimoxazol 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 (Calderón *et al.*, 2010).

1.7. Epidemiología

1.7.1. Reservorio

El ADN de *Pneumocystis* ha sido detectado en muestras ambientales pero nunca se ha podido visualizar la presencia de organismos completos con técnicas microscópicas. Se ha comunicado la existencia de ADN de *Pneumocystis* en muestras de agua de charcas y en el aire circundante en huertos, incluso en muestras obtenidas en habitaciones de pacientes con PcP, suponiéndose su capacidad infectiva. Sin embargo, los modelos animales han aportado información que parecen descartar el agua o los alimentos contaminados por el parásito como el posible origen de la infección. En un estudio con ratas libres de patógenos a las que se les realizó un tratamiento inmunosupresor con dexametasona durante tres meses y posteriormente se expusieron de forma selectiva a aire, agua y comida contaminada con el patógeno, sólo las ratas estabuladas en jaulas sin filtros y, por tanto, expuestas al aire ambiental desarrollaron PcP (Hughes, 1982). Por tanto, hasta el momento actual no se ha identificado ningún reservorio ambiental, aunque esta posibilidad no puede ser definitivamente excluida (Wakefield, 1996; Bartlett & Lee, 2010).

El contacto con animales portadores de *Pneumocystis* también podría ser una posible fuente de infección. Sin embargo, la gran divergencia genética encontrada en las diferentes especies animales y experimentos de infección cruzada, demuestran que la especie de *Pneumocystis* que infecta a un mamífero no es transmisible a mamíferos de otras especies, descartando la posibilidad de que la PcP tenga un origen zoonótico (Aliouat *et al.*, 1994).

En este sentido, inicialmente se postuló que existía una sola especie de *Pneumocystis* que infectaba a todos los mamíferos. Con esta idea, se creía que la PcP en la especie humana podría ser una zoonosis, siendo el reservorio cualquiera de los mamíferos con los que el humano puede cohabitar de forma habitual. Sin

embargo, el estudio comparativo del material genético de *Pneumocystis* obtenido de diferentes mamíferos ha demostrado que existen especies distintas de *Pneumocystis* según el animal estudiado. Trabajos posteriores realizados con modelos animales han demostrado que no se producen infecciones cruzadas entre diferentes especies de mamíferos (Dei-Cas *et al.*, 1998). Esta alta especificidad entre el huésped y el microorganismo que lo infecta es lo que se denomina estenoxenismo. Por tanto, actualmente se acepta que la PcP en el hombre es un antroponosis, donde el único reservorio es el ser humano (Wissman *et al.*, 2010; Calderón *et al.*, 2011).

Recientemente, se ha descrito el fenómeno de la colonización por el patógeno en individuos de diferentes grupos poblacionales. A pesar de que su significado clínico no está totalmente esclarecido, este hallazgo tiene una gran importancia en la epidemiología de *Pneumocystis* (Calderón *et al.*, 2011; Morris & Norris, 2012). En primera instancia, los individuos que están colonizados pueden estar en riesgo de desarrollar la enfermedad. Por otra parte, estos individuos pueden actuar como reservorio del microorganismo y ser potencialmente transmisores del patógeno a sujetos susceptibles. Además, en pacientes colonizados por *P. jirovecii* la utilización prolongada de quimioprofilaxis puede seleccionar cepas de este patógeno con mutaciones que han sido asociadas con la resistencia a los fármacos de elección para su tratamiento (Calderón *et al.*, 2010).

Por consiguiente y en el momento actual, la fuente de infección comúnmente aceptada para este patógeno son los individuos con PcP o colonizados por *Pneumocystis* que podrían transmitir por vía aérea la infección a otras personas, tanto inmunodeprimidas como inmunocompetentes (Bartlett & Lee, 2010).

1.7.2. Mecanismo de transmisión

El modo de adquisición de *P. jirovecii* constituye un aspecto interesante y no menos debatido en la epidemiología del microorganismo a lo largo de varias décadas. Dos hipótesis fundamentales se han planteado: la reactivación de un foco

latente del microorganismo en el cuerpo humano o la adquisición *de novo* de la infección (Nevez *et al.*, 2008). En la actualidad, y gracias a las evidencias de los estudios moleculares, la mayoría de los autores abogan más por la hipótesis de la adquisición reciente que por la reactivación de una infección latente.

Hasta hace muy pocos años se pensaba que la adquisición de la infección se producía en los primeros años de la vida. Posteriormente, en situaciones de inmunodepresión del huésped, se producía una reactivación de organismos latentes presentes en el tejido pulmonar en estrecha asociación con los neumocitos tipo I, produciendo los episodios posteriores de infección (Herrag *et al.*, 2010).

Diferentes hallazgos apoyaban esta primera hipótesis. En primer lugar, la elevada seroprevalencia frente a *Pneumocystis* observada durante los primeros años de vida (Wakefield *et al.*, 1990b; Vargas *et al.*, 2001; Respaldiza *et al.*, 2004). Por otro lado, la existencia de *Pneumocystis* en los pulmones de mamíferos sanos e inmunocompetentes (Frenkel *et al.*, 1966) y la ausencia de cultivos continuos en los que el parásito pueda crecer *in vitro*, fenómeno que permite argumentar que la vida del parásito fuera de pulmón del huésped es imposible o sumamente breve. (Stringer & Walzer, 1996). Por último, esta hipótesis también se apoya en los trabajos que han conseguido que animales de laboratorios sanos y aparentemente libres del patógeno desarrollen una PcP cuando se les induce un estado de inmunosupresión en un ambiente estéril, lo que induce a pensar que el microorganismo ya se encontraba en el pulmón antes del experimento (Walzer *et al.*, 1979).

Todos estos argumentos apoyan la hipótesis de que el parásito se halla en los pulmones de sus hospedadores prácticamente desde que nacen. Este íntimo contacto entre ambos organismos ha podido permitir a lo largo del tiempo una co-evolución conjunta que justifique el gran estenoxenismo existente entre la especie de *Pneumocystis* y la especie del mamífero al que infecta (Bottaro, 1999).

En contraposición a la hipótesis de la reactivación, múltiples estudios apoyan la idea más reciente de que la infección es consecuencia de una adquisición *de novo* por vía aérea. Según esta hipótesis, que es la que actualmente tiene una mayor aceptación, la adquisición del microorganismo puede ocurrir una o varias veces en cualquier momento de la vida, aunque no siempre es capaz de desencadenar el desarrollo de una neumonía (Hughes, 1998). Los datos en los que se sustenta esta hipótesis, provienen tanto de la experimentación animal como de la observación clínica.

En modelos animales ha sido imposible detectar la presencia del patógeno en roedores de laboratorio a los que se les indujo una PcP tras su recuperación con tratamiento o reconstitución inmune (Chen *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 1995). En humanos, se ha comprobado que el microorganismo desaparece del árbol respiratorio en el 75% de los casos antes del año tras el desarrollo de una PcP. (O'Donnell *et al.*, 1998). Por otro lado, se han descrito brotes de PcP en pacientes expuestos a la misma fuente ambiental, familiar u hospitalaria (Chusid & Heyrman, 1978; Hennequin *et al.*, 1995), y se ha demostrado que los brotes recurrentes de PcP en pacientes con infección VIH están ocasionados por genotipos diferentes del patógeno (Keely & Stringer, 1996b). No obstante, este último hallazgo no constituye una prueba definitiva de la infección *de novo*, puesto que es posible la coexistencia en el mismo huésped de varias cepas del microorganismo (Keerly *et al.*, 1995). En un estudio realizado en Estados Unidos en pacientes con PcP de varias ciudades estadounidenses, se observó una variación geográfica en los genotipos de *P. jirovecii*. Estos investigadores demostraron que el genotipo presente en el momento del diagnóstico del paciente se relacionaba con el lugar de residencia actual y no con su lugar de nacimiento. Si el modo de desarrollar la enfermedad hubiese sido una reactivación de una infección latente, el genotipo presente en el individuo coincidiría con el existente en su lugar de nacimiento (Beard *et al.*, 2000). Se han publicado otros hallazgos importantes que corroboran esta hipótesis y parecen descartar la teoría de la reactivación de una infección latente. Así, se han comunicado múltiples brotes nosocomiales de PcP en diferentes regiones que estaban causados por cepas de *P. jirovecii* del mismo genotipo (de Boer *et al.*, 2007; Hauser *et al.*, 2010).

A su vez, mutaciones en el gen que codifica la DHPS, enzima diana de las sulfamidas utilizadas para la profilaxis y el tratamiento de la PcP, se han encontrado en pacientes que nunca habían sido expuestos a estos fármacos, lo que sugiere una adquisición reciente de la infección desde otros individuos que sí habían sido sometidos a la presión selectiva derivada del tratamiento con este tipo de antibiótico (Huang *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2010).

Por otra parte, la elevada seroprevalencia indica una alta tasa de exposición al microorganismo que en muchos casos no se correlaciona con la tasa de colonización observada mediante pruebas de biología molecular (Bottaro, 1999). Todo esto lleva a pensar que la latencia del patógeno es limitada.

En el caso de *Pneumocystis* se ha propuesto un modelo de transmisión similar al de *Mycobacterium tuberculosis*. Así, se plantea la vía aérea como modo de transmisión, considerando que las formas tróficas del parásito, con un tamaño de 2-4 μm similar al bacilo tuberculoso (1-3 μm), pueden ser expectoradas por el paciente infectado y transmitirse mediante gotitas de Pflugge a los sujetos susceptibles (Ng *et al.*, 1997). Desde que esta teoría fue postulada (Ng *et al.*, 1997), se ha debatido mucho sobre la cuestión del período de incubación de la infección por *Pneumocystis*. Varios estudios sugieren que el mismo pudiera estar comprendido entre las tres y 12 semanas, lo cual coincide con los experimentos desarrollados en animales de experimentación (Boylan & Current, 1992; Powles *et al.*, 1992; Manoloff *et al.*, 2003).

El modo exacto de transmisión de un individuo a otro no ha sido totalmente esclarecido y la forma infectiva del parásito aún no ha sido identificada. La posibilidad de que la transmisión entre dos individuos de la misma especie se produzca por vía aérea está reforzada por diversos experimentos en modelos animales de roedores inmunosuprimidos (Durand-Jolly *et al.*, 2002), así como por la detección de ADN y ARN mensajero de *Pneumocystis* en aire ambiente, lo que sugiere que el patógeno se halla en el aire de forma viable (Olsson *et al.*, 1998;

Maher *et al.*, 2002; Bartlett *et al.*, 1997). Se ha comprobado que es suficiente sólo un día de exposición para que ratones inmunocompetentes adquieran la infección por vía aérea desde ratones SCID con PcP (Dumoulin *et al.*, 2000).

Por otra parte, estudios de microscopia electrónica de transmisión demuestran que los quistes maduros de pared fina, parecen estar mejor dotados para retener la capacidad infectiva durante la transmisión aérea entre individuos (Calderon *et al.*, 2011). Otros estudios sugieren, que los quistes maduros presentes en el lumen bronquial podrían alcanzar el medio ambiente y transmitirse a otros huéspedes susceptibles (Matsumoto & Yoshida, 1994).

Adicionalmente, la transmisión interindividual de *P. jirovecii* desde pacientes hospitalizados con PcP se ha constatado en diferentes estudios que incluían una amplia gama de ubicaciones: unidades pediátricas, salas de enfermedades infecciosas, unidades de cuidados intensivos, unidades de trasplantes o salas de oncología (Nevez *et al.*, 2008).

De hecho, la posibilidad de que *Pneumocystis* pudiera ser transmitida de persona a persona surge tras la comunicación de diferentes brotes de PcP entre pacientes sometidos a trasplantes de órganos sólidos y en pacientes oncológicos (Chaves *et al.*, 1991; Vrathalitis *et al.*, 1993), hallazgos que hicieron plantear la hipótesis de una transmisión nosocomial del patógeno.

Entre los estudios más recientes, habría que destacar la descripción de un brote de PcP en los pacientes con trasplante renal que acudieron a consultas externas de un centro médico entre marzo de 2005 y febrero del 2006 (de Boer *et al.*, 2007). Hubo 22 casos confirmados de PcP entre los transplantados renales y ninguno en los transplantados hepáticos que utilizaron las mismas instalaciones. Los datos clínicos y los resultados en el genotipado fueron más compatibles con una transmisión interhumana que con una fuente ambiental común de infección. En el año 2008, también se publicó un brote de 16 personas con trasplantes renales infectadas por *P. jirovecii* (Schmoldt *et al.*, 2008). Los datos epidemiológicos y los

resultados del genotipado sugerían también una transmisión nosocomial paciente a paciente.

En otro estudio realizado en una clínica de consultas externas de nefrología se notificó un inesperado aumento en la incidencia de PcP (Gianella *et al.*, 2009). En total, fueron recogidos los datos de 20 pacientes consecutivos con trasplante renal y con diagnóstico confirmado de PcP, entre julio de 2006 y febrero de 2008. En la investigación epidemiológica, de los 20 pacientes con PcP, 19 habían tenido una visita concomitante con otro paciente con PcP en una zona de espera común.

En el estudio de un brote de PcP en trasplantados renales en un hospital francés durante los años 2008 a 2010, se observó que el genotipo de la región ITS más frecuente encontrado en los 18 pacientes fue diferente al de los otros dos grupos controles de pacientes con PcP o colonizados por *Pneumocystis* (Le Gal *et al.*, 2012b).

Finalmente, se identificó una misma cepa de *Pneumocystis* como agente causante de brotes de neumonía en pacientes trasplantados de dos países diferentes de Europa (Suiza con siete pacientes y Alemania con 14) La cepa fue diferente a la que produjo un brote de neumonía en Japón, así como de casos esporádicos de PcP en pacientes no trasplantados con y sin infección por VIH (Sassi *et al.*, 2012).

Por otra parte, la detección de fragmentos de ADN de *Pneumocystis* en muestras ambientales obtenidas a través de filtros de aire procedentes de habitaciones de hospitales ocupadas por pacientes con PcP (Gianella *et al.*, 2009), apoya fuertemente la hipótesis de la transmisión aérea en el ámbito hospitalario. El hallazgo de ARNm de *Pneumocystis* en estos dispositivos (Olsson *et al.*, 1998), sugiere además que el patógeno es viable en el aire ambiente hospitalario (Maher *et al.*, 2002).

Entre las hipotéticas fuentes de infección en el entorno hospitalario podrían considerarse los pacientes inmunodeprimidos con PcP, los pacientes hospitalizados colonizados (fundamentalmente aquellos con neumopatías) y los profesionales sanitarios portadores subclínicos de la infección. En pacientes con neumonía por

Pneumocystis que han recibido tratamiento específico se sabe que la persistencia de la infección pulmonar es un fenómeno limitado en el tiempo, cuya duración depende de la capacidad de restauración de la función inmune (Dei-Cas, 2000). En cuanto a los pacientes con enfermedades pulmonares crónicas los estudios revisados previamente demuestran la existencia de elevadas tasas de colonización por el patógeno, sugiriendo que este grupo podría constituir un importante reservorio y fuente de infección del patógeno (Calderon 2011).

Por otra parte, los sujetos inmunocompetentes sin neumopatías colonizados por el patógeno, podrían representar otra fuente potencial de infección. Existen algunas evidencias que apoyan esta hipótesis. En primer lugar, la demostración de una elevada tasa de colonización por *Pneumocystis* (20%) en población general sana (Medrano *et al.*, 2005). En segundo lugar la demostración experimental de la transmisión aérea de *Pneumocystis* murina desde ratones Balb/c inmunocompetentes colonizados a ratones inmunocompetentes y a ratones SCID inmunodeprimidos (Durand-Joly *et al.*, 2002). Finalmente, un trabajo de nuestro grupo que observó la posible transmisión de *P. jirovecii* desde adultos inmunocompetentes a infantes en el ámbito familiar (Rivero *et al.*, 2008). Sin embargo, esta transmisión intrafamiliar no fue observada en otro estudio amplio en el que se evaluaron familias de 44 adultos y 60 niños con infección por VIH (Spencer *et al.*, 2008).

En cuanto al personal sanitario, la información disponible hasta la fecha es escasa. Un primer estudio publicado en 1993 mostró que el personal sanitario que atiende a pacientes con infección por VIH presenta una mayor título de anticuerpos específicos frente a *Pneumocystis* que los sujetos controles de otras áreas (Leigh *et al.*, 1993b). Dos estudios publicados poco tiempo después, en los que se emplearon técnicas serológicas y de diagnóstico molecular para estudiar un pequeño número de trabajadores sanitarios (Ludgren *et al.*, 1997, Lidman *et al.*, 1997), mostraron resultados discrepantes con los hallazgos iniciales, ya que el patógeno no fue detectado en muestras respiratorias de ninguno de los profesionales evaluados, y la presencia de anticuerpos específicos en el primer estudio fue igual de frecuente en el grupo expuesto y no expuesto a pacientes con PcP (Ludgren *et al.*, 1997), pudiendo

ser detectada sólo en dos de los 26 sanitarios evaluados en el segundo estudio (Lidman *et al.*, 1997).

Posteriormente dos trabajos en los que se utilizaron muestras de frotis nasal (Vargas *et al.*, 2000) y aspirado nasal o esputo inducido (Miller *et al.*, 2001) demostraron que el personal sanitario en contacto con pacientes con PcP puede sufrir una colonización transitoria por el microorganismo. En otro estudio en el que se evaluaron muestras de enjuagues orofaríngeos de 164 profesionales sanitarios de tres áreas diferentes de un hospital (Durand-Joly *et al.*, 2003), se encontró una prevalencia de colonización del 8% entre los trabajadores de una Unidad de Hematología de adultos (con una elevada proporción de pacientes inmunodeprimidos) y de un Servicio de Urgencias Pediátricas, aunque ninguno de los 35 profesionales de un tercer área de hospitalización en el que se atendían adultos inmunocompetentes estaba colonizado. Más recientemente, un análisis serológico (Tipirneni *et al.*, 2009) del personal clínico (103 personas) y no clínico (23 personas) del hospital general de San Francisco, mostró una asociación significativa entre la exposición ocupacional de los trabajadores sanitarios clínicos y las respuesta inmune a *P. jirovecii*.

Por otra parte, en los últimos años se han acumulado algunas evidencias que apoyan la idea de que la vía transplacentaria podría ser un mecanismo adicional de adquisición de la infección. La eficiencia de este mecanismo de transmisión podría ser diferente en cada especie, ya que depende de las características anatómicas de la placenta cuya variabilidad es importante en las distintas especies de mamíferos (Sanchez *et al.*, 2007). En este sentido, la transmisión transplacentaria ha sido demostrada en el conejo, sobre todo en situaciones de multiparidad (Sánchez *et al.*, 2007; Cere *et al.*, 1997), no habiendo sido observada en ratas o ratones con inmunodeficiencia combinada severa (Dei-Cas, 2000). Los estudios realizados en el hombre para dilucidar este fenómeno son escasos y poco concluyentes (Mortier *et al.*, 1995). Antes de la epidemia SIDA se había sugerido esta hipótesis en neonatos con neumonía (Ollson *et al.*, 2001). En 1995 se publicó un controvertido caso de infección por *Pneumocystis* en el feto de una madre con infección VIH y PcP que no pudo ser corroborado posteriormente utilizando inmunofluorescencia con anticuerpos específicos (Mortier *et al.*, 1995).

Sin embargo, evidencias indirectas como los estudios que muestran elevadas tasas de colonización en las embarazadas (Vargas *et al.*, 2003) y la existencia de casos de neumocistosis de localización extrapulmonar mediante diseminación hematogena (Ng *et al.*, 1997), inducen a pensar que este mecanismo de transmisión debería ser explorado detenidamente. En este sentido, el reciente hallazgo de *P. jirovecii* en el pulmón de fetos nacidos muertos que no habían llegado a respirar aporta evidencias de que la transmisión transplacentaria es posible en humanos (Montes-Cano *et al.*, 2009).

En definitiva y con los datos disponibles hasta la fecha, actualmente se considera que cualquier individuo, con independencia de su edad, sexo y situación inmune, es susceptible de adquirir una infección sintomática o asintomática por *Pneumocystis*, fundamentalmente por vía aérea y a partir de otro sujeto con PcP o colonizado por el microorganismo (Varela *et al.*, 2006).

1.7.3. Epidemiología de la neumonía por *Pneumocystis*

Hasta 1980 la PcP no era una entidad frecuente, asociándose con síndromes de inmunodeficiencia o situaciones de intensa inmunosupresión, particularmente con la quimioterapia del cáncer. Con la pandemia del VIH, la PcP emergió como la enfermedad más común definitoria de SIDA en los países industrializados. Antes de la introducción de la profilaxis, el 60 % de los pacientes con SIDA eran identificados por presentar una PcP. Además, se estimó que hasta el 80% de los pacientes con recuentos de linfocitos CD⁴⁺ menores de 200 células/mm³ podían desarrollar esta enfermedad (Helweg-Larsen, 2004). A finales del siglo pasado la PcP tenía una incidencia de 9,5 episodios por 100 personas al año en pacientes infectados por el VIH, observándose en más del 50% de los pacientes con SIDA (Russian & Levine, 2001).

En la era de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), muchas infecciones oportunistas como la PcP experimentaron una franca disminución. Los

casos de esta enfermedad disminuyeron un 3,2 % por año desde 1992 hasta 1995 con la utilización de quimioprofilaxis; posteriormente, con la introducción de la TARGA, la tasa continuó descendiendo hasta valores de 21,5 % por año desde 1996 hasta 1998 (Morris *et al.*, 2004). La PcP afecta tanto a pacientes de países desarrollados como de áreas geográficas del tercer mundo donde actualmente la infección por VIH es endémica. Así, recientemente, un estudio prospectivo realizado en Uganda demostró que la PcP no era un enfermedad tan rara como se creía en el continente africano, pues se identificó *P. jirovecii* en el 40% de los individuos seropositivos al VIH (Worodria *et al.*, 2003). Actualmente la neumocistosis ha adquirido una importancia creciente, sobre todo, en sujetos inmunodeprimidos no infectados por el VIH, tales como pacientes con cáncer, hemopatías malignas, afecciones inflamatorias crónicas donde se utiliza tratamiento con fármacos inmunodepresores y receptores de trasplantes hematológicos o de órgano sólido. La incidencia de la enfermedad entre estos grupos de pacientes puede alcanzar hasta el 40%, con una mortalidad que puede alcanzar en algunas series hasta el 50% (Russian & Levine, 2001; Collin & Ramphal, 1998).

En los pacientes con cáncer, la incidencia de la PcP varía de acuerdo al tipo de neoplasia, oscilando entre el 22-45% en los pacientes con leucemia linfoblástica aguda o con linfoma no-Hodgkin, 25% en los pacientes con rhabdomiosarcoma y 1,3% en los pacientes con tumores sólidos que reciben tratamiento con esteroides. También, la PcP ha sido identificada como complicación del mieloma múltiple y la macroglobulinemia (Calderón *et al.*, 2011; Cisneros *et al.*, 1998).

En los pacientes sometidos a trasplante cardíaco se ha descrito una incidencia de la enfermedad de un dos a un 10%, variando de acuerdo con la distribución de la enfermedad a nivel mundial. Por otra parte, se ha estimado una incidencia del 25% en los pacientes sometidos a trasplantes de pulmón y de corazón-pulmón (Calderón *et al.*, 2011).

La PcP también puede afectar a pacientes con otros tipos de enfermedades como granulomatosis de Wegener (6%), asma, glomerulonefritis, rectocolitis ulcerosa, y otras patologías como lupus eritematoso sistémico, poliarteritis nodosa,

polimiositis, dermatomiositis, artritis reumatoide, sarcoidosis y pénfigo. En estos subgrupos la PcP suele aparecer en pacientes que han recibido terapia inmunosupresora intensa. Además, *P. jirovecii* ha sido vinculado con el desarrollo de trastornos autoinmunes como el desarrollo de anticuerpos anticardiolipina y el síndrome de Goodpasture (Ognibene *et al.*, 1995; Calderón *et al.*, 2004). Por otra parte, la PcP afecta a más del 25% de los pacientes con inmunodeficiencia severa combinada (Calderón *et al.*, 2011).

Finalmente, resulta interesante señalar que en algunos estudios realizados en Estados Unidos y España se ha descrito la existencia de PcP en pacientes inmunocompetentes o sin predisposición aparente, aunque este hallazgo parece ser poco frecuente (Jacobs *et al.*, 1991; Cano *et al.*, 1993).

Pneumocystis jirovecii es un patógeno con una distribución geográfica amplia, habiéndose encontrado distintos genotipos que varían según las diferentes zonas geográficas, grupos de pacientes y ecosistemas evaluados.

La variabilidad geográfica de los subtipos de *Pneumocystis* ha sido evaluada en varios estudios. Así, en un estudio amplio donde se incluyeron muestras aisladas del patógeno recogidas en países tan dispares como Gran Bretaña, Estados Unidos, Brasil y Zimbabwe, se encontró que la secuencia de ADN de todas las muestras era idéntica, salvo en un nucleótido (Wakefield *et al.*, 1994).

En un trabajo posterior, se estudiaron los distintos patrones de transmisión de la PcP en personas con SIDA, evaluando 191 muestras de pacientes de cinco ciudades de los Estados Unidos en dos diferentes loci, el gen mt LSU-rRNA y el gen que codifica la DHPS. Los autores observaron diferencias en la frecuencia de distribución del genotipo según el lugar de diagnóstico del paciente, pero no por el lugar de nacimiento (Beard *et al.*, 2000), hallazgo que apoya la hipótesis de la transmisión *de novo* de la infección.

En Gran Bretaña, se estudió la variación genotípica en muestras de *P. jirovecii* procedentes de pacientes con PcP durante un período de 12,5 años. Los autores identificaron un agrupamiento de genotipos específicos según el código postal de residencia de los participantes, observación coherente también con la hipótesis de la transmisión *de novo* persona a persona de *P. jirovecii* por vía aérea. La falta de asociación entre los genotipos específicos del mt LSU-rRNA y la severidad de la PcP sugería que este locus no estaba implicado en la virulencia del organismo (Miller *et al.*, 2005).

También hay estudios caracterizando el patrón de los genotipos en muestras de Lisboa (Portugal) y Sevilla (España), en los que se constata la existencia de diferencias geográficas según el locus evaluado (Estevez *et al.*, 2008).

En cuanto a los ecosistemas, un estudio publicado en 1998 examinó muestras de aire ambiental procedentes de habitaciones donde estaban ingresados pacientes con PcP, pasillos adyacentes, y otros ambientes hospitalarios. Los genotipos identificados fueron los mismos en cuatro de los cinco habitaciones de pacientes con PcP, sugiriendo que existe riesgo de transmisión persona a persona de *P. jirovecii* desde los pacientes con PcP. Tres de las 16 muestras ambientales donde no existían pacientes con PcP, y una muestra de una unidad cardiológica de un edificio hospitalario diferente fueron también positivos, lo cual refuerza la posibilidad de adquisición del *P. jirovecii* del ambiente (Ollson *et al.*, 1998).

En lo que respecta a la distribución estacional del patógeno, en Inglaterra se examinó a una cohorte de 8640 individuos con infección por VIH procedente de dos hospitales británicos, entre los que se habían descrito 792 casos de PcP. La incidencia de PcP fue significativamente más elevada en el mes de enero, asociación que sugiere la idea de una infección transmisible (Lubis *et al.*, 2003).

En España también se estudió la relación entre la incidencia de la infección y los factores climáticos. En total, se identificaron 536 casos de infección por *P. jirovecii* en el período 1994-1998, existiendo una correlación inversa entre la incidencia de PcP y la media mensual de la temperatura ambiental mínima. La mayoría de los casos ocurrían en invierno, existiendo una asociación estacional estadísticamente significativa (Varela *et al.*, 2004).

En el año 2007, se publicaron resultados muy interesantes que apoyan la asociación entre factores estacionales y la detección de genotipos específicos de *P. jirovecii*. En un estudio que analizó 155 muestras de lavado broncoalveolar obtenidos entre 1989 y 2001, los autores encontraron variaciones mensuales y estacionales en la frecuencia de detección de genotipos mixtos, y asociación entre las variaciones mensuales y el genotipo 2. No encontraron asociación mensual o estacional con los genotipos 1, 3 y 4, o con las temperaturas mensuales o el índice de pluviosidad (Miller *et al.*, 2007).

En relación con la temperatura media y utilizando también muestras de lavado broncoalveolar (LBA), fueron estudiados 757 pacientes con PcP durante el período comprendido entre enero de 1989 y diciembre del 2006, encontrándose una correlación positiva entre la incidencia de PcP y la temperatura media, aunque en el estudio no existió asociación con otros factores climáticos como la lluvia o la fuerza del viento (Sing *et al.*, 2009).

1.7.4. Colonización por *Pneumocystis*

La aplicación de la PCR para la amplificación del ADN de *Pneumocystis* en los estudios epidemiológicos ha contribuido al desarrollo de avances significativos en la comprensión de los mecanismos de transmisión de este patógeno (Wakefield *et al.*, 1990). Esta tecnología ha permitido demostrar la presencia del patógeno en diferentes muestras biológicas de pacientes sin manifestaciones clínicas ni radiológicas de neumonía, conociéndose este fenómeno como colonización (Morris & Norris, 2012; Calderón *et al.*, 2011; Wakefield *et al.*, 2003), aunque también ha

recibido otras denominaciones como infección subclínica o estado de portador asintomático (*carrier*) (Morris *et al.*, 2008; Peterson & Cushion, 2005)

La significación clínica de la colonización por *Pneumocystis* no está clara, pero se intuye su importancia por varias razones (Morris & Norris, 2011; Morris *et al.*, 2008):

- Los individuos colonizados con *Pneumocystis* pueden estar en riesgo de desarrollar PcP o bien transmitir *Pneumocystis* a otras personas.
- En individuos que reciben profilaxis a largo plazo contra *Pneumocystis*, la colonización puede conducir a la selección de mutaciones, que pueden estar asociadas con la resistencia a fármacos.
- La presencia de *Pneumocystis* en los pulmones, incluso a niveles bajos, puede estimular una respuesta inflamatoria en el huésped que puede conducir a un daño pulmonar, y por tanto, jugar un papel en la progresión de enfermedades pulmonares como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

La magnitud de este fenómeno biológico no se conoce aún bien, pero en los últimos años se ha constatado la presencia de colonización por *Pneumocystis* en grupos poblacionales muy diferentes que se resumen a continuación.

Mamíferos no humanos

En animales, la colonización se ha detectado en los pulmones de diversas especies de roedores, caballos y primates (Laakkonen *et al.*, 2001; Laakkonen *et al.*, 2001 b; Morris & Norris, 2012). En roedores de laboratorio, se publicó una tasa de colonización del 98% detectada en muestras orofaríngeas mediante PCR anidada (Icenhour *et al.*, 2001; Icenhour *et al.*, 2001b). En ratas recién nacidas, se observó que el 80% eran portadoras de *Pneumocystis* durante las primeras dos horas después del nacimiento, 97% después de las primeras 24 horas, y el 100% tras 48 horas (Icenhour *et al.*, 2001).

De forma similar, se ha demostrado que la colonización espontánea ocurre tanto en primates institucionalizados en laboratorio como en libertad (Croix *et al.*, 2002; Board *et al.*, 2003; Demanche *et al.*, 2005). En una colonia de macacos en libertad, todos los animales experimentaron colonización durante un período de observación de dos años, con una duración media de la colonización de dos meses (Demanche *et al.*, 2001). En macacos de laboratorio, se encontraron anticuerpos frente a *Pneumocystis* en el 95% de los casos, y se constató que animales saludables eran colonizados transitoriamente por el patógeno (Kling *et al.*, 2009).

En primates con el virus de inmunodeficiencia del simio, se comprobó colonización por *Pneumocystis*, tanto de forma natural como después de inoculación intrabronquial (Croix *et al.*, 2002; Board *et al.*, 2003), persistiendo este estado de colonización durante más de 40 semanas sin la aparición de PcP.

Adultos inmunodeprimidos con infección VIH

En pacientes con infección por VIH, la colonización por *P. jirovecii* parece ser un fenómeno frecuente. El rango de prevalencia encontrado depende de la población estudiada, del tipo de muestras y del método diagnóstico utilizado.

En el primer estudio realizado en esta población se analizaron 70 muestras de esputos inducidos y de lavados broncoalveolares mediante PCR simple, encontrando una prevalencia de colonización que osciló entre un 10 y un 40% de colonización (Leigh *et al.*, 1993).

Utilizando PCR semi-anidada, dos estudios encontraron una prevalencia de un 14,3% y un 20% en los lavados broncoalveolares de 34 y 5 individuos infectados, respectivamente (Nevez *et al.*, 1997; Nevez *et al.*, 1999).

En otros estudios, realizados con técnicas más sensibles de PCR anidada, el rango varía entre un 28,8% y un 68,8%.

Así, en un estudio inicial, se describió un 31,3% de prevalencia en 80 lavados broncoalveolares de pacientes asintomáticos que recibían profilaxis anti-PcP (Rabodonirina *et al.*, 1997). Posteriormente, estudiando esputos inducidos y lavados orofaríngeos de 52 pacientes VIH positivos con síntomas respiratorios, se encontró un 28,8% de colonización (Matos *et al.*, 2001). En 32 pacientes VIH positivos ingresados por neumonía no PcP, se observó una prevalencia de colonizados en los lavados broncoalveolares o esputos inducidos del 69% (Huang *et al.*, 2003). Otro estudio encontró un 43% analizando lavados broncoalveolares de 16 individuos infectados por VIH (Wakefield *et al.*, 2003). En el estudio de 91 muestras pulmonares de pacientes VIH positivos fallecidos por causa diferente a PcP, se describió una prevalencia del 46% (Morris *et al.*, 2004). Más recientemente, en nuestro medio, se ha comunicado una prevalencia de un 40% en 20 individuos jóvenes VIH positivos (Gutierrez *et al.*, 2011).

En cuanto a los factores de riesgo relacionados con la colonización, Leigh *et al.* encontraron relación con el número de células CD4⁺, aumentando la prevalencia desde un 10% en personas con CD4⁺ por encima de 400 células/ μ l, hasta un 40% en aquéllos con menos de 60 células/ μ l (Leigh *et al.*, 1993). Sin embargo, otros estudios no han podido confirmar esta posible asociación, habiéndose encontrado colonización en individuos con cifras elevadas de linfocitos CD4⁺, así como en aquellos individuos en tratamiento antirretroviral o que realizaban profilaxis anti-*Pneumocystis* (Huang *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2004). Otros posibles factores de riesgo propuestos incluyen el tabaquismo y los condicionantes geográficos (Morris *et al.*, 2004). Así, en un estudio realizado sobre una cohorte de 91 sujetos con SIDA pertenecientes a varios estados norteamericanos, los participantes fumadores tenían una probabilidad significativamente mayor (2,9, $p < 0,05$) de presentar colonización por *Pneumocystis* que los que no eran fumadores. También el lugar de residencia influía significativamente sobre la prevalencia de *Pneumocystis* siendo los participantes residentes en Los Angeles, los que menos riesgo de colonización presentaban. Otros factores evaluados en el estudio fueron el recuento de células CD4⁺, la historia previa de PcP, el uso de profilaxis frente a PcP o la toma de fármacos antirretrovirales, sin que se observara una asociación significativa con la colonización (Morris *et al.*, 2004).

Adultos inmunodeprimidos sin infección VIH

En los últimos años, las técnicas moleculares han mostrado que los sujetos inmunocomprometidos sin infección por VIH como los pacientes con diabetes mellitus, sarcoidosis y mieloma múltiple, pueden estar subclínicamente infectados con *Pneumocystis* (Nevez *et al.*, 1999). Los individuos que reciben terapia inmunosupresora por distintas patologías médicas también tienen un riesgo incrementado de colonización. En otras ocasiones, la enfermedad inmunodepresora subyacente puede incrementar la susceptibilidad de la colonización por *Pneumocystis* (Morris & Norris, 2012).

De esta forma, en un estudio realizado en 110 sujetos inmunodeprimidos sin PcP, donde el 92% eran no VIH, se encontró una prevalencia de colonización del 9% (Hauser *et al.*, 2011). En otro estudio, en el que se incluyó un grupo de 67 individuos con enfermedades inmunodepresoras diversas se observó una prevalencia de colonización del 16% (Mekinian *et al.*, 2011). En este estudio se halló asociación entre la colonización y el recuento de células CD4+, de manera que en los pacientes con menos de 400 células/mm³, la prevalencia aumentaba a un 30%.

En cuanto a las situaciones que conducen a una inmunosupresión iatrógena como el tratamiento prolongado con corticoides sistémicos, en un estudio que incluyó 93 LBA procedentes de sujetos a los que se había realizado broncoscopia diagnóstica, se detectó ADN de *Pneumocystis* en 8 de los 18 individuos (44%) que estaban siendo tratados con dosis de prednisona mayores de 20 mg/día, comparados con 9 de los 75 (12%) que no eran tratados con glucocorticoides (OR 5,9, $p= 0,004$) (Maskell *et al.*, 2003). Esta asociación también fue encontrada en un estudio en el que se incluyeron 80 pacientes con neumonía bacteriana, donde el 75% de los individuos colonizados habían recibido corticoides, comparados con el 13% de los no colonizados ($p= 0,001$) (Helweg-Larsen *et al.*, 2002).

Recientemente se ha descrito también una elevada tasa de colonización entre pacientes tratados con fármacos biológicos como los inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF). Así, en un reciente estudio realizado en 78 pacientes con enfermedades reumatológicas se encontró una prevalencia global de colonización

del 25%. Tanto el uso de infliximab por un período mayor de tres años como el tratamiento con corticoides fueron factores de riesgo para la colonización (Wissmann *et al.*, 2008; Wissmann *et al.*, 2011).

Individuos inmunocompetentes

▪ Población infantil

Diferentes estudios seroepidemiológicos (Vargas *et al.*, 2001; Respaldiza *et al.*, 2004; Wakefield *et al.*, 1990b) han puesto de manifiesto la existencia de anticuerpos específicos frente a *Pneumocystis* en los primeros años de vida, apoyando la idea de que la primoinfección por este patógeno es un fenómeno que se produce con frecuencia en la infancia. En estos estudios también se demostró un incremento de la seroprevalencia conforme aumenta la edad.

En el estudio realizado en población infantil de España (Respaldiza *et al.*, 2004) se encontró una prevalencia del 73% en una muestra de 233 niños. La prevalencia guardaba una relación directamente proporcional con la edad, aumentando desde un 52% a los 6 años, a 66% a los 10 y a un 80% a los 13 años. En otro estudio sobre población infantil chilena, en el que se incluyó una cohorte prospectiva de 107 niños sanos seguidos durante dos años, se identificó ADN de *P. jirovecii* en el 32% de 74 muestras nasofaríngeas obtenidas durante infecciones respiratorias leves y la prevalencia de seroconversión a los 20 meses de edad alcanzó el 85% (Vargas *et al.*, 2001). En otro trabajo realizado en niños de Inglaterra y Gambia, los títulos de anticuerpos frente a *Pneumocystis* fueron similares en ambas poblaciones y aumentaban de forma constante, de modo que a los 8 años, aproximadamente el 70% de los individuos eran seropositivos (Wakefield *et al.*, 1990b).

La colonización por *Pneumocystis* se ha detectado en niños sanos y aparece también con frecuencia durante episodios de infecciones respiratorias altas en la infancia. Su posible asociación con otras patologías como la muerte súbita del lactante es más controvertida.

Así, en Dinamarca, se informó de una prevalencia del 16% mediante PCR a tiempo real en 422 niños hospitalizados con infección respiratoria aguda (Larsen *et al.*, 2007).

En Zambia, se estudiaron tejidos pulmonares de niños fallecidos por infecciones respiratorias, con y sin infección por VIH. Se detectó ADN de *Pneumocystis* por PCR simple en el 100% de los 22 niños fallecidos por PcP y en el 17% (13 de 70) de los que murieron por otras causas. La prevalencia de colonización fue del 13% (4 de 30) en los VIH negativos, y del 20% (9 de 45) entre los VIH positivos, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (Kasolo *et al.*, 2002). Otro estudio en el que se incluyeron 112 muestras de niños inmunocompetentes muertos tanto en hospital como ambulatoriamente y en el que se utilizó una técnica más sensible de PCR anidada mostró una prevalencia más alta, que alcanzó un 44,6%. En un trabajo realizado en 60 niños inmunocompetentes de madres infectadas por VIH, el 3,5% estaban colonizados por *Pneumocystis*. Todos los niños colonizados tenían síntomas de vías respiratorias altas (Spencer *et al.*, 2008).

Finalmente, en dos estudios diferentes en los que se evaluaron niños inmunocompetentes con bronquiolitis, se encontró la misma tasa de colonización por *Pneumocystis*, 24% en 185 aspirados nasofaríngeos de 178 niños utilizando PCR anidada (Nevez *et al.*, 2001), y 24,6% en 240 niños mediante PCR anidada y a tiempo real (Totet *et al.*, 2003).

Con respecto a la muerte súbita del lactante (MSL), su posible asociación con la colonización por *Pneumocystis* fue descrita en un estudio realizado en 1999 en el que se incluyeron muestras de tejido pulmonar obtenidas de autopsias procedentes de 54 niños fallecidos consecutivamente en un área de Chile. Se excluyeron niños con SIDA y con patología neoplásica. Mientras que sólo en el 3% de las muestras de recién nacidos fallecidos por otras causas se identificó la presencia de *Pneumocystis*, el 25% de los niños fallecidos por muerte súbita del lactante eran portadores de *Pneumocystis* (Vargas *et al.*, 1999).

Posteriormente, en Rochester (NY) y Connecticut fueron examinados 79 niños fallecidos por muerte súbita del lactante, observándose un 14% de colonización por *Pneumocystis* en las muestras de tejido pulmonar (Morgan *et al.*, 2001). En otro estudio realizado en cinco ciudades norteamericanas, el 100% de 58 niños muertos con menos de un año de edad y de diferente origen racial (tanto por muerte súbita como por otras causas) eran positivos al gen mt LSU-rRNA de *Pneumocystis* (Beard *et al.*, 2005). Sin embargo, en un estudio más reciente del mismo equipo que realizó la descripción inicial de esta asociación y en el que se emplearon técnicas diagnósticas más sensibles, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de colonización de 126 niños fallecidos por muerte súbita del lactante (33%) respecto a 24 niños con muerte por causa accidental (29%) (Vargas *et al.*, 2007), por lo que actualmente el vínculo entre MSL y la infección por *Pneumocystis* es cuestionado.

▪ Embarazo

Durante el embarazo se producen alteraciones en la inmunidad celular y humoral que condicionan un estado de inmunotolerancia con cierto grado de inmunodepresión que podrían explicar una mayor susceptibilidad a la colonización en esta etapa de la vida (Wissmann *et al.*, 2009). Así, analizando secreciones nasales mediante PCR anidada de un grupo de 33 mujeres embarazadas en su tercer trimestre y de un grupo control de 28 mujeres no embarazadas, pudo observarse que el 15% de las mujeres asintomáticas embarazadas estaba colonizada por *Pneumocystis*, frente a ninguna del grupo control ($p < 0,05$) (Vargas *et al.*, 2003).

La colonización en este subgrupo de población podría tener una especial importancia desde el punto de vista epidemiológico por su posible papel como reservorio y fuente de transmisión de la infección al recién nacido, fenómeno que está apoyado por algunas evidencias clínico-experimentales. Así, en modelos animales se ha demostrado que *Pneumocystis* puede detectarse en el frotis oral del 80% de los ratones dos horas después de su nacimiento y prácticamente en todos a las 48 horas (Icenhour *et al.*, 2002). En seres humanos, se han descrito que episodios concomitantes de PcP en una madre y su hijo de un mes de edad estaban

producidos por un mismo genotipo del patógeno, lo que apoya la hipótesis de la transmisión maternofilial (Miller *et al.*, 2002).

▪ **Patología respiratoria**

La colonización por *Pneumocystis* es un fenómeno frecuente en individuos adultos con diferentes enfermedades respiratorias crónicas. Las tasas de prevalencia comunicadas en la literatura en este subgrupo de población son muy variables y dependen fundamentalmente de factores geográficos y relacionados con las características de los sujetos evaluados, del tipo de patología y de la sensibilidad de las técnicas utilizadas para el diagnóstico de la colonización (Gutiérrez *et al.*, 2011; Calderón *et al.*, 2010).

Así, en un trabajo en el que se incluyeron 141 pacientes con diferentes enfermedades pulmonares como la EPOC, la fibrosis quística y el cáncer de pulmón, se pudo encontrar globalmente una tasa de colonización de un 21% (Probst *et al.*, 2000). Otros estudios realizados en pacientes de características similares encontraron un rango de prevalencia que osciló entre un 2,6 a un 35% (Sing *et al.*, 1999; Visconti *et al.*, 2000; Matos *et al.*, 2003).

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

La primera comunicación sobre la existencia de colonización por *P. jirovecii* en pacientes con enfermedades bronquiales crónicas sin inmunosupresión fue realizada en 1996, en un estudio en el que utilizando técnicas convencionales de microscopía se demostró la presencia del patógeno en el 10% de las muestras de esputo de un grupo de 50 pacientes con bronquitis crónica sin causa conocida de inmunodepresión (Calderón *et al.*, 1996).

Posteriormente, los mismos autores, y ya utilizando PCR anidada, describieron una prevalencia del 41% al estudiar 37 pacientes con EPOC (Calderón *et al.*, 2004). En un estudio con 141 pacientes con distintas alteraciones

respiratorias, la mayor prevalencia de colonización por *Pneumocystis* correspondió a los sujetos con EPOC, un 41% (Probst *et al.*, 2000).

La proporción de sujetos con EPOC colonizados en la mayoría de los estudios es elevada, aunque el rango de frecuencias varía según el área geográfica entre un 16 a un 55% (Calderón *et al.*, 2007, Nevez *et al.*, 2006). En este sentido, *P. jirovecii* está aparentemente ligada con factores ambientales y climáticos, existiendo probablemente áreas geográficas de bajo y alto riesgo (Varela *et al.*, 2004).

Dentro de un mismo área geográfica, la colonización por *P. jirovecii* es más prevalente entre pacientes con una EPOC más grave, observándose una correlación entre el grado de obstrucción de las vías aéreas y la frecuencia de colonización que es independiente del hábito tabáquico y que sugiere que el patógeno podría estar relacionado con la progresión de la EPOC (Morris *et al.*, 2004). En este sentido, se ha demostrado que los pacientes con EPOC colonizados desarrollan una respuesta inflamatoria sistémica más intensa (en término de mayores niveles de citoquinas circulantes IL-8, IL-6 y TNF- α) que los pacientes no colonizados (Calderon *et al.*, 2007), hallazgos que sugieren que la colonización por *Pneumocystis* podría estar implicada en la fisiopatología del EPOC. La asociación entre *Pneumocystis* y la gravedad de la EPOC no ha sido observada en otro estudio (Maskell *et al.*, 2003), aunque en este último se incluían sujetos con un grado funcional de enfermedad más leve.

Por otra parte, el hábito tabáquico ha sido considerado una de las principales causas de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, aunque sólo un pequeño porcentaje de los fumadores padecen esta enfermedad, hecho que apoya la hipótesis de que otros cofactores, como la colonización por *P. jirovecii*, podrían desempeñar un papel importante en el desarrollo de la EPOC. Adicionalmente, el hábito tabáquico parece ser un factor de riesgo en la colonización por *P. jirovecii* tanto en personas con infección VIH (Morris *et al.*, 2004) como en pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales (Vidal *et al.*, 2006).

En la actualidad, sabemos que el hábito tabáquico produce una alteración funcional de la barrera mucociliar, que podría facilitar la colonización por *P.*

jirovecii. De esta forma, la colonización por el patógeno del tracto respiratorio inferior podría convertirse, junto con el hábito tabáquico, en un cofactor que aumentara o mantuviera la respuesta inflamatoria, acelerando la progresión de la EPOC (Gutiérrez *et al.*, 2011).

Enfermedades pulmonares intersticiales

Las enfermedades pulmonares intersticiales son un grupo heterogéneo de procesos que afectan al tracto respiratorio inferior donde la alteración en el parénquima pulmonar conlleva una cascada de procesos inflamatorios e inmunológicos que causan fibrosis pulmonar (Gutierrez *et al.*, 2011). En este sentido, hay estudios que implican a agentes infecciosos en la patogénesis de las enfermedades pulmonares intersticiales (Egan *et al.*, 1997, du Bois *et al.*, 2003).

El rango de prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales varía entre un 30 a un 34% (Vidal *et al.*, 2006, Martín-Juan *et al.*, 2008, Shimizu *et al.*, 2009), siendo la prevalencia similar entre las diferentes enfermedades pulmonares intersticiales.

En un estudio que incluyó a 240 pacientes con enfermedad intersticial pulmonar (Martín-Juan *et al.*, 2008), los pacientes colonizados por *P. jirovecii* presentaban en sangre periférica unos niveles totales de leucocitos y eosinófilos más elevados que los no portadores. Estos autores observaron también que la razón CD4/CD8 era menor en los portadores, debido principalmente a un aumento en el recuento de CD8, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas. Este hallazgo sugiere que la colonización por *Pneumocystis* puede estar relacionada con una exacerbación de estas enfermedades. (Gutiérrez *et al.*, 2011)

Fibrosis quística

La fibrosis quística también ha sido analizada en varios estudios (Varela *et al.*, 1998; Sing *et al.*, 2001; Respaldiza *et al.*, 2005; Montes-Cano *et al.*, 2007; Pederiva *et al.*, 2012), con tasas de prevalencia muy variables.

El primer estudio realizado en 45 pacientes con esta enfermedad no encontró colonización por *Pneumocystis*, aunque el método de detección utilizado no fue la PCR, sino técnicas de tinción con inmunofluorescencia (Varela *et al.*, 1998).

Utilizando PCR anidada Sing *et al.* analizaron 137 esputos de 95 pacientes con fibrosis quística (edad media 23,3 años), encontrando que el 7,4% estaban colonizados por *Pneumocystis* (Sing *et al.*, 2001). En otro estudio que analizó 54 esputos y 34 lavados orofaríngeos de 88 pacientes se encontró una prevalencia de colonización del 21,5 % (Respaldiza *et al.*, 2005). La colonización fue más frecuente en sujetos con menos de 18 años (25,5% frente al 15,1%). Por otra parte, se ha podido comprobar que la colonización en los pacientes con fibrosis quística es un fenómeno dinámico con episodios continuos de aclaramiento y reinfección (Montes-Cano *et al.*, 2007). Fuera de Europa, un estudio reciente ha comunicado una prevalencia de colonización del 38,2% en pacientes brasileños (Pederiva *et al.*, 2012).

La colonización por *Pneumocystis* no parece ser un factor de riesgo para producir PcP en los pacientes con fibrosis quística, probablemente porque el estado inmune de estos pacientes sea suficiente para controlar el paso de colonización a infección (Sing *et al.*, 2001; Respaldiza *et al.*, 2005; Montes-Cano *et al.*, 2007). No obstante, incluso sin una inmunodepresión grave, la colonización por *Pneumocystis* puede provocar alteraciones respiratorias moderadas o severas, donde el patógeno actúa como un factor de comorbilidad estimulando la inflamación pulmonar (Calderon *et al.*, 2007; Morris *et al.*, 2008). Aquí se baraja la hipótesis de que la colonización por *P. jirovecii* provoca obstrucción de las vías aéreas y una respuesta inflamatoria en los pacientes con fibrosis quística (Calderon *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2011). Sin embargo, en la actualidad esta hipótesis no ha podido ser demostrada. Por tanto, no es posible hasta el momento establecer si la colonización

por *P. jirovecii* puede jugar un papel en el empeoramiento del curso natural de la fibrosis quística.

Por otra parte, no es conocida la interacción del *P. jirovecii* con las bacterias patógenas del tracto respiratorio de pacientes con fibrosis quística. Sin embargo, esta interacción podría tener impacto sobre la fisiopatología de la fibrosis quística. En este sentido, una potencial relación antagonista entre la colonización por *P. jirovecii* y las bacterias microbionas ha sido recientemente publicado en el tracto respiratorio de pacientes con neumonía intersticial idiopática (Friaiza *et al.*, 2010).

Cáncer de pulmón de células pequeñas

El hábito tabáquico es el factor de riesgo más importante en el cáncer de pulmón, pero no el único. El papel de los agentes infecciosos en el desarrollo de tumores humanos no ha sido demostrado hasta fechas recientes (Kuper *et al.*, 2000). Actualmente, se estima que el 15% de todos los tumores humanos tienen un origen infeccioso (Pisani *et al.*, 1997).

Un estudio publicado recientemente aporta la primera evidencia de la asociación entre el cáncer de células pequeñas de pulmón y la colonización por *Pneumocystis* (de la Horra *et al.*, 2004). Los autores estudiaron diez muestras de autopsias de pacientes con carcinoma de células pequeñas y 10 muestras de pacientes con otros tipos de cáncer de pulmón con características demográficas y clínicas similares, así como en cinco muestras de sujetos fallecidos sin patología pulmonar. El ADN del *Pneumocystis* fue encontrado en todos los casos de carcinoma pulmonar de células pequeñas, frente a sólo en dos casos de los otros tipos de cáncer y en ninguno de los controles. La asociación entre la presencia del ADN del *Pneumocystis* y el cáncer pulmonar de células pequeñas fue significativa ($p < 0,05$) Esta asociación, aunque de naturaleza incierta, constituye un importante hallazgo abriendo un nuevo campo para la investigación, ya que todavía no podemos determinar si la colonización por *P. jirovecii* está facilitada por el tumor, o bien induce el desarrollo de este tipo de neoplasia en combinación con otros factores.

▪ Población general

Las evidencias sobre la posibilidad de que individuos sanos de la población general pudieran estar colonizados por *Pneumocystis* son escasas, y los resultados de los diferentes estudios publicados son muy variables, dependiendo fundamentalmente del tipo de muestras evaluadas, de las técnicas empleadas para la detección del microorganismo y de las características de los sujetos analizados.

La prevalencia en población general, al igual que en el resto de poblaciones, ha ido cambiando en los distintos estudios publicados, siendo una de las principales razones, el desarrollo de técnicas más sensibles.

En 1992, un estudio en autopsias de 15 adultos inmunocompetentes no fumadores sin enfermedades crónicas no encontró pruebas de colonización por *Pneumocystis*, aunque no utilizó técnicas moleculares (Peters *et al.*, 1992).

Los primeros estudios realizados para detectar ADN de *Pneumocystis* utilizaron técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) simple, no encontrando ADN en ninguno de los diez LBA de individuos inmunocompetentes (Wakefield *et al.*, 1990), ni en los 15 pulmones de individuos adultos no inmunodeprimidos analizados (Peters *et al.*, 1992). En otro estudio que utilizó ya una técnica más sensible de PCR anidada, no hubo evidencia de colonización en los esputos inducidos de 20 hombres VIH negativos (10 homosexuales y 10 heterosexuales), utilizados como controles para el estudio original (Leigh *et al.*, 1993). En Portugal tampoco se encontró colonización en los 32 sujetos sanos utilizados como grupo control en un estudio sobre prevalencia de colonización realizado en individuos con infección VIH (Matos *et al.*, 2001), ni en Chile, donde se estudiaron a 33 mujeres inmunocompetentes como población control frente a mujeres embarazadas (Vargas *et al.*, 2003).

Sin embargo, en otro estudio realizado en 1997 en el que se analizaron mediante PCR anidada muestras de 169 sujetos sin infección por VIH se observó que el 19,5% de los sujetos estaba colonizado. El trabajo se realizó en dos hospitales

franceses, y los participantes fueron reclutados entre aquellos a los que se realizó un lavado broncoalveolar para el diagnóstico de diferentes enfermedades respiratorias y, por tanto, no se incluyeron sujetos sanos (Nevez *et al.*, 1997).

Posteriormente, en otro trabajo de este mismo grupo no se encontraron indicios de colonización en las muestras de esputo de 30 sujetos sanos franceses, mientras que en el grupo control, ocho de 50 pacientes con EPOC sí resultaron positivos a *P. jirovecii*. El grupo de personas sanas fue reclutado entre las personas que acudían al hospital para una polisomnografía nocturna con los siguientes criterios de inclusión: células CD4+ T en sangre >600 células/mm³ y ausencia de alteraciones pulmonares en el estudio practicado, que incluyó radiografía de tórax, espirometría y registro polisomnográfico (Nevez *et al.*, 2006).

Por otra parte, en un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo, se analizaron las muestras de enjuagues orofaríngeos de 50 personas sanas entre febrero y julio de 2003. En las muestras de diez de estos sujetos se amplificó el fragmento mt LSU rRNA, observándose, por tanto, una prevalencia de colonización del 20%. Los participantes eran trabajadores de un hospital, sin contacto directo previo con los pacientes hospitalizados y que trabajaban en un edificio diferente a los de hospitalización. Los sujetos colonizados permanecieron asintomáticos durante un periodo de seguimiento de seis meses y, tras este período, sólo dos de los sujetos continuaban estando colonizados.

Este estudio demostró por primera vez que el ADN del *P. jirovecii* puede ser detectado por técnicas sensibles de amplificación del ADN en muestras no invasivas del tracto respiratorio de un porcentaje importante de sujetos sanos (Medrano *et al.*, 2005), así como que el estado de portador en población general adulta podría ser un fenómeno limitado en el tiempo, en concordancia con lo observado en trabajadores sanitarios inmunocompetentes colonizados con el patógeno (Miller *et al.*, 2001; Durand-Joly *et al.*, 2003).

Finalmente, dos estudios realizados más recientemente apoyan fuertemente la posibilidad de que la colonización por *Pneumocystis* pueda ser un fenómeno relativamente frecuente en adultos sanos. En el primero de ellos se incluyeron 110

personas mayores de 65 años inmunocompetentes residentes en Chile, y se encontró una prevalencia del 13% al examinar las muestras de lavados orofaríngeos. Esta prevalencia aumentó a un 23% al incluir también las muestras nasales de los mismos individuos (Vargas *et al.*, 2010). En el segundo, realizado en autopsias de sujetos inmunocompetentes en Chile (Ponce *et al.*, 2010), se analizó el ADN de un 3% del tejido pulmonar, encontrando en un 64,9% de estas muestras presencia de ADN de *Pneumocystis*. Estos resultados, no han sido aún replicados en otros estudios de diseño similar y son difíciles de comparar con los datos disponibles de trabajos realizados en sujetos inmunocompetentes vivos, pero sugieren fuertemente que niveles muy pequeños de colonización pueden ser más comunes de lo que se pensaba (Morris & Norris, 2012).

Epidemiología de la colonización por
Pneumocystis en población general

2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre la epidemiología de la infección humana por *Pneumocystis jirovecii* es aún muy limitado y, como se ha revisado en el capítulo introductorio, no están bien establecidos cuáles son sus reservorios y fuentes de transmisión. Se ha demostrado que el patógeno está presente en muestras respiratorias de individuos sin síntomas o signos de neumonía, fenómeno que recibe el nombre de colonización y, recientemente, se ha observado que este fenómeno es frecuente en pacientes inmunodeprimidos o con algunas enfermedades pulmonares crónicas.

En estudios preliminares se ha descrito la existencia de colonización en adultos sanos inmunocompetentes, hallazgo que sugiere que la población general podría desempeñar un papel como reservorio y fuente de infección del microorganismo. Sin embargo, en el momento actual se desconoce la prevalencia y relevancia de este fenómeno en población general, lo que justifica la necesidad de realizar nuevos estudios de base poblacional que, combinando un diseño epidemiológico riguroso con la aplicación de las nuevas técnicas moleculares para la identificación y caracterización de este microorganismo, permitan aclarar este aspecto fundamental de la epidemiología de la infección por *Pneumocystis* en el ser humano.

Este conocimiento resulta esencial para poder diseñar estrategias racionales para la prevención y el control de la PcP que contribuirían a disminuir la morbilidad asociada a la infección por *Pneumocystis* en colectivos de riesgo como los niños y adultos trasplantados, los pacientes oncológicos y otros grupos de pacientes sometidos a inmunodepresión.

HIPÓTESIS

1. Existe una elevada prevalencia de infección inaparente o colonización por *Pneumocystis jirovecii* en la población general.
2. La población general constituye un importante reservorio para *P. jirovecii*, siendo una potencial fuente de transmisión a sujetos inmunodeprimidos.

OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer las características epidemiológicas de la colonización por *Pneumocystis* en la población general.

Objetivos específicos

1. Determinar la prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en la población general de un área del sur de España.
2. Investigar posibles factores asociados a una mayor tasa de colonización por el patógeno.
3. Estudiar la distribución de genotipos del patógeno en la población general y la prevalencia de sujetos colonizados con mutaciones asociadas a la resistencia al cotrimoxazol.

Epidemiología de la colonización por *Pneumocystis* en población general

3. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Ámbito y población de estudio

El estudio se realizó en el municipio de El Coronil, situado en la zona sur de la provincia de Sevilla, a 53,3 Km. de distancia de la capital (figura 2), y considerado como población rural (Decreto 150/2003, de 10 de junio, por el que se determinan los municipios con relevancia territorial, a efectos de lo previsto en la Ley 7/2002, de 17 de diciembre, de Ordenación Urbanística de Andalucía). Su índice de ruralidad (2001) es de -0,92, representando el valor o un nivel medio de ruralidad (Ocaña-Riola, 2005).

El municipio de El Coronil fue seleccionado por su estabilidad demográfica e isócrona distante de cualquier centro hospitalario, considerando un radio de unos 50 Kilómetros. Este factor fue tenido en cuenta, debido a que *Pneumocystis* podría ser una infección potencialmente transmisible en el entorno hospitalario o entre pacientes inmunodeprimidos.

En cuanto a sus características, el término municipal cuenta con una extensión de 92 km², con una altitud en el núcleo de 117 metros sobre el nivel del mar. Su población en el año 2008 era de 5.045 habitantes (Instituto Nacional de Estadística, 2007), de los cuales el 22,58% (1.139) tenían menos de 20 años y el 15,64% (789) menos de 15 años (tabla 1). Su principal actividad económica proviene del sector agrícola (SIMA, 2007). Los movimientos de población son escasos con cambios interanuales inferiores al 1% y tasas de inmigración y emigración en torno al 1,5%. (Observatorio Andaluz de Empleo Agrario, 2007).

Posee un único Centro de Salud (figura 3), perteneciente al Distrito Sanitario Sevilla Sur del Servicio Andaluz de Salud, siendo el centro sanitario de referencia para la población del municipio, razón por lo que se escogió como lugar de recogida de datos.

Figura 2. Localización del término municipal de El Coronil, Sevilla



Figura 3. Centro de Salud de El Coronil



Tabla 1. Distribución de la población del municipio de El Coronil según edad y sexo.

Edad	Sexo	Población
0-4	Varón	126
	Mujer	103
05-sep	Varón	127
	Mujer	137
oct-14	Varón	156
	Mujer	151
15-19	Varón	172
	Mujer	167
20-24	Varón	155
	Mujer	155
25-29	Varón	156
	Mujer	174
30-34	Varón	186
	Mujer	181
35-39	Varón	217
	Mujer	199
40-44	Varón	219
	Mujer	189
45-49	Varón	185
	Mujer	158
50-54	Varón	143
	Mujer	109
55-59	Varón	131
	Mujer	124
60-64	Varón	122
	Mujer	119
65-69	Varón	108
	Mujer	119
70-74	Varón	109
	Mujer	132
75-79	Varón	103
	Mujer	126
80-84	Varón	66
	Mujer	99
>85	Varón	29
	Mujer	48
Total		5045

Fuente: Instituto Nacional de Estadística, 2007

3.2. Diseño

Estudio transversal de prevalencia de base poblacional.

3.2.1. Cálculo del tamaño muestral

Se realizó un muestreo sistemático con arranque aleatorio, estratificado por edad y sexo, tomando como fuente la Base de Datos del Usuario del Servicio Andaluz de Salud (BDU), actualizada a junio de 2007 (tabla 2).

Los criterios de inclusión en el estudio fueron:

- Adscripción al municipio de El Coronil en la BDU.
- Posibilidad de obtención de una muestra de lavado orofaríngeo (LOF) para la evaluación microbiológica
- Obtención del consentimiento informado por escrito (anexo 2), previa explicación verbal y escrita del estudio. En el caso de los menores de edad, se obtuvo el consentimiento paterno o del tutor legal.

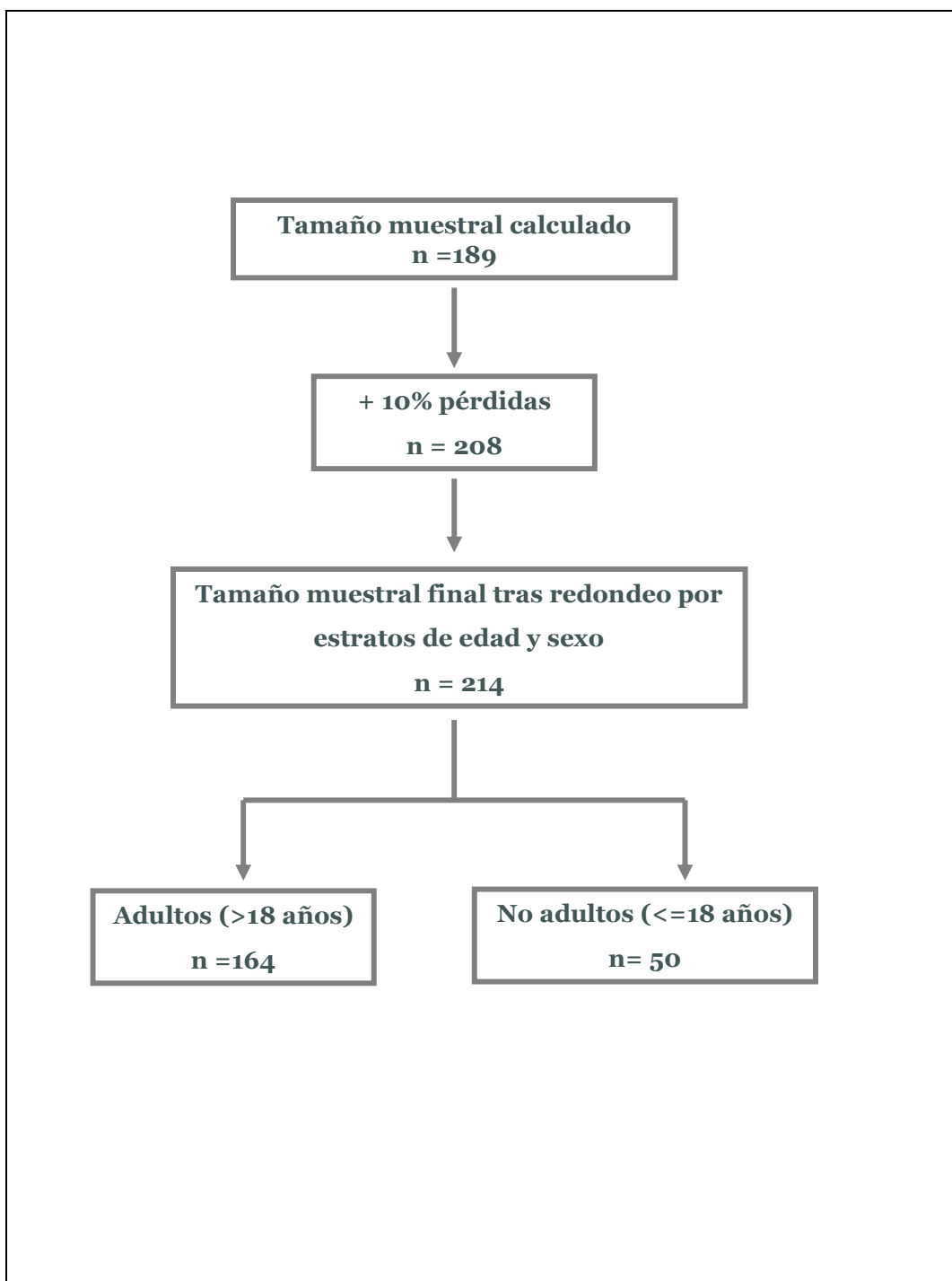
Para el cálculo del tamaño muestral se consideró, en función de los resultados de un estudio previo realizado en nuestra área (Medrano *et al.*, 2005), una prevalencia del 12% que, con un nivel de confianza del 95%, un error muestral del 5% y un efecto de diseño igual a uno, representa un tamaño muestral inicial de 189 individuos. Estimando una tasa de pérdidas del 10% en cada estrato de edad y sexo, y una vez redondeada las cifras también por estratos, el tamaño muestral fue de 214 individuos, 108 hombres y 106 mujeres. De ellos, el 76,64% de la muestra (164) eran mayores de 18 años, y el 23,36% (50) eran iguales o menores de 18 años (figura 4).

Antes de la realización del estudio se obtuvieron los permisos pertinentes de las autoridades sanitarias y se informó al personal sanitario y no sanitario del centro de la naturaleza y características del proyecto de investigación.

Tabla 2 .Tamaños muestrales calculados y obtenidos por grupo de edad y sexo (prevalencia 12%, error muestral 5%)

Edad	Sexo	Tamaño muestral calculado	Tamaño muestral +10% pérdidas estimadas	Redondeo por estratos
0-4	Varón	5	5,5	6
	Mujer	4	4,4	4
05-sep	Varón	5	6	6
	Mujer	5	5,5	6
oct-14	Varón	6	6,6	7
	Mujer	6	6,6	7
15-19	Varón	6	6,6	7
	Mujer	6	6,6	7
20-24	Varón	6	6,6	7
	Mujer	6	6,6	7
25-29	Varón	8	8,8	9
	Mujer	7	7,7	8
30-34	Varón	7	7,7	8
	Mujer	7	7,7	8
35-39	Varón	8	8,8	9
	Mujer	7	7,7	8
40-44	Varón	8	8,8	9
	Mujer	7	7,7	8
45-49	Varón	7	7,7	8
	Mujer	6	6,6	7
50-54	Varón	5	5,5	6
	Mujer	4	4,4	4
55-59	Varón	5	5,5	6
	Mujer	5	5,5	6
60-64	Varón	5	5,5	6
	Mujer	4	4,4	4
65-69	Varón	4	4,4	4
	Mujer	4	4,4	4
70-74	Varón	3	3,3	3
	Mujer	5	5,5	6
75-79	Varón	4	4,4	4
	Mujer	5	5,5	6
80-84	Varón	2	2,2	2
	Mujer	4	4,4	4
>85	Varón	1	1,1	1
	Mujer	2	2,2	2
Total		189	207,9	214

Figura 4. Cálculo del tamaño muestral por estratos de edad y sexo (prevalencia 12%, error muestral 5%, pérdidas estimadas 10%)



3.2.2. Intervención

- Inclusión de los probandos

Los candidatos a participar en el estudio fueron seleccionados de la población incluida en la Base de Datos del Usuario (BDU) del Servicio Andaluz de Salud de 2007 mediante un muestreo sistemático con arranque aleatorio.

Un mes antes de la fecha prevista para el inicio del estudio, los individuos adultos seleccionados fueron invitados a participar en el presente proyecto de investigación mediante una carta postal donde se detallaba la naturaleza y características del mismo y se solicitaba su colaboración para ser incluido como probando. En la misma carta se le asignaba, si el probando otorgaba su consentimiento informado, una fecha concreta en la que acudir al Centro de Salud de El Coronil para la realización del estudio. También se proporcionó un teléfono de contacto para aclaración de posibles dudas o cambios en la cita.

Una semana antes de la fecha asignada, cada sujeto seleccionado recibió un recordatorio telefónico realizado por los responsables del estudio o las administrativas del Centro de Salud de El Coronil. En los casos en los que no fue posible el contacto telefónico, se intentó localizar al sujeto en su domicilio.

En los niños de 14 años o menos, utilizamos una captación activa entre los padres que acudían al centro de salud al programa de niño sano, así como aquellos padres que acudían con sus hijos como acompañantes. Sólo se incluyeron los que figuraban en la Base de Datos del Usuario.

- **Período de estudio**

El período de inclusión de los probandos fue del 1 al 31 de julio del 2008. El trabajo de campo (encuestas sociodemográfica y clínica, y obtención de muestras biológicas) se realizó en un período de siete días hábiles consecutivos.

Durante los primeros cuatro días, fueron citadas en horario de mañana (10 a 14 horas) siete personas cada media hora. Los siguientes tres días se reservaron para la inclusión de aquellos probandos que no pudieron acudir a la cita inicialmente programada. En estos días se ofertó un horario de mañana y tarde para facilitar la asistencia de los probandos con obligaciones laborales o dificultad para acudir en el turno de mañana.

- **Trabajo de campo**

Los individuos que aceptaron participar en el proyecto de investigación fueron citados en el Centro de Salud, otorgando por escrito su consentimiento informado (anexo 12) antes de su inclusión en el estudio.

A cada uno de los participantes se le realizó una entrevista directa estandarizada que incluyó un cuestionario con preguntas cerradas (anexo 1). Simultáneamente se realizó un examen de salud, con anamnesis y exploración física. Todos los datos fueron recogidos de forma estandarizada en un cuaderno de recogida de datos (CRD) (anexo 2). Seguidamente se obtuvieron muestras biológicas (sangre y lavado orofaríngeo) de los probandos en condiciones de ayunas de al menos ocho horas.

Diariamente se transportaron las muestras en nevera portátil para su procesamiento al Laboratorio de Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

3.2.3. Seguimiento

El seguimiento de todos los sujetos incluidos en el estudio y la necesidad o no de tratamiento quedó en todos los casos a criterio del médico de atención primaria responsable de cada probando.

3.3. Variables de estudio

Las variables fueron obtenidas mediante una encuesta clínica-sociodemográfica estandarizada, así como de muestras de lavado orofaríngeo (LOF) y sangre que incluyeron los siguientes parámetros recogidas en el CRD (anexo 2)

a) Encuesta sociodemográfica y clínica

En la tabla 3 se recogen las variables de la encuesta sociodemográfica y clínica, así como las categorías o unidades de medida consideradas.

b) Variables biológicas

En las muestras de sangre obtenidas se determinaron los niveles sanguíneos de hemoglobina, y un recuento automatizado de leucocitos, neutrófilos, linfocitos totales, linfocitos CD4+ y CD8+, así como niveles séricos de láctico deshidrogenasa (LDH) y proteína C reactiva (PCR).

c) Variables microbiológicas

Diagnóstico molecular de la infección por *P. jirovecii* en lavados orofaríngeos (LOF) y caracterización genotípica en las muestras positivas.

Tabla 3. Encuesta sociodemográfica y clínica

VARIABLES SOCIODEMOGRÁFICAS	UNIDADES DE MEDIDA
Sexo	Hombre/Mujer
Edad	Años
Nivel educativo:	
- Sin estudios	
- Estudios primarios (no educación oficial o no completados)	
- Estudios primarios	Sí/No
- Formación profesional o estudios secundarios	
- Diplomatura	
- Licenciatura	
Contacto laboral con pacientes hospitalizados en los últimos 12 meses	Sí/No
Antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular precoz	Sí/No
Antecedentes personales:	
- Enfermedad respiratoria crónica	
- Diabetes	
- Enfermedad hepática	
- Insuficiencia renal	Sí/No
- Neoplasia	
- Alteraciones de la inmunidad de cualquier origen	
- Transfusión de hemoderivados	
- Factores de riesgo para infección VIH	
Consumo de fármacos con actividad frente a <i>Pneumocystis</i> ¹ :	
- Esteroides	Sí/No
- Cotrimoxazol	
- Macrólidos o fármacos anti <i>Pneumocystis</i> ²	
Presencia de fiebre o síntomas catarrales	Sí/No
Encuesta sobre hábitos	
- Fumador ³	Sí/No/Exfumador
- Tabaquismo ³	Paquetes/Año
- Consumo de alcohol ⁴	Gramos/semana
- Bebedor social ⁴	Sí/No
- Actividad física ⁵	Sí/No
Peso ⁶	Kilogramos
Talla	Centímetros
Perímetro abdominal ⁷	Centímetros

- 1 Se consideró el tratamiento con estos fármacos en los últimos seis meses.
- 2 Como fármacos con actividad anti-*Pneumocystis* se consideraron pentamidina, dapsona, atovaquona, primaquina, clindamicina y pirimetamina.
- 3 Condición de fumador/a. Se consideraron tres categorías: a) Fumador, cuando el consumo es diario durante el último mes, incluyendo cualquier cantidad de

- cigarrillos. b) Ex-fumador, cuando el sujeto lleva más de un año sin fumar. c) No fumador. También se midió el tabaquismo, medido en número paquetes-año.
- 4 Consumo de alcohol. Se interrogó sobre la ingesta semanal de bebidas alcohólicas en las últimas dos semanas, considerando como consumo peligroso o de riesgo cuando la ingesta semanal fue superior a 280 g en el varón o 170 g en la mujer. También se preguntó por el consumo puntual de alcohol, considerándose en este caso como peligroso el consumo de 50 gramos o más en 24 horas, una o más veces al mes.
 - 5 Actividad física en el tiempo libre y en el trabajo. Definimos ausencia de actividad física en el tiempo libre cuando la persona entrevistada declara no hacer ningún ejercicio en su tiempo libre. Definimos ausencia de actividad física en el trabajo cuando su actividad principal consiste en estar “sentado” y “de pie sin esfuerzos” (Sánchez Cruz *et al*, 2010).
 - 6 Peso. Se excluyeron embarazadas.
 - 7 Perímetro abdominal. Se consideró como obesidad central una medida mayor de 102 cm. en hombres y mayor de 88 cm. en mujeres. Para su medida se utilizaron cintas métricas. Se excluyeron embarazadas.

3.4. Procesamiento y análisis de las muestras

3.4.1. Obtención de muestras de lavado orofaríngeo y procesamiento inicial

El ADN de *P. jirovecii* se extrajo de las muestras de lavado orofaríngeo tras proceder al gargarismo de 10 ml de solución de suero fisiológico al 0,9% estéril durante 60 segundos (Respaldiza *et al.*, 2006). Para la extracción de ADN se utilizó un *kit* comercial (QIAamp DNA, Qiagen Inc, Valencia, CA, EEUU); posteriormente las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su procesamiento.

3.4.2. Técnicas de laboratorio

Se amplificaron dos *loci* independientes del genoma de *P. jirovecii*: el gen de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial (mtLSU rRNA) y el gen que codifica la síntesis de la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS).

3.5. Detección de *P. jirovecii* mediante PCR anidada

La amplificación de la región mtLSU rRNA se realizó mediante una técnica de PCR anidada (Helweg-Larsen *et al.*, 2000). Para la primera ronda de amplificación se utilizaron los cebadores externos AZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3') y pAZ102-H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3'), obteniendo un fragmento de 346 pares de bases (pb). Posteriormente se realizó una segunda ronda de amplificación utilizando los cebadores pAZ102-X (5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAGG-3') y pAZ102-Y (5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3'), rindiendo un producto de 260 pb. El programa de amplificación se llevó a cabo en el T1 Thermocycler (Biometra, Gottingen, Germany) tal como se muestra en la tabla 4. Ambas mezclas de reacción se utilizaron a una concentración final de 1,5mM de MgCl₂, 400 µM de cada cebador, 200 µM de cada dNTP, 1X del NH₄ reaction Buffer 10X y 1 unidad de Taq (BioTaq DNA pol. 5U/mcl de Bioline). El volumen final fue de 25 µl (3 µl de DNA total) para la primera ronda y 50 µl (5 µl de la primera PCR) para la segunda ronda.

Tabla 4. Programa para la PCR anidada para mtLSU rRNA

ETAPA	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	1	94	5 minutos
		92	30 segundos
Amplificación	40	55	30 segundos
		72	2 minutos
Terminación	1	72	5 minutos

Los productos de PCR se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa al 2% que contenía bromuro de etidio. Las bandas se visualizaron con el transiluminador (Biodoc-It Imaging System 2UV Transiluminator) y se analizaron por el Doc-It LS Image Analysis Software (UVP Inc).

3.6. Detección del gen DHPS mediante PCR “touchdown”

El gen de copia única de la DHPS se amplificó utilizando los cebadores DHPS-3 (5'-GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AAT C-3') y DHPS-4 (5'-GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC-3') en todas las muestras positivas por PCR anidada en la primera alícuota.

La mezcla de reacción de PCR fue preparada para un volumen final de 25 μ l, utilizando el protocolo de PCR “Touchdown” mostrado en la tabla 5 (Friaza *et al.*, 2010) y obteniendo un fragmento de 370 pb.

Tabla 5. Programa de la PCR “touchdown” para DHPS

ETAPA	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Comienzo	1	95	5 minutos
Desnaturalización	1	94	30 segundos
“Annealing”	10	72-62 (-1° cada ciclo)	30 segundos
Extensión		72	30 segundos
		92	30 segundos
“Annealing”	40	62	30 segundos
		72	30 segundos
Terminación	1	72	5 minutos

Fuente: Friaza *et al.*, 2010

3.7. Caracterización genotípica de *P. jirovecii*

La caracterización genotípica de las muestras positivas se realizó mediante secuenciación directa en el caso de mtLSU rRNA, gen para el que se han descrito seis genotipos, y mediante análisis de polimorfismos según la longitud de los fragmentos obtenidos con enzimas de restricción o RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) en el caso de la DHPS, gen para el que se han descrito cuatro genotipos.

3.7.1. Secuenciación directa del gen mtLSU rRNA

Para la secuenciación del fragmento del gen mtLSU rRNA, el producto de amplificación de la PCR anidada fue purificado (separado del ADN genómico que pudiera contener la solución) mediante cromatografía de exclusión molecular usando columnas de Sephacryl (Sephacryl S-400, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) y reamplificado mediante un *kit* comercial. De esta forma, para cada reacción se añadieron 5 µl del ADN purificado, 4 µl de la mezcla de reacción (ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y un 1µl de los primers a concentración 5 pM (primer X para los directos e Y para los reversos). El pellet de cada muestra fue resuspendido en 25 µl de Hi-Di™ Formamida, para su posterior secuenciación mediante electroforesis capilar en el ABIS Prim 310 genetic analyzer, (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La electroforesis capilar permite separar los diferentes fragmentos de ADN sintetizados durante la reacción de secuenciación y cuyas elongaciones quedaron interrumpidas al incorporar un dideoxinucleótido trifosfato marcado con un fluorocromo. Para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizó el software de Macintosh Sequence Navigator de PE-Applied Biosystem. De esta forma, se detectan los nucleótidos situados en las posiciones 85 y 248 de la muestra problema, identificando así el genotipo (tabla 6, figuras 5 y 6).

Tabla 6. Genotipos del locus mtLSU- rRNA de *Pneumocystis jirovecii* según los nucleótidos presentes en las posiciones 85 y 248 del gen

NUCLEÓTIDO		GENOTIPO
Posición 85	Posición 248	
C	C	1
A	C	2
T	C	3
C	T	4

Figura 5. Secuenciación de la posición 85 del locus mtLSU rRNA de *Pneumocystis jirovecii*

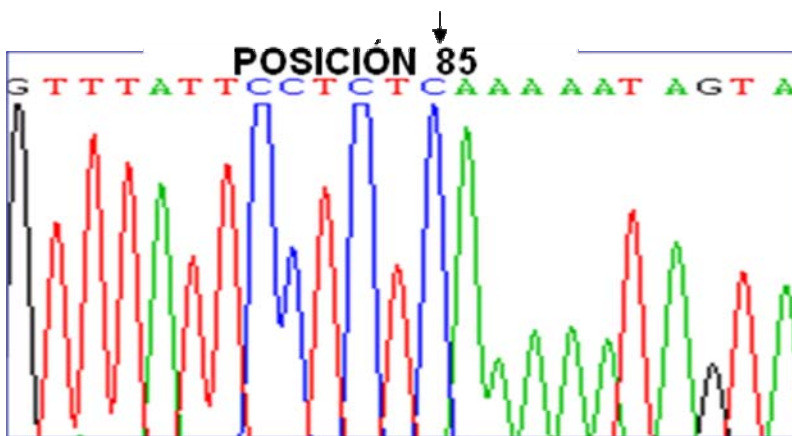
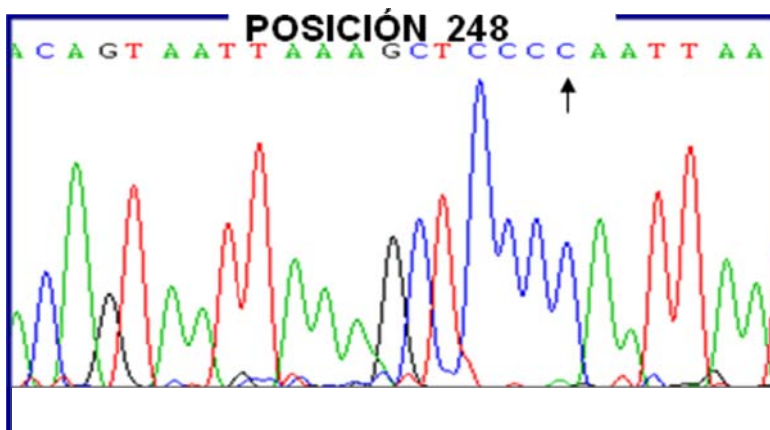


Figura 6. Secuenciación de la posición 248 del locus mtLSU rRNA de *Pneumocystis jirovecii*



3.7.2. RFLP del gen DHPS

Se analizaron las mutaciones del gen DHPS asociados a resistencias a sulfamidas mediante la identificación de polimorfismos según la longitud de los fragmentos obtenidos con enzimas de restricción específicas (RFLP). Para ello, las muestras que resultaron positivas se dividieron en dos alícuotas.

- La primera alícuota se utilizó para identificar la presencia de cepas silvestres frente a la mutación en el codón 55 mediante digestión durante 2 horas a 37 °C utilizando 1 U de la enzima de restricción *AccI* (Roche Diagnostics, Alemania) cuya diana se encuentra en dicho codón de la cepa silvestre.
- La segunda alícuota se utilizó para identificar la presencia de cepas silvestres frente a la mutación en el codón 57 empleando la enzima de restricción *HaeIII* (Roche Diagnostics, Alemania) mediante el mismo protocolo.

Las cepas silvestres presentan en su secuencia de ADN las dianas para estas enzimas de restricción, por lo que cuando una muestra con cepas silvestres (sin mutación en el codón 55) se somete a digestión con la enzima *AccI*, ésta corta el amplicón de DHPS, detectándose 2 fragmentos de ADN, uno de 229 pb y otro de 141 pb, respectivamente; mientras que si la mutación está presente se detecta una sola banda no cortada de 370 pb. De la misma forma, con la enzima *HaeIII* se detectan 2 fragmentos de 221 y 149 pb cuando existe una cepa silvestre sin mutación en el codón 57, y una sola banda no cortada de 370 pb si la mutación está presente (figura 7). Como se muestra en la tabla 7, los diferentes genotipos para el gen DHPS dependen de los aminoácidos presentes en las posiciones 55 y 57.

Figura 7. RFLP del locus DPHS de *Pneumocystis jirovecii*

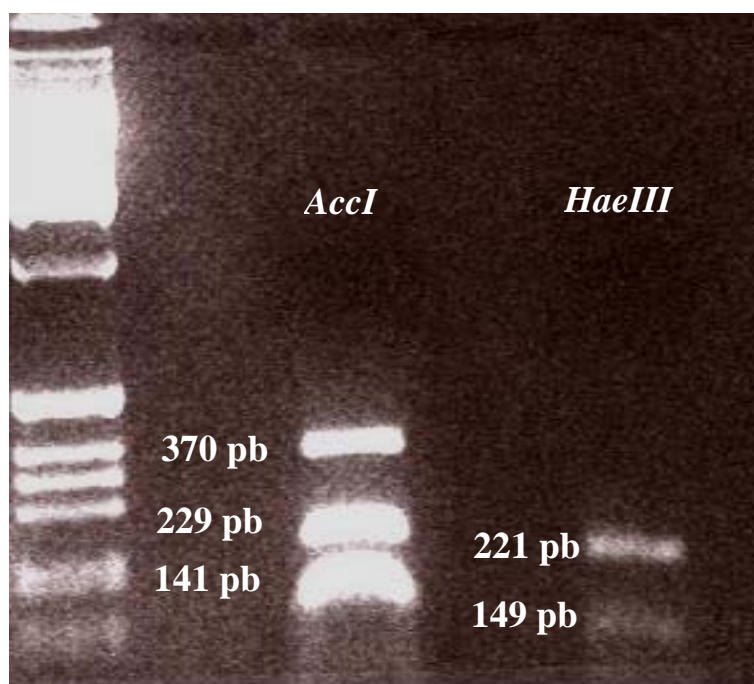


Tabla 7. Genotipos del locus DHPS de *Pneumocystis jirovecii* según los aminoácidos presentes en las posiciones 55 y 57

AMINOÁCIDO		GENOTIPO
Codón 55	Codón 57	
Thr (w)	Pro (w)	1
Ala (m)	Pro (w)	2
Thr (w)	Ser (m)	3
Ala (m)	Ser (m)	4

3.8. Algoritmo diagnóstico y criterios de interpretación de los resultados

El algoritmo seguido para identificar la presencia de ADN de *Pneumocystis jirovecii* en las muestras de lavado orofaríngeo (LOF) consta de los siguientes pasos (figura 8):

- La muestra de lavado orofaríngeo se divide en dos alícuotas.
- Se realiza una PCR anidada del gen mtLSU-rRNA en la alícuota 1 (PCR₁ mtLSU-rRNA)
- Si no existe amplificación en la PCR₁ mtLSU-rRNA la muestra se considera negativa y no se realizan más determinaciones
- Si existe amplificación en la PCR₁ mtLSU-rRNA, en una segunda alícuota se realiza otra PCR anidada del gen mtLSU-rRNA, así como una PCR del gen DHPS

Las muestras de LOF se consideran positivas cuando se cumple alguna de estas condiciones (tabla 8)

- Existe amplificación del gen mtLSU-rRNA en las dos alícuotas
- Existe amplificación del gen mtLSU-rRNA y del gen DHPS en la alícuota 1

La clasificación final de la muestra problema tras el algoritmo diagnóstico se muestra en los valores recogidos dentro de los óvalos de la figura 8, así como en la tabla 8.

Para los fines de este trabajo se consideró que un sujeto estaba colonizado por *Pneumocystis* si en ausencia de síntomas clínicos o signos clínicos de neumonía, el estudio de la muestra de lavado orofaríngeo resultaba positivo. Las personas que no cumplían estos criterios se consideraron como no colonizados.

Figura 8. Algoritmo para el diagnóstico molecular de *P. jirovecii* en las muestras de LOF

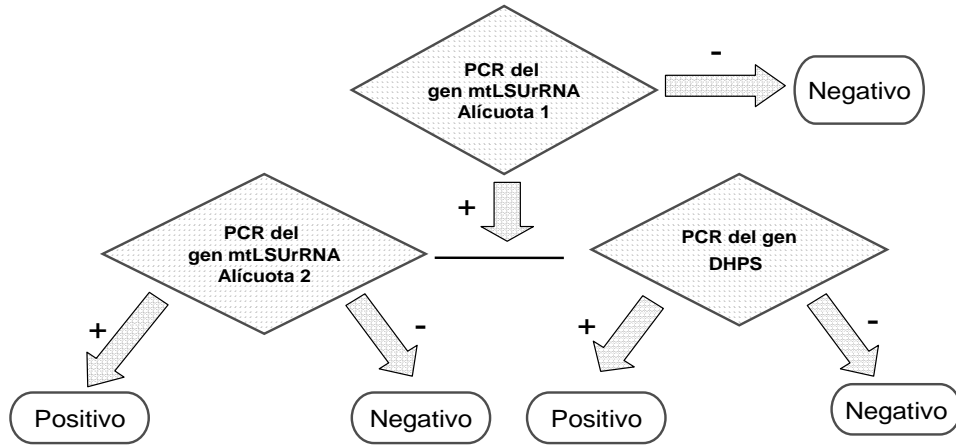


Tabla 8. Interpretación diagnóstica de los resultados del análisis molecular

Genes estudiados			Resultado
PCR 1 mtLSU-rRNA	PCR 2 mtLSU-rRNA	PCR DHPS	
+	+	+	Positivo
+	+	-	Positivo
+	-	+	Positivo
+	-	-	Negativo
-			Negativo

PCR 1, PCR anidada para el gen mtLSU rRNA en la primera alícuota;

PCR 2, PCR anidada para el gen mtLSU rRNA en la segunda alícuota;

PCR DHPS, PCR “touchdown” para el gen DHPS en la primera alícuota.

3.9. Controles de calidad

Las muestras se procesaron en el laboratorio a ciegas y bajo código. La extracción del ADN, la preparación de la mezcla de reacción, la adición del ADN a la mezcla de la PCR, la amplificación por PCR y la detección se realizaron en diferentes áreas del laboratorio. Asimismo, para evitar falsos positivos, se utilizaron puntas con filtro en cada paso.

Por otra parte, en cada experimento se utilizaron controles positivos y negativos de agua estéril que permitieron detectar la posibilidad de contaminación cruzada.

En todas las muestras que resultaron negativas se estudió también la presencia del gen de la beta-globina humana para descartar procesos de inhibición en la reacción de la PCR que pudieran estar condicionadas por la presencia de inhibidores de la amplificación del ADN en la mezcla de reacción o por una deficiente calidad de la muestra. Un resultado positivo utilizando la PCR para la beta-globina humana con los cebadores BGLO-1 (5´-ACA CAA TGT GTT CAC TAG CA-3´) y BGLO-2 (5´-CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC -3´) demostraba que un resultado negativo en la PCR de *P. jirovecii* no era debido a la inhibición de la reacción (Saiki *et al.*, 1985).

Para reforzar los controles de calidad, las dos alícuotas fueron retestadas por una segunda técnica de PCR (PCR a tiempo real), evaluándose la concordancia entre los resultados obtenidos por esta segunda técnica y los observados con el algoritmo diagnóstico del estudio. La descripción de dicha técnica se realiza a continuación.

3.10. Detección de *P. jirovecii* mediante PCR a tiempo real

Para la detección de *P. jirovecii* mediante PCR a tiempo real (PCR-TR) se utilizó el equipo LightCycler® 1.5 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) y el LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany).

La PCR-TR fue realizada en un volumen final de 20 µL, con los cebadores pAZ102-X y pAZ102-Y a una concentración de 250 µM cada uno, MgCl₂ 2 mM y 30 ng de ADN total de la muestra.

Tras una etapa inicial a 95° durante 8 minutos para activar al enzima, la amplificación se realizó en 40 ciclos. El programa incluyó las etapas recogidas en la tabla 9. Las muestras fueron consideradas positivas cuando las dos alícuotas amplificaron antes del ciclo 35.

Tabla 9. Etapas de la PCR a tiempo real

Etapa	Número de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	1	95	8 minutos
		95	5 segundos
Amplificación	40	55	15 segundos
		72	10 segundos
		95	30 segundos
Melting	1	65	30 segundos
		95	10 segundos
Enfriamiento	1	40	30 segundos

3.11. Variables biológicas

El hemograma y la medición de los niveles de séricos de LDH y PCR se realizaron en el Laboratorio Central del Hospital Virgen del Rocío utilizando equipos automatizados comerciales.

El recuento de subpoblaciones linfocitarias se realizó en el Laboratorio de Inmunología del Hospital Virgen del Rocío mediante citometría de flujo con un equipo comercial (Cytomics FC 500, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA).

3.12. Recogida y análisis de datos

Los datos epidemiológicos, clínico-biológicos y microbiológicos se recogieron en un formato estandarizado. Todos los datos fueron traspasados a soporte magnético, mediante procedimientos operativos que contemplaron:

- Doble introducción de información
- Contraste automático de datos
- Detección de valores atípicos
- Rutinas de depuración lógica para detección de inconsistencias

Los datos se introdujeron en una base de datos construida expresamente para este proyecto, garantizando mediante encriptación bajo código el cumplimiento de la normativa vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999).

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 15.0. El archivo de datos se diseñó cumpliendo también las normas de confidencialidad y privacidad señaladas por la normativa vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999).

Para el estudio descriptivo, las variables cuantitativas se expresaron como medidas de tendencia central (media \pm desviación típica) y de dispersión,

y las variables cualitativas como frecuencias. Para el análisis bivariado, se utilizó la distribución chi-cuadrado, t de Student, el test de Anova o una correlación lineal según el tipo de variables a relacionar. Se realizó un análisis multivariante para evaluar la posible asociación entre las diferentes variables clínico-biológicas y la prevalencia de infección.

3.12. Aspectos éticos

En el presente estudio se aplicaron los principios éticos recogidos en la última revisión de la declaración de Helsinki, así como los recogidos en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina, en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos. Se cumplieron todos los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética. El presente estudio contó con la aprobación oficial del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla.

La participación en el proyecto fue voluntaria y la solicitud de participación fue realizada como una propuesta de investigación en salud, independiente del proceso asistencial convencional del sistema sanitario.

A cada participante se le informó por escrito de la naturaleza de la investigación y del uso de la información obtenida, así como de su derecho al acceso, modificación o eliminación de los registros en cualquier momento.

Se garantizó la confidencialidad de sus datos, así como la utilización de los datos para los fines especificados del estudio. Además de la información verbal a los participantes, se solicitó un consentimiento informado por escrito (anexo 1).

Los participantes recibieron un informe con los datos clínicos más relevantes hallados. En caso de observar valores alterados, se aconsejó en la misma carta consulta con su médico de atención primaria.

Toda la información clínico-epidemiológica así como las muestras biológicas obtenidas fueron codificadas y separadas de los datos personales de los sujetos, encriptados y custodiados por la investigadora principal de este proyecto.

Epidemiología de la colonización por *Pneumocystis* en población general

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Sujetos de estudio

4.1.1. Sujetos incluidos

Del total de 189 sujetos obtenidos en el cálculo del tamaño muestral (79 hombres y 90 mujeres) 169 fueron finalmente incluidos en el estudio, lo que globalmente representa un 89,42% del total calculado (IC95% 84,7-94,1). La distribución de sujetos, tanto incluidos como no incluidos, estratificados por quinquenios de edad y sexo, se muestra en la tabla 10.

De estos 169 sujetos incluidos, 23 individuos (13,61%; IC 95% 8,41-18,8) tenían menos de 18 años (no adultos), y 146 (86,39%; IC 95% 81,22-91,56) tenían 18 años o más (adultos). Entre los 23 participante que no eran adultos, 11 eran hombres y 12 mujeres. Entre los 146 adultos, 68 eran hombres y 78 mujeres (tabla 11).

La extracción de sangre no pudo realizarse o sus resultados no estuvieron disponibles en 38 personas (18 hombres y 20 mujeres) por diversos motivos:

- No aceptar la extracción (n= 7)
- No estar en ayunas (n= 11)
- Tener edad pediátrica (n= 14)
- Imposibilidad técnica para la extracción y/o problemas en el procesamiento de las muestras (n=6)

Tabla 10. Distribución de probandos por grupo de edad y sexo obtenidos en el cálculo de la muestra e incluidos en el estudio (prevalencia 12%, error muestral 5%)

Edad	Sexo	Sujetos calculados	Sujetos incluidos	Sujetos no incluidos
0-4	Varón	5	1	4
	Mujer	4	2	2
5-9	Varón	5	2	3
	Mujer	5	4	1
10-14	Varón	6	3	3
	Mujer	6	0	6
15-19	Varón	6	5	1
	Mujer	6	6	0
20-24	Varón	6	4	2
	Mujer	6	8	0
25-29	Varón	8	6	0
	Mujer	7	9	0
30-34	Varón	7	5	2
	Mujer	7	8	0
35-39	Varón	8	8	0
	Mujer	7	7	0
40-44	Varón	8	7	1
	Mujer	7	8	0
45-49	Varón	7	7	0
	Mujer	6	6	0
50-54	Varón	5	5	0
	Mujer	4	4	0
55-59	Varón	5	5	0
	Mujer	5	5	0
60-64	Varón	5	6	0
	Mujer	4	5	0
65-69	Varón	4	6	0
	Mujer	4	3	1
70-74	Varón	3	3	0
	Mujer	5	5	0
75-79	Varón	4	4	0
	Mujer	5	4	1
80-84	Varón	2	1	1
	Mujer	4	4	0
>85	Varón	1	1	0
	Mujer	2	2	0
Total		189	169	28

Tabla 11. Número global de sujetos por grupo etario y sexo obtenidos en el cálculo de la muestra e incluidos en el estudio

		Sujetos calculados	Sujetos incluidos	Sujetos no incluidos
No adultos	Hombres	22	11	11
	Mujeres	21	12	9
	Total	43	23	20
Adultos	Hombres	73	68	6
	Mujeres	73	78	2
	Total	146	146	8
Total		189	169	28

Tabla 12. Distribución por grupo etario y sexo de los individuos no incluidos en el estudio.

	<18 años	≥18 años	Total
Hombres	11	6	17
Mujeres	9	2	11
Total	20	8	28

4.1.2. Sujetos no incluidos

Entre los 28 sujetos que no participaron en el estudio (14,81%; IC95% 9,7-19,87), ocho eran adultos y 20 no, como se muestra en las tablas 10 y 12.

Los adultos no incluidos fueron ocho sujetos (seis varones y dos mujeres), lo que representa el 5,48% de todos los adultos calculados para la muestra. Los sujetos no participantes estaban en la franja de edad comprendida entre 20 y 54 años. Las razones de su no inclusión fueron variadas: un sujeto no fue posible de localizar, cinco tenían jornada laboral incompatible con el horario de recogida de la muestra, un individuo estaban de vacaciones y uno se negó a participar.

Los menores de 18 años no incluidos fueron 20 sujetos (11 varones y nueve mujeres), que constituyeron el 46,51% de todos los no adultos calculados para la muestra. Las razones de su no inclusión variaron según la franja de edad. En los niños de catorce años o menos, donde se hizo captación activa en el centro de salud, las razones fueron principalmente la negativa de los padres o tutores legales de los niños a participar en el estudio.

4.2. Prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en la población general

Todas las 169 muestras de lavado orofaríngeo (LOF) recogidas fueron aptas para su análisis y procesadas.

Siguiendo nuestro algoritmo diagnóstico (Figura 8, tabla 8), 27 de las 169 muestras, o sea, un 15,98% (IC 95% 10,5-21,5) fueron positivas en la primera PCR anidada para el gen mtLSU rRNA (PCR1).

A las 27 muestras positivas, se les realizó una segunda PCR anidada para el gen mt LSU rRNA (PCR2), así como una PCR “touchdown” para el gen de la DHPS (tabla 13).

La PCR para el gen mtLSU rRNA fue nuevamente positiva en una segunda alícuota en 19 de estas 27 muestras, cumpliendo así uno de los criterios de positividad de nuestro estudio.

Por otra parte, la PCR para el gen DHPS fue positiva en 15 de estas 27 muestras. Tres de estas 15 muestras habían resultado negativas en la PCR2 aunque cumplían el segundo criterio de positividad de nuestro estudio. Las restantes 12 muestras fueron positivas por las tres técnicas de PCR ensayadas (PCR1, PCR2 y PCR para el gen DHPS (tabla 13).

De esta forma, considerando los criterios diagnósticos del estudio, 22 sujetos estaban colonizados (tabla 14), lo que representa una prevalencia global de colonización del 13,02% (IC 95% 7,95-18,09, $p < 0,05$).

Tabla 13. Resultados de las técnicas de PCR en las muestras positivas en la primera PCR anidada del gen mtLSU rRNA

Código de muestra	PCR anidada gen mtLSU- rRNA primera alícuota (PCR 1)	PCR anidada gen mtLSU- rRNA segunda alícuota (PCR 2)	PCR gen DHPS primera alícuota
Muestras con al menos PCR 1 y PCR 2 positivas			
CO-109	+	+	+
CO-140	+	+	+
CO-142	+	+	+
CO-184	+	+	+
CO-193	+	+	+
CO-194	+	+	+
Co-214	+	+	+
CO-218	+	+	+
CO-219	+	+	+
CO-225	+	+	+
CO-229	+	+	+
CO-238	+	+	+
CO-139	+	+	-
CO-239	+	+	-
CO-241	+	+	-
CO-267	+	+	-
CO-268	+	+	-
CO-269	+	+	-
CO-276	+	+	-
Muestras con PCR 1 y PCR gen DHPS positivas			
CO-240	+	-	+
CO-270	+	-	+
CO-273	+	-	+
Muestras con sólo PCR 1 positivas			
CO-115	+	-	-
CO-149	+	-	-
CO-230	+	-	-
CO-251	+	-	-
CO-257	+	-	-

+, positivo; -, negativo

Figura 9. Resultado de las técnicas moleculares durante el flujo del algoritmo diagnóstico considerado en el estudio

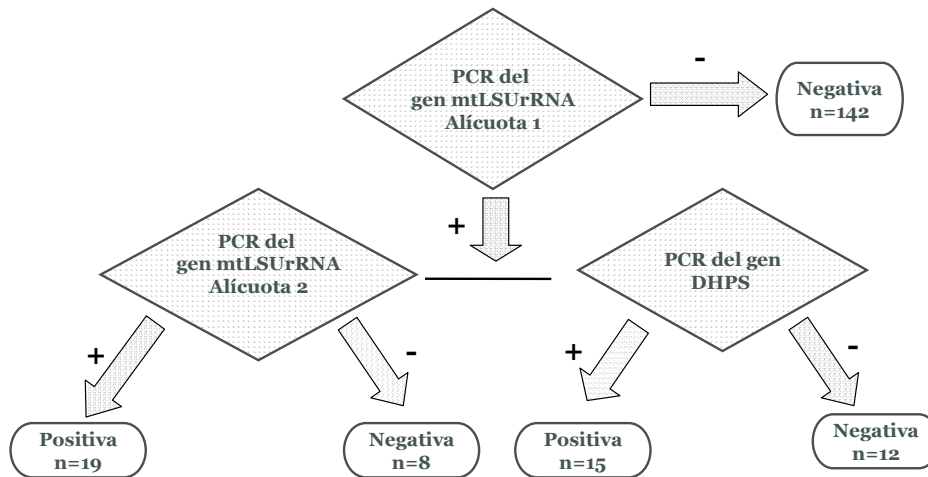


Tabla 14. Resultados de las técnicas moleculares y clasificación final de la muestra según el algoritmo diagnóstico y los criterios de positividad del estudio.

Técnicas moleculares			Clasificación final de la muestra	Número
PCR 1	PCR 2	DHPS		
+	+	+	Positiva	12
+	+	-	Positiva	7
+	-	+	Positiva	3
+	-	-	Negativa	5
-	-	-	Negativa	142
				22 positivas
				147 negativas

PCR 1, PCR anidada para el gen mtLSU rRNA en la primera alícuota;
 PCR 2, PCR anidada para el gen mtLSU rRNA en la segunda alícuota;
 PCR DHPS, PCR touchdown para el gen DHPS en la primera alícuota.

Controles de calidad de los criterios diagnósticos de colonización

Siguiendo los controles de calidad previstos en el estudio, todas las muestras fueron analizadas por una segunda técnica de PCR (PCR a tiempo real; PCR-TR) para el gen mtLSU rRNA en las dos alícuotas disponibles. Los resultados se muestran en las tablas 15 y 16.

Con los criterios diagnósticos de colonización considerados en nuestro estudio, 21 de las 22 (95,45%) muestras de sujetos colonizados por *Pneumocystis* resultaron también positivas en las dos alícuotas por PCR-TR. Por otra parte, 140 de las 147 (95,98%) muestras de individuos no colonizadas fueron también negativas utilizando PCR-TR (tabla 15). La concordancia global entre la clasificación de los sujetos según los criterios diagnósticos de colonización del estudio y los resultados de la PCR-TR utilizada como control de calidad fue del 95,98%. El índice *Kappa* resultante fue de 0,817 (I.C. 95% 0.65-0.94), lo que representa una concordancia diagnóstica muy buena (índice de Kappa 0,6- 0,8 representa buena concordancia, 0,8 a 1 muy buena) (López de Ullibarri & Pita, 1999).

Tabla 15. Control de calidad de los criterios diagnósticos de colonización utilizando PCR-TR

		PCR-TR	
		Positivo	Negativo
Colonización	Sí (n=22)	21	1
	No (n=147)	7	140

PCR-TR, PCR-TR para el gen mtLSU rRNA

Tabla 16. Resultados de las diferentes técnicas diagnósticas del estudio y de los controles de calidad (PCR a tiempo real) en las muestras de los sujetos colonizados por *Pneumocystis*.

Código	PCR 1	PCR 2	PCR DHPS	PCR-TR primera alícuota	PCR-TR segunda alícuota
CO-109	+	+	+	+	+
CO-140	+	+	+	+	+
CO-142	+	+	+	+	+
CO-184	+	+	+	+	+
CO-193	+	+	+	+	+
CO-194	+	+	+	+	+
Co-214	+	+	+	+	+
CO-218	+	+	+	+	+
CO-219	+	+	+	+	+
CO-225	+	+	+	+	+
CO-229	+	+	+	+	+
CO-238	+	+	+	+	+
CO-139	+	+	-	+	-
CO-239	+	+	-	+	+
CO-241	+	+	-	+	+
CO-267	+	+	-	+	+
CO-268	+	+	-	+	+
CO-269	+	+	-	+	+
CO-276	+	+	-	+	+
CO-240	+	-	+	+	+
CO-270	+	-	+	+	+
CO-273	+	-	+	+	+

+, positiva; -, negativa.

PCR 1, PCR anidada para el gen mtLSU rRNA en la primera alícuota;
 PCR 2, PCR anidada para el gen mtLSU rRNA en la segunda alícuota;
 PCR DHPS, PCR touchdown para el gen DHPS en la primera alícuota;
 Q-PCR, PCR a tiempo real.

Concordancia diagnóstica entre PCR anidada y PCR a tiempo real

Respecto a la concordancia entre las dos técnicas, PCR anidada y PCR-TR, de las 19 muestras positivas en las dos PCR anidadas para el gen mtLSU rRNA, el 94,74% (18) resultaron positivas en la PCR-TR en las dos alícuotas. Por otra parte, de las 150 muestras negativas por PCR anidada, el 95,33% (143) resultó también negativo por PCR-TR en las dos alícuotas. Por tanto, la concordancia diagnóstica entre ambas técnicas fue del 95,27% (tabla 17), siendo el índice *Kappa* de 0,79 (I.C. 95% 0,65-0,93), lo que representa una buena concordancia entre ambas técnicas (López de Ullibarri & Pita, 1999).

Tabla 17. Concordancia diagnóstica entre PCR anidada y PCR-TR

		PCR-TR	
		Positivo	Negativo
PCR anidada	Positivo	18	1
	Negativo	7	143

PCR anidada, PCR anidada para el gen mtLSU rRNA;
PCR-TR, PCR a tiempo real para el gen mtLSU rRNA

Agregación familiar

Entre los individuos colonizados, dos tenían familiares (cónyuges) que habían participado en el estudio. Los resultados de las muestras orofaríngeas de estos familiares fueron negativos para *Pneumocystis*.

4.3. Relación entre colonización por *P. jirovecii* y variables sociodemográficas, clínicas y biológicas

Al analizar las características de los individuos incluidos en el estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes colonizados y no colonizados para las diferentes variables demográficas, clínicas y biológicas analizadas (tablas 18, 19 y 21), excepto para los valores de hemoglobina, que fueron significativamente más elevados en los individuos colonizados ($p= 0,037$). En la tabla 22 se muestran las principales características demográficas y clínico-biológicas de los sujetos colonizados.

A continuación se describen de forma pormenorizada los resultados para las diferentes variables analizadas.

Variables sociodemográficas

En la tabla 18 se representan las distintas variables sociodemográficas analizadas, así como su relación con la colonización por *P. jirovecii*. Asimismo, en la tabla 22 podemos encontrar las principales características de los sujetos colonizados.

Sexo

De las 169 muestras obtenidas, las 22 muestras positivas para *P. jirovecii* correspondían a 14 hombres y ocho mujeres. Por tanto, el 17,72% de los hombres y el 8,89% de las mujeres estudiadas estaban colonizados por *Pneumocystis*. Por el contrario, las 147 muestras negativas pertenecían a 65 hombres y 82 mujeres.

Existe una tendencia a una mayor prevalencia de colonización entre los varones que no alcanzó significación estadística (17,72% de varones vs 8,89% de mujeres, $p= 0,089$, tal y como se representa en la figura 10.

Edad

La edad media de los participantes en el estudio fue de 43,68 años, y la de los adultos participantes fue de 47,42, con un rango entre 18 y 89 (IC95% 44,39 - 50,45). No hubo diferencias significativas entre la edad de los participantes y la colonización por *Pneumocystis* (tabla 18).

Todos los individuos colonizados fueron mayores de 18 años, encontrándose en el rango etario de 18 a 64 años el 81,81%. Entre los no colonizados, este porcentaje fue del 68,71%, siendo los menores de edad el 11,56% y los mayores de 65 el 19,73% (figura 11)

Nivel de estudios

Las distintas categorías de la variable se recodificaron en dos categorías (sin estudios o primarios, secundarios o universitarios) para obtener un número de individuos suficiente para el análisis estadístico.

Entre los individuos colonizados, el 26,15% tenían estudios secundarios o universitarios, frente al 18,18% entre los no colonizados ($p= 0,196$, figura 12).

No hubo diferencias significativas en cuanto al nivel de estudios, y la situación de colonización por *P. jirovecii*.

Tabla 18. Variables sociodemográficas en los individuos participantes según colonización por *P. jirovecii*

Variable		Colonización por <i>P. jirovecii</i>		p
		Sí	No	
Sexo ¹	Hombre	17,72(14)	82,28 (65)	0,089
	Mujer	8,89(8)	91,11 (82)	
Edad ²	Total	42,05 ± 19,23 (22)	43,93± 21,64 (147)	0,093
Nivel de estudios	Sin estudios o primarios	15,8 (18)	84,2 (96)	0,196
	Secundarios o universitarios	10,5 (4)	89,5 (34)	

1 Variables cualitativas expresadas en porcentaje por filas (número);

2 Variables cuantitativas expresadas en media ± desviación típica (número)

Figura 10. Distribución de la variable sexo en la población muestral según colonización por *P. jirovecii*.

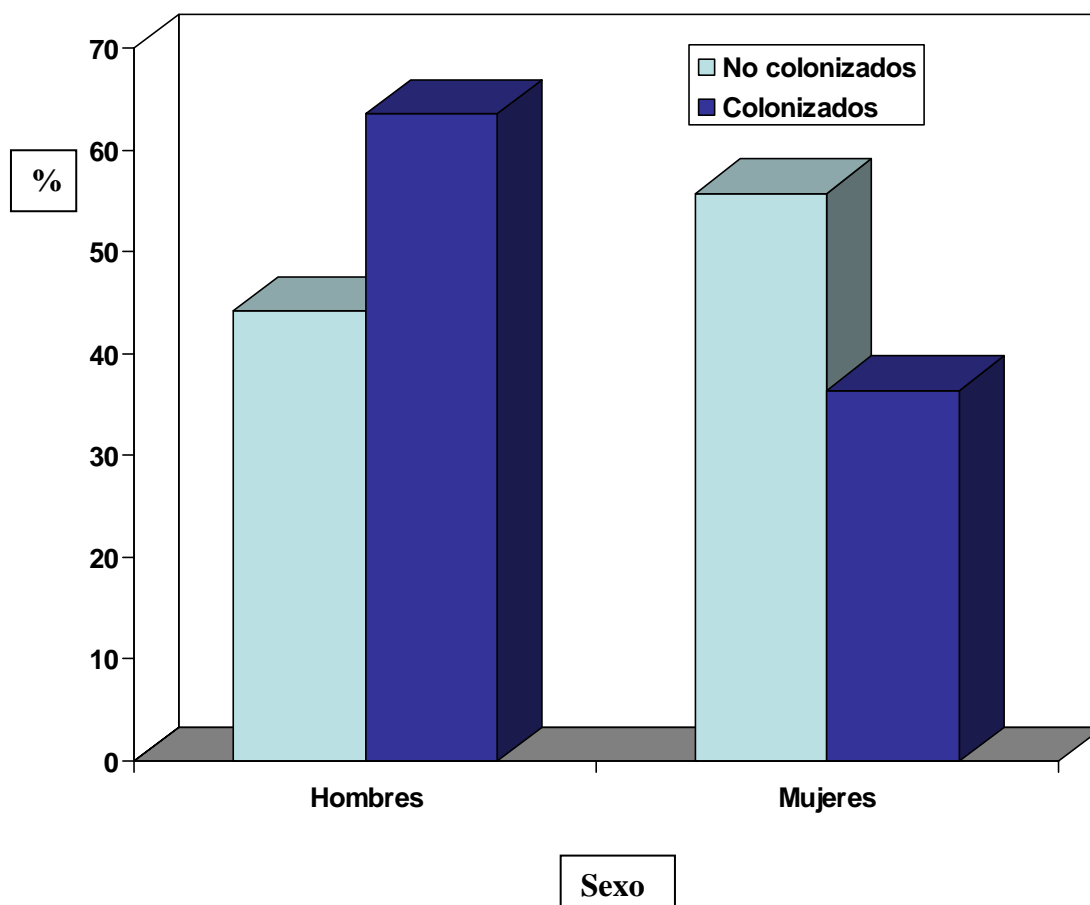


Figura 11. Distribución de la variable edad en la población muestral según colonización por *P. jirovecii*

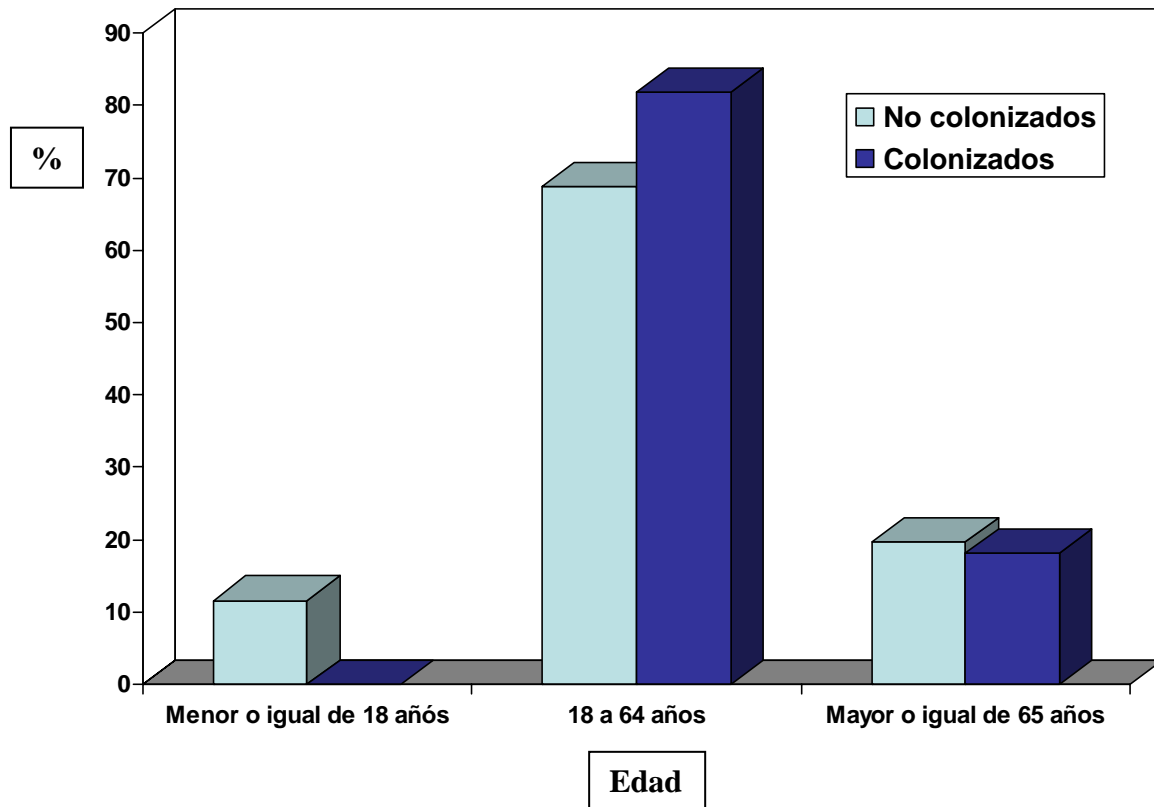
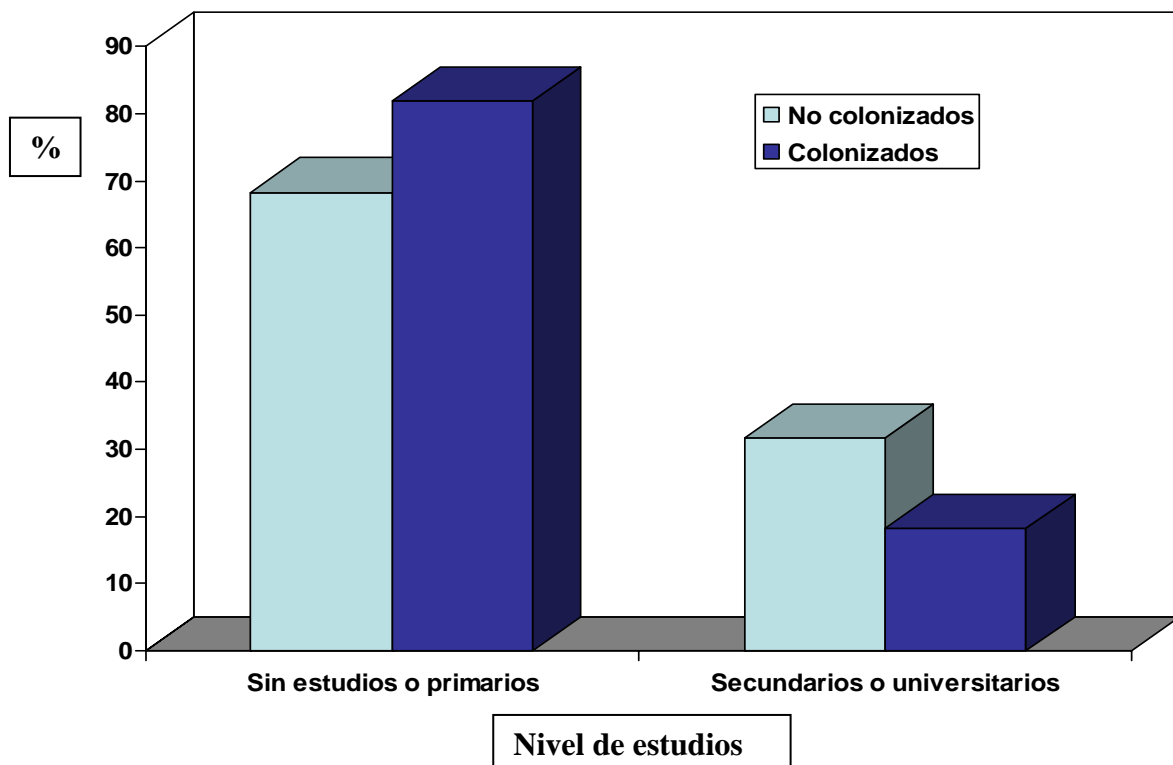


Figura 12. Distribución del nivel de estudios en la población muestral según colonización por *P. jirovecii*



VARIABLES CLÍNICAS

Las variables clínicas analizadas incluyeron hábitos tóxicos, actividad física, consumo de fármacos y medidas antropométricas (anexo 2 y tabla 19)

En cuanto a las variables clínicas el 31,82% de los 22 sujetos colonizados por *Pneumocystis* (todos adultos) eran fumadores activos o exfumadores, el 22,73% tenía consumo de riesgo de alcohol, el 57,14% no realizaba ejercicio de forma habitual, el 54,44% presentaba sobrepeso u obesidad, y el 45,45% obesidad central.

La variable “consumo de tabaco” se recodificó en tres categorías: no fumador, fumador, o exfumador (años). El hábito tabáquico estaba presente en cuatro de los 14 hombres colonizados por *Pneumocystis*, lo que representa un porcentaje de 28,57%. De las nueve mujeres colonizadas, dos fumaban (22,22%). El 32,65% de los sujetos no colonizados por *P. jirovecii* fumaban activamente en el momento del estudio. Para el análisis estadístico, se reagruparon en dos categorías: no fumador y fumador o exfumador. No se observaron diferencias con significación estadística en la distribución de esta variable entre sujetos colonizados y no colonizados ($p=0,88$).

Considerando el consumo acumulado calculado en “paquetes-año”, tampoco hubo diferencias en relación con la colonización por *P. jirovecii*. En los sujetos colonizados, la media de paquetes-año fue de $4,4 \pm 11,53$, frente a los no colonizados, con una media de $5,45 \pm 15,63$ ($p=0,642$). Tanto la variable “consumo de tabaco” como “paquetes-año”, se calculó en los individuos de 18 años o más.

La variable “consumo de alcohol” se recodificó en dos categorías: no bebedor o exbebedor (años) y bebedor. No se encontraron diferencias significativas con la colonización por *Pneumocystis* ($p=0,74$).

El 40,91% de los sujetos colonizados tenía antecedentes patológicos frente al 30% de los no colonizados: sólo uno de los sujetos colonizados padecía

una enfermedad respiratoria obstructiva crónica, otro individuo presentaba una neoplasia (cáncer de pulmón operado), dos habían recibido transfusiones de hemoderivados, y cinco presentaban hipertensión (tabla 22). Entre los sujetos colonizados también se encontraron casos aislados con antecedentes de accidente isquémico transitorio (AIT), dislipemia, encefalopatía y psoriasis.

Respecto al consumo de fármacos, el 9,09% de los individuos colonizados consumieron fármacos con actividad frente a *Pneumocystis* en los últimos 6 meses, frente al 3,56% en los no colonizados ($p=0,21$).

En cuanto al índice de masa corporal, los sujetos presentaban sobrepeso, independientemente de su estado de colonización ($28,15 \pm 6,45$ vs $28,47 \pm 6,86$, $p=0,4$)

Analizando la variable “perímetro abdominal”, aproximadamente la mitad de la población, independientemente de su colonización ($p=0,37$), presentaban obesidad central.

En el análisis bivariado no se observaron diferencias con significación estadística entre los pacientes colonizados y no colonizados respecto a las diferentes variables clínicas analizadas. Algunas variables no fueron analizadas estadísticamente dado el escaso número de individuos presentes en cada categoría (tabla 20).

Tabla 19. Variables clínicas de los individuos participantes según colonización por *P. jirovecii*

Variables		Colonización por <i>P. jirovecii</i>		P
		Positiva	Negativa	
Tabaquismo ¹	No fumador	68,2% (15)	63,3% (93)	0,88
	Fumador o exfumador	31,8 % (7)	36,7% (54)	
Paquetes-año	Total	4,4±11,53 (21)	5,4±15,63 (138)	0,642
Consumo de alcohol ²	No bebedor excesivo o exbebedor	77,3% (17)	74% (108)	0,74
	Bebedor excesivo	22,7% (5)	26% (38)	
Actividad física ³	Sí	42,9% (9)	41,4% (41)	0,9
Antecedentes personales ⁴	Sí	40,9% (9)	42,2% (62)	0,91
Consumo de fármacos ⁵	Sí	9,1% (2)	3,4% (5)	0,21
Índice de Masa Corporal ⁶	Total	28,15±6,45 (22)	28,47±6,86 (145)	0,4
Perímetro abdominal ⁷	Obesidad central	45,5% (10)	55,7% (73)	0,37

Variables cuantitativas expresadas en media±desviación típica (n) ; Variables cualitativas expresadas en proporción en filas (n)

Descripción de las variables analizadas

1 Condición de fumador/a. Se consideraron tres categorías: a) Fumador, cuando el consumo es diario durante el último mes, incluyendo cualquier cantidad de cigarrillos. b) Ex-fumador, cuando el sujeto lleva más de un año sin fumar. c) No fumador. También se midió el tabaquismo, medido en número paquetes-año.

2 Consumo de alcohol. Se interrogó sobre la ingesta semanal de bebidas alcohólicas en las últimas dos semanas, considerando como consumo peligroso o de riesgo cuando la ingesta semanal fue superior a 280 g en el varón o 170 g en la mujer. También se preguntó por el consumo puntual de alcohol, considerándose en este caso como peligroso el consumo de 50 gramos o más en 24 horas, una o más veces al mes.

3 Actividad física en el tiempo libre y en el trabajo. Definimos ausencia de actividad física en el tiempo libre cuando la persona entrevistada declara no hacer ningún ejercicio en su tiempo libre. Definimos ausencia de actividad física en el trabajo cuando su actividad principal consiste en estar “sentado” y “de pie sin esfuerzos” (Sánchez Cruz *et al*, 2010).

4 Antecedentes personales. Se consideró la presencia de alguna de las siguientes condiciones: enfermedad pulmonar crónica, diabetes mellitus, enfermedad hepática, insuficiencia renal, neoplasias, alteración de la inmunidad de cualquier origen, transfusión de hemoderivados, factor de riesgo para infección por VIH (como prácticas sexuales de riesgo, ADVP) y otros.

5 Consumo de fármacos con actividad frente a *Pneumocystis* en los últimos seis meses incluyendo esteroides, cotrimoxazol, macrólidos y otros (pentamidina, dapsona, atovaquona, primaquina, clindamicina y pirimetamina).

6 Índice de masa corporal (IMC), calculado a partir del peso y talla, y definido como peso en kilogramos/talla en metros al cuadrado, con el sujeto vestido con ropa ligera y descalzo. Se utilizó la balanza de brazo de palanca y cinta métrica del Centro de Salud. Se ha utilizado la clasificación propuesta por la OMS en bajo peso (IMC < 18,5), normopeso (IMC entre 18,5 y 24,9), sobrepeso (IMC entre 25 y 29,9), y obesidad (IMC > 30). Medidas ajustadas para edad infantil.

7 Perímetro abdominal. Se consideró como obesidad central una medida mayor de 102 cm. en hombres y mayor de 88 cm. en mujeres. Para su medida se utilizó una cinta métrica del Centro de Salud. Medidas ajustadas para edad infantil. Se excluyen embarazadas.

Tabla 20. Variables clínicas no analizadas estadísticamente en la población de estudio.

Variables	Número de sujetos
Enfermedades respiratorias	1
Neoplasias	1
Alteraciones inmunitarias	0
Trasfusiones hemoderivados	2
Factores VIH	0
Contacto hospitalario	0
Cotrimoxazol	0
Antibióticos actividad anti <i>Pneumocystis</i>	0
Fiebre	0
Catarro	1
Insuficiencia renal	0
Insuficiencia hepática	0

Variables biológicas

Los valores de las diferentes variables biológicas analizadas fueron similares al comparar los individuos colonizados y los no colonizados (tabla 21), con excepción de los niveles de hemoglobina (expresados en g/dl), que resultaron significativamente más elevados entre los sujetos que estaban colonizados ($143,8 \pm 17,72$ vs $135,43 \pm 14,01$, $p=0,037$). La distribución de esta variable fue claramente diferente en los individuos de ambos grupos (figura 13).

Por otra parte, los valores de lactato deshidrogenasa (LDH) fueron también más elevados en los sujetos colonizados, 386,43 UI/l frente a los 360,45 de los no colonizados, aunque esta diferencia no alcanzó significación estadística ($p=0,197$). El patrón de distribución de la variable también fue diferente en ambos grupos (figura 14).

Tabla 21. Variables biológicas en los individuos participantes según colonización por *P. jirovecii*

Variables	Colonización por <i>P. jirovecii</i>		
	Positiva	Negativa	Significación
Hemoglobina (g/dl) ¹	143,8±17,721 (15)	135,43±14,013 (114)	0,037
LDH (UI/l) ¹	386,43±55,17 (14)	360,45±70,65 (78)	0,195
Proteína C Reactiva positiva ²	26,7 (15)	26,3 (124)	0,98
CD4 (cel/mm ³) ¹	908,62±469,64 (13)	895,94±339,91 (77)	0,91
CD8 (cel/mm ³) ¹	513,77±300,67 (13)	502,26±280,49 (77)	0,89
Neutrófilos (cel/mm ³) ¹	4149,3±2098,89 (15)	3935,04±1167,32 (115)	0,55
Linfocitos(cel/mm ³) ¹	2142,8±787,232 (15)	2242,73±796,41 (115)	0,65
Leucocitos(cel/mm ³) ¹	6980±2297,09 (15)	6778,7±1681,5 (115)	0,68

¹Variables cuantitativas expresadas en media±desviación típica (número de sujetos);

²Variables cualitativas expresadas en proporción (número de sujetos); la Proteína C Reactiva se consideró positiva a partir de 5 mg/dl.

LDH, láctico deshidrogenasa.

Figura 13. Distribución de los valores de hemoglobina según colonización por *P. jirovecii*

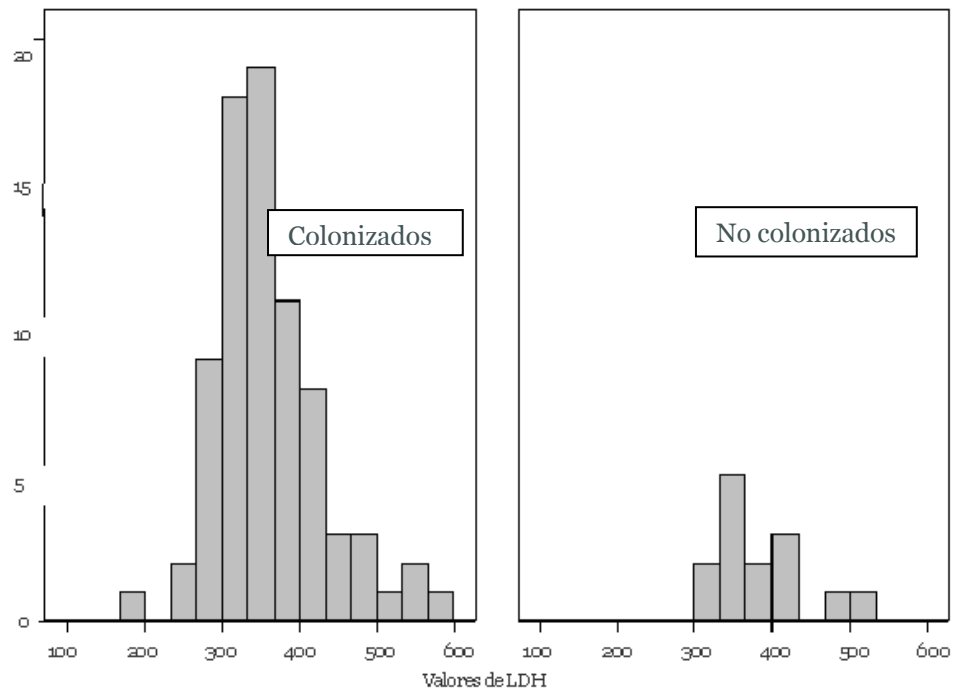
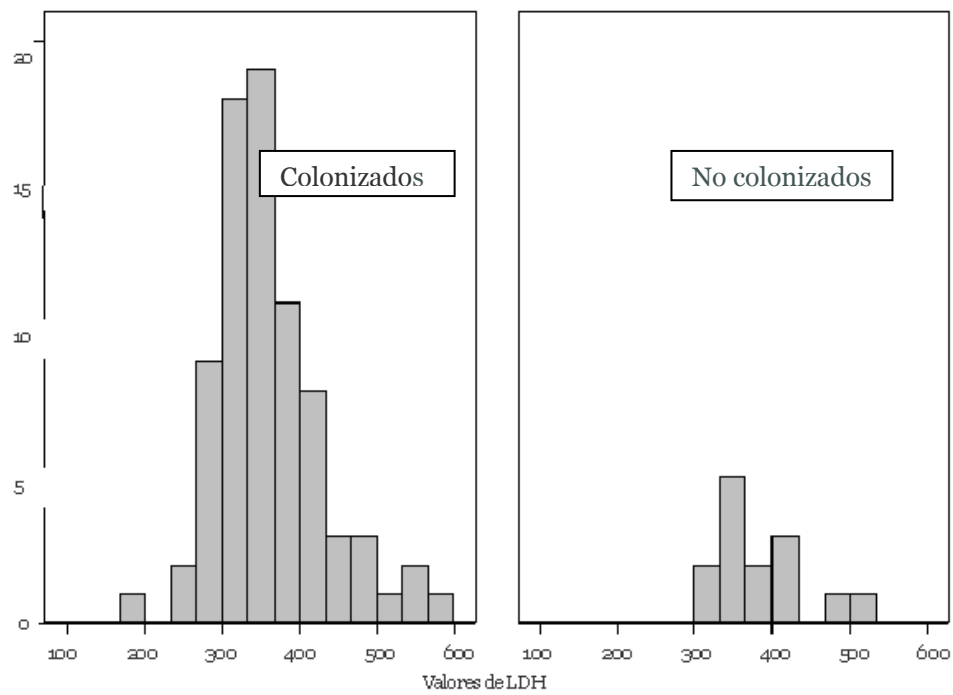


Figura 14. Distribución de los valores de LDH según colonización por *P. jirovecii*



Las características de los individuos colonizados se resumen en la tabla 22.

Tabla 22. Perfil sociodemográfico, clínico y biológico de los pacientes colonizados por *P. jirovecii*

Código	Edad (años)	Sexo	Comorbilidad	Tratamiento esteroideo	Tabaquismo	Hemoglobina (g/dl)	Leucocitos (cél/mm ³)	Linfocitos (cél/mm ³)	CD4+ (cél/mm ³)	CD8	LDH (UI/l)
CO-109	74	Mujer	Trasfusión	No	No	130	6190	2642	1208	479	512,42
CO-139	79	Hombre	Cáncer pulmón	No	Sí	96	6630	1800	693	378	956,71
CO-140	75	Hombre	Trasfusión, AIT	No	No	152	5480	2200	484	1162	1132,23
CO-142	69	Hombre	EPOC	Sí	Exfumador	150	12170	1100	499	127	2438,88
CO-184	19	Hombre	No	No	No	163	5060	2400	536	662	944,03
CO-193	22	Mujer	No	No	Sí	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CO-194	38	Hombre	No	No	Sí	142	7260	2400	ND	ND	ND
CO-214	24	Hombre	No	No	Sí	152	7420	2000	ND	ND	ND
CO-218	45	Hombre	No	No	No	145	3670	1500	728	298	504,12
CO-219	53	Mujer	No	No	No	150	5970	1900	1386	306	430,74
CO-225	55	Mujer	HTA	No	No	127	5120	1700	677	457	756,28
CO-229	64	Hombre	HTA, dislipemia	No	No	138	5950	1900	792	293	751,26
CO-238	34	Hombre	HTA	No	No	139	8080	1300	549	362	1471,77
CO-239	24	Hombre	No	No	No	158	5460	1900	814	378	670,76
CO-240	28	Hombre	No	No	Sí	172	9770	3100	1383	957	706,44
CO-241	39	Hombre	No	No	No	143	10470	4300	2063	820	507,51
CO-267	27	Hombre	HTA, encefalopatía	No	No	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CO-268	29	Mujer	No	No	No	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CO-269	28	Hombre	No	No	No	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CO-270	37	Mujer	HTA	No	No	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CO-273	36	Mujer	No	No	Sí	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CO-276	26	Mujer	Psoriasis	Sí	No	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND, no disponible

4.4. Distribución de genotipos del patógeno y prevalencia de sujetos colonizados con mutaciones asociadas a la resistencia al cotrimoxazol.

Siguiendo la metodología previamente descrita en todas las muestras positivas en la primera PCR anidada para el gen mtLSU-rRNA, se realizó una segunda PCR anidada del mismo gen en una extracción independiente de ADN, así como la amplificación del gen de la DHPS mediante un protocolo de touchdown PCR. Una vez identificadas las muestras que amplificaban para alguno de los dos genes (mtLSU-rRNA o DHPS), se procedió a su caracterización genotípica utilizando las técnicas previamente descritas.

Locus mLSU-rRNA

Teniendo en cuenta que en nuestro algoritmo diagnóstico partía de las muestras positivas en la primera PCR anidada del locus mtLSU-rRNA (figura 8), este gen fue amplificado en las 22 muestras que resultaron positivas según los criterios diagnósticos del estudio. En 20 de estas 22 muestras positivas se obtuvo DNA suficiente para realizar una purificación satisfactoria que permitiera su posterior secuenciación. El genotipo más frecuente fue el 3 que se encontró en 18 de los 20 sujetos (90%), apareciendo el genotipo 1 en las dos muestras restantes (10%) (Tablas 23 y 24).

Locus DHPS

El gen DHPS pudo ser amplificado en 15 de las 22 muestras positivas. De las 15 muestras que amplificaron para este locus sólo 10 contenían ADN suficiente para realizar un estudio de RFLP satisfactorio. En 8 de estos 10 sujetos (80%) se identificó un genotipo 1 (wt/wt) o doble silvestre en las posiciones 55 y 57 y en los dos restantes (20%) cepas con genotipo 3 (wt/57) o con la mutación en el codon 57 asociada a resistencias al cotrimoxazol (tablas 23 y 25).

Tabla 23. Resultados del análisis molecular y tipificación de los locus mtLSU-rRNA y DHPS en las muestras de los sujetos colonizados por *P. jirovecii*

PCR 1	PCR 2	PCR DHPS	Genotipo mt LSU rRNA	Genotipo DHPS
1	1	1	3	1 (wt/wt)
1	1	1	3	1 (wt/wt)
1	1	1	1	1 (wt/wt)
1	1	1	3	NT
1	1	1	3	1 (wt/wt)
1	1	1	3	NT
1	1	1	3	NT
1	1	1	3	1 (wt/wt)
1	1	1	3	3 (wt/57)
1	1	1	3	3 (wt/57)
1	1	1	3	NT
1	1	1	NT	NT
1	1	0	3	
1	1	0	3	
1	1	0	3	
1	1	0	1	
1	1	0	3	
1	1	0	3	
1	1	0	3	
1	1	0	3	
1	0	1	3	1 (wt/wt)
1	0	1	NT	1 (wt/wt)
1	0	1	3	1 (wt/wt)

PCR 1, PCR para el gen mtLSU-rRNA en la primera extracción de ADN;

PCR 2, PCR para el gen mtLSU-rRNA en la segunda extracción de ADN;

PCR DHPS, PCR touchdown para el gen DHPS en la segunda extracción de ADN;

NT, no tipificable; 1(wt/wt), genotipo 1 (silvestre); 3(wt/57), genotipo 3 (silvestre en posición 55 y con la mutación en posición 57 asociada a resistencia a cotrimoxazol)

Tabla 24. Genotipos del gen mtLSU rRNA

Genotipo mtLSU rRNA	n	%
1	2	10
3	18	90

Tabla 25. Genotipos en el gen DHPS

Genotipo DHPS	n	%
1 (wt/wt)	8	80
3 (wt/57)	2	20

1(wt/wt), cepas silvestres;

3(wt/57), cepas con mutación en posición 57 asociada a resistencia a cotrimoxazol)

Epidemiología de la colonización por *Pneumocystis* en población general

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Pneumocystis jirovecii, conocido generalmente como agente causante de neumonía grave en individuos inmunocomprometidos, ha sido recientemente asociado con el desarrollo de infecciones asintomáticas en individuos que no presentan alteraciones en su sistema inmune (Peterson *et al.*, 2005). Los resultados de este estudio de base poblacional permiten objetivar por primera vez la existencia de una elevada prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en adultos inmunocompetentes en el entorno comunitario, concordante con la hipótesis de que la población general puede ser un importante reservorio y fuente de transmisión de esta infección.

En el presente estudio no se ha encontrado asociación entre la presencia de colonización y las diferentes variables sociodemográficas, clínicas ni biológicas evaluadas, algunas de las cuales han sido previamente asociadas a un mayor riesgo de colonización (Tipirneni *et al.*, 2009; Calderón *et al.*, 2004; Maskell *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2001), salvo con los niveles de hemoglobina, que son significativamente más elevados en los probandos colonizados.

Por otra parte esta investigación ha permitido caracterizar la distribución de genotipos del patógeno en la población general de nuestro medio, que presenta un patrón diferente al observado en otros grupos poblacionales de sujetos inmunocompetentes (Tipirneni *et al.*, 2009; Medrano *et al.*, 2005; Maskell *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2001).

Asimismo, en el presente estudio se ha descrito por primera vez la presencia de mutaciones asociadas a resistencia a cotrimoxazol en población general; este hecho podría tener una importante relevancia epidemiológica si se demostrara su posible transmisión a sujetos inmunodeprimidos susceptibles de desarrollar PcP.

5.1. Limitaciones

Una de las posibles limitaciones que cabría considerar en este estudio sería la representatividad de la población.

La localidad estudiada fue el término municipal de El Coronil, un núcleo rural con una población estable de 5.045 habitantes según los datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) en el año 2007, y situado a más de 50 km del hospital más cercano (Hospital Universitario Virgen del Rocío), por lo que puede considerarse una población representativa del ámbito rural y suficientemente distante del ámbito hospitalario.

Para el cálculo del tamaño y estratificación de la población, se tomaron como referencia los datos del INE y la Base de Datos del Usuario (BDU) del año 2007, las dos fuentes oficiales de pirámide poblacional en España y el Sistema Sanitario Público de Andalucía (SSPA), respectivamente. La BDU reúne a todos los usuarios del SSPA, que en zonas rurales abarca a la práctica totalidad de sus habitantes (Puerto Segura E *et al.*, 2010). Por tanto, ambas son fuentes fiables para el cálculo del tamaño y la estratificación por sexo y edad de la población de estudio.

En cuanto al diseño metodológico, el cálculo de la muestra se realizó estratificando según edad y sexo para obtener una imagen más fidedigna de la población. Además en la fase de diseño se controlaron las posibles pérdidas, frecuentes en este tipo de estudios epidemiológicos, considerando en el tamaño muestral final un 10% más de sujetos que los obtenidos en el cálculo inicial. Durante la estratificación por edad y sexo, se redondearon los decimales para conseguir números enteros. De esta manera, el tamaño muestral final tras redondeo por estratos y considerando un 10% de pérdidas estuvo constituido por 214 individuos. Debido a la elevada participación conseguida en el estudio, determinados estratos estuvieron sobrerrepresentados, al acudir todos los individuos de dichos estratos, incluyendo el 10% de pérdidas consideradas *a priori*. Así, en el estudio fueron incluidas finalmente cinco mujeres más de las consideradas en el tamaño muestral precalculado en el estrato de 20 a 34 años,

una mujer más en el rango de 40 a 44 años, y tres varones de 60 a 69 años. Por otro lado, durante el desarrollo del trabajo de campo, cuatro personas más, que en un principio habían rechazado la invitación a participar en el estudio, acudieron al centro de salud en la fecha programada, por lo que finalmente fueron incluidas en la muestra.

El alto grado de colaboración de los habitantes del municipio, con un porcentaje global de participación del 89,42%, permitió conseguir una muestra representativa de la población adulta. No obstante, la participación fue desigual entre individuos adultos y no adultos. En lo que respecta a los probandos adultos, sólo ocho de los inicialmente previstos no entraron en el estudio, lo que representa un 5,48% del total de los adultos calculados.

En los no adultos la participación fue tan sólo del 53,49%, de hecho, la mayoría de los no participantes (71,43%) eran menores de 18 años. Esta diferencia entre ambos segmentos de la población estudiada, adultos y no adultos, puede explicarse por la forma de captación de los probandos. En nuestro estudio, la población infantil evaluada se obtuvo mediante una captación activa entre las madres que acudían al centro de salud al programa de niño sano de la Junta de Andalucía, y entre los padres que acudían con sus hijos como acompañantes. Sin embargo, en los adultos se realizó una citación directa e individualizada con recordatorios, postal y telefónico, en los días previos al período de estudio, lo que reforzó la participación de este segmento de población.

La menor representatividad de la muestra en menores de 18 años, por otra parte, frecuente en este tipo de estudios de base comunitaria, sí podría constituir una limitación a la hora de interpretar los datos sobre prevalencia de colonización en este subgrupo (0%, ninguno de estos probandos resultó positivo), que podría estar infraestimada en nuestro estudio, sobre todo si los comparamos con otros estudios de prevalencia en población infantil (Vargas *et al.*, 2001; Respaldiza *et al.*, 2004).

Por tanto, pensamos que el diseño y ejecución de este estudio permiten asumir que la muestra obtenida es representativa de la población rural adulta de nuestro entorno, con limitaciones para la generalización de los resultados obtenidos en la población infantil. Sin embargo, también cabría plantearse si El Coronil constituye o no un municipio representativo de la realidad rural de nuestro entorno y si los datos obtenidos pueden ser o no extrapolados al resto de localidades.

Otra de las posibles limitaciones de nuestro estudio podría estar en relación con la sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas empleadas para la detección de la colonización por *Pneumocystis*.

Una dificultad para el estudio de la distribución del patógeno en población general es la disponibilidad de muestras no invasivas, que puedan ser obtenidas en todos los casos. Los nuevos métodos de diagnóstico como la PCR anidada, permiten en la actualidad la detección de ADN de *P. jirovecii* procedente de muestras obtenidas con métodos no invasivos y en muestras con baja carga de patógenos (Calderón *et al.*, 2009). Este hecho es importante a la hora de estudiar el fenómeno de la colonización por *Pneumocystis* en individuos no inmunocomprometidos, donde las muestras tienen una baja carga de microorganismos. Asimismo, el grado de participación depende directamente de la facilidad de obtención de la muestra en individuos sanos.

Este estudio en población sana inmunocompetente documenta que el ADN de *P. jirovecii* puede ser detectado mediante técnicas sensibles de amplificación de ADN utilizando muestras biológicas obtenidas de forma no invasivas del tracto respiratorio, concretamente muestras procedentes de lavados orofaríngeos (LOF). Este hecho ya había sido documentado en trabajos previos publicados en los que se han empleado con éxito métodos basados en la PCR para estudiar el fenómeno de la colonización en muestras de lavados orofaríngeos, esputo y exudados nasofaríngeos (Helweg-Larsen *et al.*, 1997; Flori *et al.*, 2004; Durand-Joly *et al.*, 2005).

Una de las principales dificultades encontradas para entender tanto la epidemiología como la historia natural de la infección por *P. jirovecii* es la ausencia de un sistema de cultivo *in vitro*, lo que hace que la base para el diagnóstico de la infección se fundamente en la visualización de los diferentes estadios del ciclo de vida del patógeno o en la detección de fragmentos de su genoma por métodos moleculares para la detección de material genético. Las técnicas moleculares como la PCR, utilizadas en este estudio y en la mayoría de los recientes estudios sobre *P. jirovecii*, han demostrado que la PCR es más sensible y específica que los métodos de tinción (Durand-Joly *et al.*, 2005; Arcenas *et al.*, 2006).

En estos últimos años se han diseñado diferentes técnicas de PCR para identificar algunas de las partes del genoma de *Pneumocystis*. La utilidad de algunas de ellas ha sido evaluada en un estudio reciente (Robberts *et al.*, 2007). En dicho trabajo comprobaron nueve métodos moleculares en diferentes muestras clínicas provenientes de pacientes sudafricanos, observándose que la PCR anidada que utiliza el gen mtLSU rRNA como diana era la técnica de mayor sensibilidad para la detección de *P. jirovecii*, siendo ésta la utilizada en nuestro trabajo.

El principal inconveniente de la PCR es la posibilidad de falsos positivos, descritos en una mayor proporción en los métodos donde se utiliza la PCR anidada (Durand-Joly *et al.*, 2005). Por ello en nuestro estudio exigimos como criterio de positividad de colonización que dos alícuotas fueran positivas mediante esta técnica. Por otra parte, con el objeto de evitar tanto los falsos positivos como los negativos que pudieran presentarse, se realizaron estrictos controles internos, descritos detalladamente en el apartado de Material y Métodos. Además, para evitar sesgos del observador, las distintas muestras se procesaron a ciegas. Todas las muestras negativas para la detección de *Pneumocystis* resultaron positivas para el gen de la beta-globina, descartando así la presencia de inhibiciones en la PCR que pudieran ser causa de resultados falsamente negativos.

En cuanto al diagnóstico de colonización, los criterios se establecieron *a priori* y se orientaron a conseguir una elevada especificidad aún a costa de disminuir la sensibilidad.

Adicionalmente, con el fin de verificar la validez de los resultados obtenidos, las muestras, tanto negativas como positivas, fueron reanalizadas mediante PCR a tiempo real. La alta concordancia obtenida (92,11%) refuerza la robustez de nuestros resultados, teniendo en cuenta que se considera que la PCR a tiempo real aplicada en muestras clínicas no sólo facilita la obtención de un resultado más rápido sino que reduce la posibilidad de contaminación en las muestras (Flori *et al.*, 2004).

Por otra parte, desde el punto de vista biológico, podría plantearse si la detección de ADN del patógeno en vías aéreas superiores es siempre indicativa de infección activa o colonización en el tejido pulmonar. En este sentido, actualmente, está aceptado que la detección de ADN en esputo en pacientes con signos clínicos y radiográficos de neumonía es suficiente para establecer el diagnóstico de PcP (Calderon *et al.*, 2011). En modelos animales, la detección de ADN de *Pneumocystis* en muestras nasales y orales es un indicador de la existencia del organismo en el pulmón (Oz *et al.*, 1999). Asimismo, hay experimentos que muestran que estos microorganismos pueden replicarse en los alveolos pulmonares de ratones inmunocompetentes, conservando su infectividad (Chabé *et al.*, 2004). Los resultados de este estudio apoyan la hipótesis de que la población general humana puede desempeñar un importante papel como reservorio y fuente de infección por *P. jirovecii*, apoyando la naturaleza saprofítica de este patógeno en humanos (Medrano *et al.*, 2005).

Otro aspecto a tener en cuenta es la viabilidad del microorganismo. Los métodos utilizados para la identificación de *Pneumocystis*, según sean histológicos o moleculares, persiguen objetivos diferentes. Los métodos histológicos posibilitan la identificación del agente infeccioso como un organismo completo intacto, tanto en su forma cística como trofozoita, mientras que los métodos moleculares detectan sólo una fracción molecular del organismo (Hughes *et al.*, 2007). Por tanto, hay que tener en cuenta que la

simple presencia de ADN de *Pneumocystis* no es necesariamente un indicador de que el patógeno es viable en la muestra analizada. Para resolver esta dificultad, se han descrito métodos basados en la amplificación del ARN mensajero del microorganismo (de Oliveira *et al.*, 2007). Sin embargo, la identificación de ARN de *Pneumocystis* no se ha investigado en muestras de lavado orofaríngeo donde probablemente su sensibilidad sea baja por la poca carga parasitaria. Por este motivo no se ha planteado su utilización en nuestro estudio.

5.2. Prevalencia de colonización

En las dos últimas décadas la aplicación de técnicas diagnósticas basadas en la amplificación por PCR de regiones específicas del genoma han permitido detectar ADN de *Pneumocystis* en muestras obtenidas por métodos no invasivos y en sujetos con baja carga de patógenos, lo que ha posibilitado el estudio de la colonización en sujetos no inmunodeprimidos. Sin embargo, los estudios realizados previamente en sujetos sanos y/o población general son escasos y sus resultados discrepantes.

En la mayoría de ellos, sobre todo en los realizados inicialmente, no se encontró evidencia de colonización por el patógeno en muestras pulmonares de autopsias (Peters *et al.*, 1992) o de secreciones respiratorias (Wakefield *et al.*, 1990; Leigh *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2003; Nevez *et al.*, 2006). Así, en el primero de ellos, publicado en 1990, se utilizó una PCR simple y no se pudo detectar ADN de *Pneumocystis* en las muestras de lavado broncoalveolar de los diez sujetos sanos evaluados (Wakefield *et al.*, 1990). En 1992, Peters *et al.* utilizando también PCR simple, tampoco pudieron encontrar ADN de *Pneumocystis* en las muestras pulmonares procedentes de la autopsias de 15 sujetos no inmunodeprimidos. En los otros estudios con resultados negativos se utilizó PCR anidada para analizar muestras de esputo inducido (20 sujetos de un grupo control, Leigh *et al.*, 1993), esputo convencional (30 sujetos con recuento de células CD4+ y radiografía de tórax normales, Nevez *et al.*, 2006) y aspirado nasofaríngeo (28 mujeres sanas, Vargas *et al.*, 2003).

En cualquier caso, todos los estudios anteriores incluyeron un bajo número de sujetos (Wakefield *et al.*, 1990; Peters *et al.*, 1992; Leigh *et al.*, 1993; Vargas *et al.*, 2003; Nevez *et al.*, 2006). En algunos, la ausencia de colonización podría estar relacionada con la utilización de técnicas como la PCR simple (Wakefield *et al.*, 1990; Peters *et al.*, 1992; Leigh *et al.*, 1993), menos sensible que la PCR anidada (Robberts *et al.*, 2007) o con el uso de esputos o secreciones nasales que podrían contener un menor número de organismos que el lavado orofaríngeo (Leigh *et al.*, 1993; Nevez *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2003)

Sin embargo, existen otros estudios en los que sí se ha obtenido evidencia de colonización por el patógeno. En el primero de ellos se analizaron mediante PCR anidada muestras de lavado broncoalveolar (LBA) de 169 sujetos sin infección por VIH a los que se había realizado una broncoscopia diagnóstica. El patógeno fue identificado en el 19.5 % de los casos (Nevez *et al.*, 1997), aunque como consecuencia del propio diseño del estudio, la población incluida estaba integrada por individuos con enfermedades respiratorias agudas o crónicas. Asimismo, se ha demostrado la presencia de colonización en profesionales sanitarios hospitalarios en estrecho contacto con pacientes con PcP (Vargas *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2001) o que trabajaban atendiendo a pacientes inmunodeprimidos o a niños con procesos médicos agudos (Durand-Joly *et al.*, 2003) y, por tanto, presumiblemente expuestos al patógeno.

Por otra parte, en un estudio piloto realizado en nuestro entorno y que representa la base que sustenta la hipótesis del presente proyecto de investigación, se analizaron muestras de lavado orofaríngeo mediante PCR anidada en un grupo algo mayor de sujetos sanos y se encontró una prevalencia de colonización del 20% (Medrano *et al.*, 2005). En este estudio se evaluaron 50 profesionales sanos del Hospital Universitario Virgen del Rocío no expuestos al contacto directo con pacientes y que fueron incluidos de forma consecutiva en la Unidad de Riesgo Laboral del Hospital. Dicho estudio permitió por primera vez demostrar que el ADN del patógeno está presente en el árbol respiratorio de sujetos sanos, hallazgo que ha sido confirmado por otros dos estudios realizados más recientemente en Chile (Ponce *et al.*, 2010; Vargas *et al.*, 2010).

En el primero de ellos se estudiaron muestras pulmonares procedentes de autopsias de 77 individuos fallecidos fuera del hospital (accidentes de tráfico, homicidios, suicidios y causas no violentas), detectándose ADN del patógeno en un 64,9% de los casos (Ponce *et al.*, 2010). En el segundo, realizado por el mismo grupo de trabajo, se encontró una prevalencia de colonización del 13% en ancianos (edad > 69 años) analizando 109 muestras de lavados orofaríngeos obtenidas en un centro de consultas externas (Vargas *et al.*, 2010). Estos datos tan discordantes procedentes de una misma zona geográfica plantean dudas sobre la validez de los mismos (Calderon, 2010).

Para poder situar adecuadamente estas cifras, habría que compararlas con la frecuencia de colonización observada en otros grupos poblacionales, como los pacientes inmunodeprimidos con y sin infección por VIH, así como los pacientes no inmunodeprimidos.

Con respecto a la población infectada por VIH, la colonización por *Pneumocystis* es claramente constatable en este segmento de la población, aunque el rango varía según las características de estos individuos y el tipo de PCR utilizado. El amplio rango en las prevalencias puede ser debido tanto a las diferencias existentes en las poblaciones estudiadas como en los métodos de recolección de las diferentes muestras respiratorias, así como a la diferente sensibilidad de las distintas técnicas diagnósticas utilizadas (Calderon, 2009).

La colonización también ocurre en pacientes inmunodeprimidos sin infección por VIH (Morris *et al.*, 2008), con cifras que oscilan entre un 15,9% y el 55,8% (Nevez *et al.*, 1999; Helweg-Larsen *et al.*, 2002; Maskell *et al.*, 2003; Vargas *et al.*, 2003).

Otros estudios sobre el fenómeno de colonización se han realizado en pacientes no inmunodeprimidos con diferentes enfermedades pulmonares.

En nuestro medio utilizando técnicas de PCR anidada se ha encontrado una prevalencia de un 34% en pacientes con enfermedades intersticiales pulmonares (Vidal *et al.*, 2006).

En pacientes con fibrosis quística, la prevalencia utilizando PCR anidada osciló entre un 7,4 y un 22% (Sing *et al.*, 2001; Respaldiza *et al.*, 2005).

En relación con la bronquitis crónica, en nuestro medio se encontró un 10% de prevalencia utilizando técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia (Calderón *et al.*, 1996). Estos mismos autores, utilizando PCR anidada, encontraron un 41% de prevalencia en pacientes con las mismas características (Calderón *et al.*, 2004). Otro estudio más reciente utilizando

también PCR anidada, encontró un 55% de individuos con EPOC colonizados (Calderón *et al.*, 2007). Finalmente en un estudio realizado en pacientes con diversas alteraciones respiratorias en el que se utilizó PCR anidada, se describió una prevalencia de colonización en individuos con EPOC del 41% (Probst *et al.*, 2000).

En cuanto al cáncer de pulmón, un estudio realizado en diez pacientes con cáncer de pulmón de células pequeñas encontró que todos los pacientes presentaban ADN de *Pneumocystis* en el tejido pulmonar, frente a sólo dos de los diez pacientes con cáncer de pulmón diferente al de células pequeñas, y ningún paciente sin otra patología pulmonar subyacente (de la Horra *et al.*, 2004).

En el presente estudio, dado que se realizó en población general donde la prevalencia de inmunodepresión o enfermedades pulmonares es baja, no ha sido posible detectar una asociación entre dichas enfermedades y la presencia de colonización por *Pneumocystis*.

En cuanto a la población infantil de nuestro estudio, una limitación de este estudio puede ser la escasa participación de los menores de 18 años, un 53,48%. Este comportamiento de la población no adulta, por otra parte, frecuente en estudios de tipo observacional, puede sesgar los resultados del presente trabajo, infraestimando los resultados de colonización por *Pneumocystis* en población no adulta, en relación con otros estudios de prevalencia en población infantil sana.

Así, en un estudio previo de 233 niños españoles en esta misma área geográfica, se mostró una prevalencia global de seroconversión de un 73%. La prevalencia aumentaba con la edad desde un 52% a los 6 años hasta un 80% a los 13 años (Respaldiza *et al.*, 2004). Aunque en este estudio no había datos de cuantos niños permanecían colonizados tras la exposición.

Otro estudio similar, realizado en población infantil de Chile, encontró una prevalencia de seroconversión de un 32% en 74 niños de un mes de vida, permaneciendo positivos 4 de 17 niños en las muestras obtenidas dos o tres

meses después. Este estudio incluía niños que acudían a centros de salud pediátricos u hospitales para otros estudios serológicos. La seroconversión llegó al 85% en niños de 20 meses de edad (Vargas *et al.*, 2001).

Los estudios realizados en población infantil han puesto también de manifiesto la presencia de ADN de *P. jirovecii* asociado tanto a enfermedades pulmonares diversas, como al síndrome de muerte súbita del lactante (SMSL). Estos individuos son diferentes a los incluidos en el presente estudio, donde la mayoría de la población está sana.

En niños sanos chilenos con infecciones respiratorias leves, se obtuvo un 32% de colonización de los aspirados nasofaríngeos estudiados (Vargas *et al.*, 2001) Aunque esta prevalencia de colonización se detectó en el contexto clínico de una infección respiratoria leve, el hecho de que el 21% realizara una seroconversión sin antecedentes de síntomas respiratorios sugiere que la infección primaria puede ser también asintomática en niños (Morris *et al.*, 2008).

En niños franceses con bronquiolitis, la prevalencia encontrada fue de un 24% utilizando PCR anidada (Nevez *et al.*, 2001).

Otros estudios realizados en diferentes países también encuentran niveles similares de colonización (14 a 25%) en niños inmunocompetentes con enfermedades respiratorias agudas y crónicas (Kasolo *et al.*, 2002; Totet *et al.*, 2003; Larsen *et al.*, 2007).

Los estudios realizados en autopsias de niños muertos por SMSL sugieren una posible relación entre la colonización por *Pneumocystis* y el SMSL. Así, Vargas *et al.* encontraron que el 25% de los niños muertos por SMSL tenían ADN de *Pneumocystis*, frente al 2,9% de los niños que murieron por otras causas (Vargas *et al.*, 1999). Sin embargo, este mismo grupo, en un estudio más reciente, encontró que la proporción de niños con *Pneumocystis* era similar si morían de SMSL o de otras causas (Vargas *et al.*, 2007)

En otro estudio, la prevalencia mediante microscopía en las autopsias de niños muertos por SMSL en Chile y Reino Unido fue del 32% (Morgan *et al.*, 2001). Utilizando PCR anidada, Vargas *et al.*, notificaron una prevalencia de colonización del 52% en niños muertos en la comunidad, frente al 20% de los niños muertos en el hospital (Vargas *et al.*, 2005). Otro estudio encontró que una prevalencia del 100% en 58 niños muertos tanto por SMSL como por otras causas, utilizando también PCR anidada (Beard *et al.*, 2005).

Las diferentes cifras encontradas pueden ser debidas a las diferentes técnicas de PCR utilizadas, variaciones geográficas así como las distintas características de los sujetos estudiados.

5.3. Factores asociados a la colonización

En el presente estudio se analizó la posible asociación entre la presencia de colonización y diferentes variables sociodemográficas, clínicas y biológicas.

Siguiendo un diseño metodológico sólido, en el estudio se utilizó un cuaderno de recogida de datos (CRD) estandarizado (anexo 1), donde se recopilaban las distintas variables utilizadas. Este hecho permitió una evaluación posterior exhaustiva y homogénea.

Las variables sociodemográficas estudiadas fueron edad, sexo y nivel de estudios. En el análisis, se observa una mayor frecuencia de colonización entre los varones, aunque esa diferencia no llega a ser estadísticamente significativa ($p=0,089$). En este caso cabe plantearse si al aumentar el tamaño de la muestra, esta diferencia de sexos fuera más visible. El perfil de los hombres del municipio de El Coronil es diferente al de las mujeres en cuanto al consumo de tóxicos, sobre todo de tabaco, donde la población es eminentemente masculina. Este hecho dificulta la realización de una regresión logística multivariante utilizando la variable consumo de tabaco y sexo, al estar relacionadas las variables entre sí.

Respecto a las variables clínicas, tampoco se ha encontrado una relación entre la colonización y distintas circunstancias que podrían predisponer a situaciones de inmunodeficiencia, como el consumo de tóxicos (tabaco y alcohol), la malnutrición, alteraciones en el metabolismo de la glucemia, o alteraciones en la función renal. Otras variables clínicas, también relacionadas con situaciones de inmunodepresión, no fueron analizadas estadísticamente al estar prácticamente ausentes en los individuos analizados (tabla 20). Esta constancia en los datos puede deberse a que el ámbito estudiado es poblacional, donde la tasa de prevalencia de estas situaciones de inmunodepresión es muy baja.

Los factores de riesgo relacionados con la colonización por *Pneumocystis* descritos hasta ahora en la literatura han sido evaluados en su mayoría en pacientes infectados por el VIH. Entre las asociaciones encontradas están los

niveles de subpoblaciones linfocitarias $CD4^+ < 50$ células/mm³, la ausencia de quimioprofilaxis con cotrimoxazol, el tabaquismo y la ciudad de residencia (Morris *et al.*, 2008, Wissmann *et al.*, 2010) Estos factores son difíciles de analizar en nuestra población de referencia, al ser la mayoría de los individuos inmunocompetentes y estar el estudio realizado dentro de la misma población.

En cuanto a las variables biológicas analizadas, estudiamos las relacionadas con el sistema inmunitario y la respuesta inflamatoria. Utilizamos la variable LDH como marcador de daño alveolar inespecífico (aunque cuando no existe confirmación microbiológica los valores de LDH aumentados en presencia de una imagen radiográfica sugestiva pueden ser indicativos de PcP), y la variable PCR como marcador inflamatorio inespecífico. También analizamos las series eritrocitaria y leucocitaria, así como las poblaciones sublinfocitarias CD4+ y CD8+.

En nuestro estudio se han observado unos valores de hemoglobina significativamente mayores en los individuos colonizados por *P. jirovecii*. La interpretación biológica de este hallazgo es difícil. Una posible explicación podría ser que los valores elevados de hemoglobina fueran marcadores de una situación de enfermedad pulmonar crónica no evidente. Es cierto que en las enfermedades respiratorias crónicas, y por tanto con mayor probabilidad de colonización por *Pneumocystis*, los valores de hemoglobina están aumentados por la eritropoyetina generada como consecuencia de los episodios de desaturación (Wedzicha *et al.*, 1985). Sin embargo, en nuestra población de estudio no hay suficiente prevalencia de enfermedades pulmonares crónicas como para poder esclarecer este hecho.

Se ha constatado que existe una relación entre gravedad de la EPOC y prevalencia de colonización por *Pneumocystis*, así como que la colonización en pacientes con EPOC está asociada con una respuesta sistémica inflamatoria incrementada (Morris *et al.*, 2012; Calderón *et al.*, 2007; Varela *et al.*, 2003). De nuevo, dada la baja prevalencia de enfermedades respiratorias crónicas en nuestro estudio, no es posible confirmar este aspecto. Por tanto, cabe plantearse

si la elevación de los niveles de hemoglobina en los pacientes colonizados además de una significación estadística tiene un significado clínico-biológico.

Una de las limitaciones a la hora de analizar las diferentes variables estudiadas es el bajo número de individuos colonizados. Este hecho limita la potencia estadística de nuestro estudio para evaluar posibles variables asociadas a un mayor riesgo de colonización, así como no permite la realización de un análisis multivariante.

Otro aspecto a la hora de analizar la prevalencia de *Pneumocystis* es la tendencia estacional de colonización, aspecto que no es posible abordar en nuestro trabajo, ya que se realizó durante el mes de julio. Artículos realizados en España y el Reino Unido sobre el predominio de PcP muestran una asociación entre los meses de invierno y la infección por *Pneumocystis* (Varela *et al.*, 2004; Calderon *et al.*, 2004b; Lubis *et al.*, 2003), mientras que en otro estudio realizado en Alemania se describe una asociación inversa, donde el mayor número de PcP se observa en los meses de verano, sin relación con la lluvia o el viento (Sing *et al.*, 2009). Por su parte, Miller *et al.* analizaron en el Reino Unido los distintos genotipos según predominio estacional, no encontrando ninguna relación entre estas dos variables (Miller *et al.*, 2007).

5.4. Distribución de genotipos

Los estudios de epidemiología molecular permiten conocer la distribución de genotipos de un patógeno presentes en grupos poblacionales específicos de áreas geográficas concretas, combinando los métodos moleculares para la identificación del agente patógeno con las herramientas de epidemiología convencional. La comparación de los diferentes patrones observados proporciona información de gran interés para evaluar tanto la distribución de enfermedades infecciosas como sus mecanismos y fuentes de transmisión. Estos datos resultan de especial interés en el estudio de patógenos con *Pneumocystis* cuya epidemiología es aún escasamente conocida.

Para el estudio de epidemiología molecular, de los 14 diferentes genes caracterizados de *Pneumocystis* (Ripamonti *et al.*, 2009) en el presente análisis se evaluaron el gen de la subunidad mayor del ARN ribosómico mitocondrial (mtLSU rRNA), y el gen que codifica la dihidropteroato sintasa (DHPS), que es la enzima diana de las sulfamidas utilizadas frecuentemente en la profilaxis y tratamiento de la PcP.

El gen mtLSU rRNA fue seleccionado por su alto grado de conservación genética, así como por su utilidad para la detección de diferencias intraespecie entre distintas poblaciones (Beard *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2007). El hecho de ser un gen multicopia, hace además que tenga una elevada sensibilidad diagnóstica.

Por su parte, el gen que codifica la DHPS ha sido analizado por su interés clínico, ya que se han identificado mutaciones puntuales en su secuencia que se asocian a resistencia a las sulfamidas. Sin embargo, al ser un gen unicopia, la capacidad de las diferentes técnicas empleadas para su detección es menor.

Respecto al gen mtLSU rRNA se han descrito seis genotipos (Keely *et al.*, 1995; Latouche *et al.*, 1994, 1996, 1997; Tsolaki *et al.*, 1998; Wakefield *et al.*, 1994), de los cuales cuatro han podido ser identificados en nuestro medio

(Montes-Cano *et al.*, 2004), y de ellos, sólo dos fueron detectados en el presente estudio.

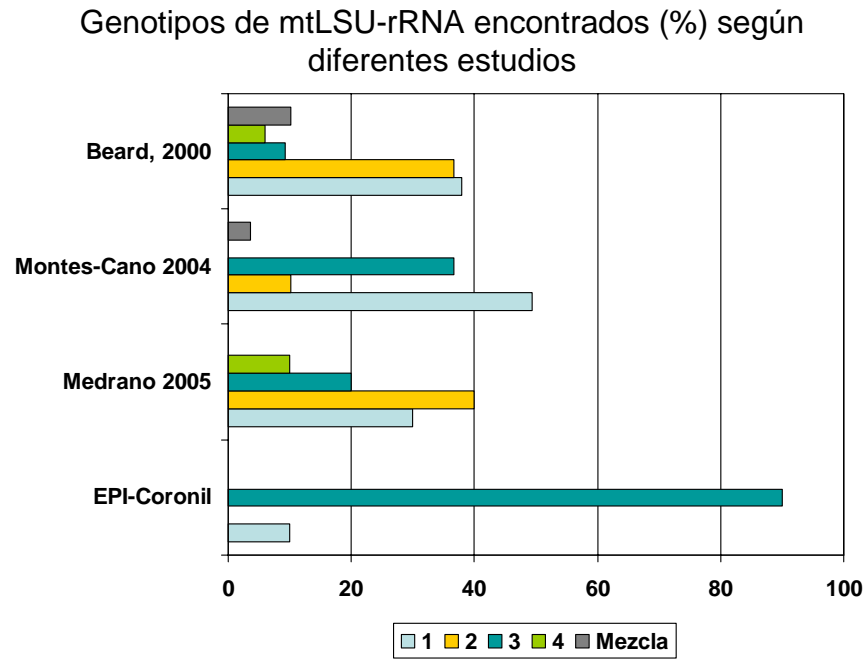
En este estudio de ámbito poblacional, el patrón observado en el gen mtLSU-rRNA en población general ha resultado ser diferente al descrito previamente en otros estudios, como se observa en la figura 15. De esta forma, el subtipo predominante en nuestra población general fue el genotipo 3 (90%), siendo el segundo subtipo aislado el genotipo 1 (10%).

Este patrón de distribución es claramente diferente al observado en los dos grandes estudios sobre variabilidad genética en este gen publicados hasta la fecha en pacientes con PcP (Beard *et al.*, 2000) e individuos colonizados (Montes Cano *et al.*, 2004), así como en el único estudio donde se han tipificado muestras de población general (Medrano *et al.*, 2005). Así, tal y como se representa en la figura 15, en un estudio amplio en el que se incluyeron 312 pacientes con SIDA y PcP en cinco ciudades de Norteamérica, predominaron los genotipos 1 y 2 en una proporción similar (38 y 36,7%, respectivamente), frente a los genotipos 3 y 4 (9,3 y 5,9%, respectivamente) (Beard *et al.*, 2000).

Por otra parte, y ya en nuestro ámbito, otro estudio en el que se incluyeron pacientes con diferentes enfermedades pulmonares, así como también un pequeño grupo de individuos con infección por VIH y PcP, mostró un predominio del genotipo 1 (49,3%), seguidos del 3, con un 36,7% y del 2 (10,1%) (Montes-Cano *et al.*, 2004).

Finalmente, al evaluar un grupo de 50 individuos inmunocompetentes, pertenecientes a un ámbito urbano, aunque con influencia hospitalaria, se notificó un predominio del genotipo 2 (40%), seguidos del 1 (30%) y del 3 (20%). Estos individuos, aunque trabajaban en un centro sanitario, no tuvieron contacto con pacientes ingresados, y desarrollaban su labor en edificios diferentes a los pabellones donde estaban ingresados los pacientes (Medrano *et al.*, 2005)

Figura 15. Genotipos (%) identificados en los estudios publicados más amplios sobre variabilidad genética del gen de mtLSU-rRNA



En cuanto al gen de la DHPS, en el presente estudio se describe por primera vez la existencia en población general de cepas de *Pneumocystis* con mutaciones asociadas a resistencia al cotrimoxazol. Este hallazgo sugiere que la población general podría constituir un nuevo reservorio de cepas potencialmente resistentes al fármaco habitualmente utilizado en la profilaxis y tratamiento de esta infección desde donde podrían ser transmitidas a pacientes inmunosuprimidos susceptibles de desarrollar PcP.

En nuestro estudio se pudieron amplificar mediante PCR fragmentos del gen de la DPHS en 15 de los 22 sujetos colonizados, lo que supone una tasa de amplificación del 68,18%. Esta tasa está en el rango de la observada en un estudio previo, donde también se incluyeron sujetos no inmunodeprimidos colonizados con un porcentaje de amplificación del 70% (Medrano *et al.*, 2005). Esta cifra sólo es ligeramente inferior a la comunicada en pacientes con PcP y que oscila entre un 72 y un 77% (Calderón *et al.*, 2004c; Kazanjian *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999), lo que podría explicarse por la previsible menor carga de microorganismos en pacientes colonizados, lo que escaparía a la resolución de una técnica (PCR “touchdown”) menos sensible que la PCR anidada y cuya diana, además, es un gen unicopia.

Por otra parte, sólo diez de las 15 muestras que amplificaron en la PCR pudieron tipificarse mediante el análisis con enzimas de restricción. En las demás, el producto de amplificación fue muy escaso y al dividirlo en alícuotas para digerirlo con las diferentes enzimas de restricción, la cantidad obtenida no fue suficiente para poder visualizar el resultado en el gel de agarosa. De esta forma, en el presente estudio pudieron identificarse los genotipos para el gen DHPS en diez de los 22 (45,45%) sujetos colonizados. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios realizados en individuos colonizados donde el rango se sitúa entre el 31% (Montes-Cano *et al.*, 2004) y el 53% (Calderón *et al.*, 2004b), y que se explica por los problemas señalados anteriormente (menor carga en colonizados que dificulta la detección de un gen unicopia).

Respecto al patrón de genotipos observado en este estudio de población general, el 80% de los individuos tenían un genotipo 1 o silvestre, mientras que en el restante 20% de los casos se identificaron cepas de genotipo 3 con una mutación en la posición 57 asociada a resistencia a sulfamidas. Ninguno de los dos sujetos con cepas mutantes había tenido exposición previa a las sulfamidas.

Como también ocurría para el gen mitocondrial, el patrón de distribución de genotipos en el locus DHPS en la población general del presente estudio es claramente diferente al observado en otros estudios de variabilidad genética. Los estudios realizados varían según el tipo de pacientes y distribución geográfica, incluyendo pacientes con VIH y PcP norteamericanos (Beard *et al.*, 2000), individuos colonizados con enfermedades crónicas y pacientes con PcP de nuestra área (Montes-Cano *et al.*, 2004), así como en el único estudio en donde se han tipificado muestras de población general y que también fue realizado en nuestro ámbito geográfico (Medrano *et al.*, 2005).

Así, tal y como se muestra en la figura 16, en un estudio amplio en el que se incluyeron 220 pacientes con SIDA y PcP de cinco ciudades norteamericanas predominó el genotipo 4 mutante (49,5%), seguido del genotipo 1 o silvestre (30,9%), y mezclas de diferentes genotipos (11,4%), siendo escasamente observados los genotipos mutantes 2 y 3 (5,9% y 2,3%, respectivamente) (Beard *et al.*, 2000).

Por otra parte, un estudio realizado en nuestro ámbito evaluó 64 pacientes con diferentes enfermedades pulmonares colonizados por el patógeno, así como un pequeño grupo de individuos con infección por VIH y PcP (Montes-Cano *et al.*, 2004), mostrando en ambos grupos un predominio amplio del genotipo 1 silvestre (70% en los pacientes con enfermedades pulmonares vs 54% en pacientes con SIDA y PcP, $p= 0,63$) y la presencia de todos los genotipos mutantes, así como mezclas de genotipos en un 10% de los casos.

Otro estudio realizado en nuestro medio incluyó 50 individuos colonizados sin PcP con diferentes enfermedades pulmonares, así como 25 pacientes con PcP. El genotipo silvestre fue el predominante en ambos grupos

(78% en colonizados frente a un 60% en PcP, $p= 0,17$). Los otros genotipos también estuvieron presentes, así como una mezcla de los distintos genotipos (Friaza *et al.*, 2010).

Finalmente, en el estudio realizado en un pequeño grupo de sujetos de población general de ámbito hospitalario en nuestro medio (Medrano *et al.*, 2005), sólo se observaron cepas con genotipo 1 ó silvestre.

La frecuencia de mutaciones vinculadas a la resistencia a sulfamidas en la población de nuestro estudio (EPI-Coronil) está en el rango encontrado en otros estudios con sujetos no inmunodeprimidos colonizados de nuestro entorno, como se enumera en la figura 16. Así, en dos estudios realizados en nuestra área en 2004 se describe una tasa de mutaciones del 25% al estudiar pacientes con bronquitis crónica (Calderón *et al.*, 2004b) y del 30% al evaluar un grupo más amplio de 64 pacientes VIH negativos con distintas enfermedades respiratorias crónicas (Montes-Cano *et al.*, 2004). Por otra parte, en un estudio realizado en individuos inmunocompetentes que trabajaban en un hospital, aunque sin contacto con los pacientes, la presencia de mutaciones asociadas a resistencia no fue observada en ninguno de los ocho sujetos colonizados en los que pudo realizarse la tipificación del gen DHPS (Medrano *et al.*, 2005). Finalmente, en un trabajo más reciente en el que se incluyeron 50 individuos inmunocompetentes colonizados la frecuencia de mutaciones fue del 22% (Friaza *et al.*, 2010).

En cualquier caso para situar adecuadamente la prevalencia de mutaciones encontrada en nuestro trabajo habría que compararla con la observada en otros estudios realizados en pacientes con infección por VIH y PcP, cuyos resultados se resumen en la tabla 26.

La prevalencia de cepas resistentes en la población general del presente estudio (20%) es solo ligeramente inferior a la encontrada en pacientes con infección por VIH y PcP en España, en donde, salvo en un estudio aislado con serias limitaciones metodológicas (Alvarez *et al.*, 2008) se encuentran tasas de mutaciones del 33-45,5% (Calderon *et al.*, 2004a; Calderón *et al.*, 2004b;

Montes-Cano *et al.*, 2004; Friaza *et al.*, 2010), y está en el rango de la comunicada para sujetos con PcP e infección por VIH en otros países como Portugal (7-27%) (Costa *et al.*, 2003; Esteves *et al.*, 2008), Francia (18-40%) (Santos *et al.*, 1999; Nahimana *et al.*, 2003; Latouche *et al.*, 2003; Magne *et al.*, 2006; Hauser *et al.*, 2010; Magne *et al.*, 2011; Le Gal *et al.*, 2012), Italia (9-35%) (Visconti *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002; Valerio *et al.*, 2007) y Reino Unido (17-36%) (Miller *et al.*, 2003).

La sorprendente baja prevalencia de mutaciones observada por Alvarez-Martínez y colaboradores (Alvarez-Martínez *et al.*, 2008), probablemente esté en relación con el menor rendimiento del abordaje diagnóstico utilizado en este trabajo, ya que las mutaciones fueron identificadas por secuenciación directa en preparaciones histológicas fijadas con alcohol y no mediante RFLP en alícuotas de secreciones respiratorias criopreservadas, como en la mayoría de los estudios publicados (Calderon *et al.*, 2004a; Calderón *et al.*, 2004b; Montes-Cano *et al.*, 2004; Friaza *et al.*, 2010).

No obstante, la prevalencia en el presente estudio es mucho más baja que la observada en pacientes con infección por VIH y PcP en Norteamérica, en donde en la mayoría de los estudios se comunican tasas de mutaciones superiores al 60% (Beard *et al.*, 2000; Beard *et al.*, 2005; Crothers *et al.*, 2005) y superior a la existente en países en vías de desarrollo como China, India, Zimbabue, Brasil o Colombia en donde oscilan entre el 0% y el 7,7% (Kazanjian *et al.*, 2004; Tyagi *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2003; Wissman *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2012). Sin embargo, en otro país del tercer mundo, como Uganda, el 100% de 13 pacientes con VIH y PcP presentaban mutaciones, lo que podría deberse a la utilización frecuente de derivados de las sulfamidas en la profilaxis del paludismo.

El desarrollo de mutaciones en la DHPS se ha asociado en los pacientes con infección por VIH con el uso previo y la duración de la quimioprofilaxis con sulfamidas (Ma *et al.*, 2000; Kazanjian *et al.*, 1998; Kazanjian *et al.*, 2000; Zingale *et al.*, 2003). En los países desarrollados, la utilización de cotrimoxazol en la profilaxis de la PcP es una práctica habitual entre los pacientes infectados

por el VIH con menos de 200 CD4+/mm³ (profilaxis primaria) o que hayan tenido un episodio previo de PcP (profilaxis secundaria) (CDC, 1992). Sin embargo, el uso de sulfamidas o derivados está muy limitado en otras indicaciones, como en el caso de infecciones urinarias o exacerbaciones en EPOC, entidades donde hace unos años era frecuente utilizar sulfamidas.

En este sentido, no es de extrañar que los pacientes con infección por VIH y PcP tengan en general una mayor presencia de mutaciones del gen de la DHPS que los individuos colonizados. Por otra parte, las diferencias geográficas en la prevalencia de mutaciones entre pacientes infectados por el VIH están en gran medida relacionadas con las tasas de utilización de la profilaxis con cotrimoxazol, mucho más elevada en Europa y Norteamérica que en los países en vías de desarrollo.

Sin embargo, en nuestro estudio ninguno de los sujetos con mutaciones en la DHPS había recibido cotrimoxazol en los seis meses previos. La presencia de cepas mutantes en sujetos sin exposición previa a sulfamidas y derivados podría explicarse por el desarrollo de mutaciones espontáneas, fenómeno que es poco probable dada la estabilidad genética del locus DHPS (Lane *et al.*, 1997; Kazanjian *et al.*, 1998), o más probablemente por la transmisión de cepas mutantes desde otros sujetos tratados (Huang *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2010).

Como se ha comentado previamente el estudio de estos polimorfismos del gen DHPS tiene interés clínico, ya que diferentes estudios han encontrado una relación significativa entre la presencia de mutaciones en este gen y el fracaso en la profilaxis con sulfamidas (Kazanjian *et al.*, 1998, Nahimana *et al.*, 2003). Sin embargo, el efecto de estas mutaciones en el resultado del tratamiento es más controvertido, y los resultados de los escasos estudios realizados son inconsistentes a la hora de establecer una clara asociación entre la existencia de mutaciones y una peor respuesta al tratamiento (Stein *et al.*, 2004).

Un aspecto importante que se deriva de la alta tasa de *Pneumocystis* con mutaciones asociadas a resistencia a sulfamidas observada en nuestro estudio,

es la posibilidad de que individuos colonizados por un genotipo mutante, puedan transmitirlo a otros individuos susceptibles al desarrollo de PcP. Existen evidencias al respecto en la literatura, como en es el caso de pacientes expuestos a profilaxis con trimetoprim-sulfametoxazol (TMS) en tres ciudades norteamericanas donde se observaron prevalencias de mutaciones del 54,2%, el 77,8% y el 81,2%, respectivamente (Beard *et al.*, 2000). Este trabajo ha mostrado de forma preocupante que la transmisión de las mutaciones viene ocurriendo de manera significativa en la ciudad de San Francisco (EE.UU.), en la que el 71% de los casos de PcP en individuos con diagnóstico reciente de SIDA ya presentaban *Pneumocystis* con mutaciones de la DHPS.

Nuestro estudio refleja los primeros datos existentes sobre mutaciones de este gen en población general. La relativamente baja proporción de mutaciones encontrada en nuestra población puede atribuirse tanto a sus características rurales, alejada de los ambientes hospitalarios, como a las diferentes características de los individuos, en su mayoría inmunocompetentes, sin enfermedades graves y con escasa exposición a sulfamidas.

La detección de mutaciones asociadas a resistencia a sulfamidas en la población general supone la identificación de un nuevo reservorio y posible fuente de infección de cepas resistentes que podrían ser potencialmente transmisibles a pacientes inmunosuprimidos susceptibles de desarrollar PcP. La magnitud y verdadera trascendencia epidemiológica en este posible nuevo problema de salud pública debería ser evaluada en estudios futuros.

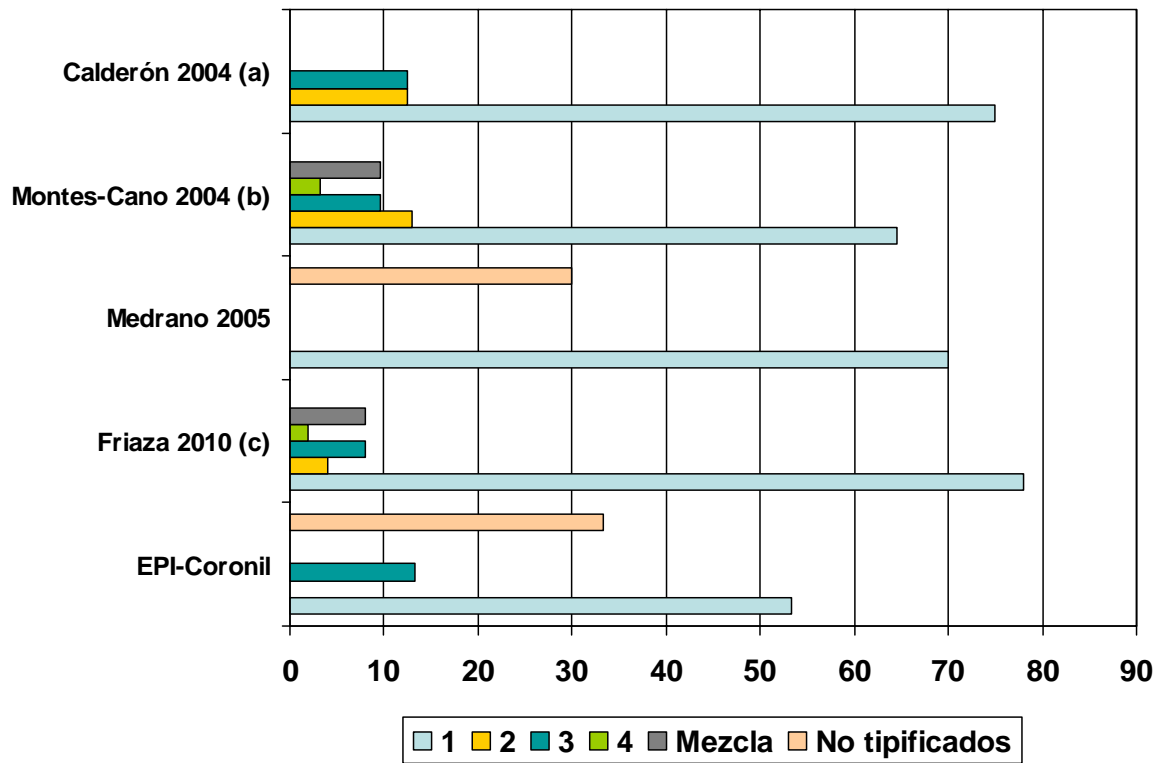
En cualquier caso el hecho de encontrar mutaciones en el gen de la DHPS de *Pneumocystis* en personas no expuestas a sulfamidas aporta una nueva evidencia indirecta sobre la posible transmisión de *Pneumocystis* de persona a persona dentro de un misma área geográfica (Morris *et al.*, 2008) como ya ha sido sugerida por otros resultados publicados (Beard *et al.*, 2000, Huang *et al.*, 2000, Totet *et al.*, 2003, Montes Cano *et al.*, 2004, Calderón *et al.*, 2004).

Tabla 26. Porcentaje de mutaciones en el gen de la DHPS encontrados en individuos inmunodeprimidos

Lugar de estudio	Autores, año	Número individuos	Mutaciones (%)
España	Esteves <i>et al.</i> , 2008	36	29
España	Alvarez Martínez <i>et al.</i> , 2008	188	3,7
España	Montes-Cano <i>et al.</i> , 2004	15	73,3
España	Friaza <i>et al.</i> , 2010a	25	40
España	Alvarez-Martínez <i>et al.</i> , 2010 (1)	43	33
España	Alvarez-Martínez <i>et al.</i> , 2010 (2)	55	5,5
Portugal	Costa <i>et al.</i> , 2003	89	27,7
Portugal	Esteves <i>et al.</i> , 2008	55	8
Francia	Nahimana <i>et al.</i> , 2003	120	36
Francia	Santos <i>et al.</i> , 1999	30	40
Francia	Latouche <i>et al.</i> , 2003	83	17
Francia	Hauser <i>et al.</i> , 2010	194	33
Francia	Le Gal <i>et al.</i> , 2012	66	3
Francia	Magne <i>et al.</i> , 2011	993	18,5
Italia	Visconti <i>et al.</i> , 2001	20	35
Italia	Ma <i>et al.</i> , 2002	139	8
Italia	Valerio <i>et al.</i> , 2007	154	9
Reino Unido	Miller <i>et al.</i> , 2003	25	36
Reino Unido	Miller <i>et al.</i> , 2003	12	17
Suiza	Hauser <i>et al.</i> , 2010	200	7,5
Dinamarca	Helweg-Larsen <i>et al.</i> , 1999	152	20
Polonia	Golab, 2007	25	8
Estados Unidos	Kazanjian <i>et al.</i> , 1998	20	35
Estados Unidos	Kazanjian <i>et al.</i> , 2000	97	43
Estados Unidos	Beard <i>et al.</i> , 2000	220	69
Estados Unidos	Huang <i>et al.</i> , 2000	111	68
Estados Unidos	Kazanjian <i>et al.</i> , 2004	145	40
Estados Unidos	Beard <i>et al.</i> , 2005 (3)	384	69,7
Estados Unidos	Crothers <i>et al.</i> , 2005	215	81
China	Kazanjian <i>et al.</i> , 2004	15	7
India	Tyagi <i>et al.</i> , 2010	16	6,2
Japón	Takahashi <i>et al.</i> , 2000	16	25
Japón	Matsumura <i>et al.</i> , 2011	53	1,9
Zimbabwe	Miller <i>et al.</i> , 2003	14	7
Uganda	Taylor <i>et al.</i> , 2012	13	100
Sudáfrica	Zar <i>et al.</i> , 2004 (4)	30	13
Brasil	Wissmann <i>et al.</i> , 2006	30	13
Colombia	Muñoz <i>et al.</i> , 2012	98	7,7
Australia	van Hal <i>et al.</i> , 2010	60	13

1, período antes de la introducción de la terapia combinada antirretroviral (pre-HART); 2, período HART; 3, muestras pulmonares; 4, niños VIH con PcP.

Figura 16. Genotipos del gen DHPS encontrados (%) en individuos adultos inmunocompetentes según diferentes estudios.



Calderón (a): pacientes con bronquitis crónica;
 Montes-Cano (b): pacientes con enfermedades pulmonares crónicas;
 Friaza (c): pacientes colonizados no VIH

5.5. Perspectivas futuras

El presente estudio aporta una información importante sobre la epidemiología de la colonización por *Pneumocystis* en la población general de nuestra área, mostrando que este fenómeno es más frecuente de lo que se pensaba en sujetos sanos, lo que apoya la naturaleza saprofítica del microorganismo, aunque sería deseable la realización de nuevos estudios en otras áreas geográficas para delimitar la magnitud y variabilidad geográfica del fenómeno en población general humana.

Por su diseño nuestro estudio no permite aclarar si es posible la transmisión de *Pneumocystis* desde la población general a los pacientes inmunodeprimidos, ni definir la historia natural de la infección en sujetos sanos, aunque abre nuevas interrogantes. Es este sentido cuestiones como la transmisibilidad del patógeno, incluyendo la de cepas resistentes a fármacos, desde sujetos colonizados y su relación con la carga de *Pneumocystis*, la duración del estado de colonización y las variables de la que depende y el impacto clínico del fenómeno en sujetos sanos, teniendo en cuenta el efecto proinflamatorio local y sistémico del microorganismo, deberán ser esclarecidos en otros estudios con diferentes abordaje.

Por otra parte, el presente estudio confirma que las nuevas técnicas moleculares permiten detectar de forma muy sensible y específica la presencia del microorganismo en muestras biológicas que pueden ser fácilmente obtenidas de forma no invasiva, aunque es necesario definir y estandarizar los criterios diagnósticos que permitan diferenciar entre la situación de portador asintomático y la de PcP. Es previsible en un futuro próximo el desarrollo de equipos comerciales automatizados de diagnóstico molecular, cuyo menor coste y simplicidad permitiría generalizar su uso rutinario en clínica, sobre todo en países en vías de desarrollo, donde la PcP continúa siendo un problema muy importante por la elevada prevalencia y limitado control de la infección por VIH.

Finalmente, ante el riesgo del desarrollo y extensión de cepas de *P. jirovecii* resistentes a los tratamientos disponibles es necesario continuar investigando para obtener nuevos fármacos más activos y mejor tolerados frente a esta grave infección.

Epidemiología de la colonización por *Pneumocystis* en población general

6. CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) En este estudio se ha demostrado por primera vez la existencia de una elevada prevalencia de colonización por *P. jirovecii*, que se sitúa en el 13% (7,9-18%), en adultos inmunocompetentes de nuestra área concordante con la hipótesis de que la población general podría ser un importante reservorio y fuente de transmisión de esta infección.
- 2) No se ha encontrado asociación entre la presencia de colonización y las diferentes variables demográficas y clínico-biológicas evaluadas salvo en el caso de la hemoglobina, cuyos niveles resultaron más elevados en los pacientes colonizados, aunque la explicación biológica de este hallazgo es incierta.
- 3) El patrón de genotipos observado en la población general, con predominio del genotipo 3 (90% de los casos), es diferente al descrito previamente en pacientes colonizados y con PcP en el ámbito hospitalario, lo que refuerza la idea de la existencia de diferentes circuitos de transmisión.
- 4) Por primera vez se ha descrito la presencia de mutaciones en el gen de la DHPS asociadas a resistencia a sulfamidas en sujetos sanos no inmunocomprometidos que alcanzó un 20% de los casos. Este hecho, observado en personas no tratadas con sulfamidas refuerza la idea de la posible transmisión de *P. jirovecii* con mutaciones del gen de la DHPS entre personas.
- 5) En conjunto nuestros resultados indican que la población general humana es un reservorio para *P. jirovecii* y apoya que forma parte del ciclo de vida de este microorganismo.

Epidemiología de la colonización por *Pneumocystis* en población general

7. BIBLIOGRAFÍA

- Achari A, Somers D, Champness J, Bryant P, Rosemond J, Stammers D. Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Natural Structural Biology*. 1997; 4: 490–7
- 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 jirovecii* 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
- Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, Delcourt P, Billaut P, Camus D. *Pneumocystis* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. *J Eukar Microbiol*. 1994;41(5): 71S
- Aliouat EM, Dujardin L, Martinez A, Duriez T, Ricard I, Dei-Cas E. *Pneumocystis carinii* growth kinetics in culture systems and in hosts: involvement of each life cycle parasite stage. *J Eukaryot Microbiol*. 1999; 46 (Suppl.):116S-117S
- Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, Aliouat EM, Viscogliosi E, Guillot J, *et al.* *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infect, Genet and Evol*. 2008(8):708-26
- Aliouat-Denis CM, Martinez A, Aliouat el M, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E. The *Pneumocystis* life cycle. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 May; 104 (3):419-26. Review
- Allaert A, Joualt T, Asseur PR, Ödberg-Erragut C, Dei-Cas E, Camus D. Detection of Cytokine mRNA in the Lung during the Spontaneous *Pneumocystis carinii* Pneumonia of the Young Rabbit. *J Eukar Microbiol*. 1997;44(s6):45s.
- Alvarez-Martínez MJ, Moreno A, Miró JM, Valls ME, Rivas PV, de Lazzari E, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Spanish HIV-infected patients in the combined antiretroviral therapy era: prevalence of dihydropteroate synthase mutations and prognostic factors of mortality. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008; 62(1):34-43
- Alvarez-Martínez MJ, Miró JM, Valls ME, Mas J, de la Bellacasa JP, Sued O, *et al.* Prevalence of dihydropteroate synthase genotypes before and after the introduction of combined antiretroviral therapy and their influence on the outcome of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-1 infected patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Sep;68(1):60-5
- Ambrose HE, Keely SP, Aliouat EM, Dei-Cas E, Wakefield AE, Miller RF *et al.* Expression and complexity of the PRT1 multigene family of *Pneumocystis carinii*. *Microbiology*. 2004;150(Pt 2):293-300
- Ammich O. Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. *Virchows Arch Pathol Anat* 1938;302:539-54.
- An CL, Gigliotti F, Harmsen AG. Exposure of Immunocompetent Adult Mice to *Pneumocystis carinii* f.sp.muris by Cohousing: Growth of *P. carinii* f.sp. *Muris* and Host Immune Response. *Infect Immun*. 2003 Apr;71(4):2065-70
- Aragao HB. Nota sobre as schizogonias e gametogonidas dos trypanosomas. *Bras Med* 1913;11:271.
- Arcenas RC, Uhl JR, Buckwalter SP, Limper AH, Crino D, Roberts GD, *et al.* A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 54(3):69-75

- 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
- Aspinall TV, Joyson DH, Guy E, Hyde JE, Sims PF. The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2002;185:1637-43
- Bartlett MS, Verbanac PA, Smith JW. Cultivation of *Pneumocystis carinii* with WI-38 cells. *J Clin Microbiol.* 1979;10(6):796-9
- Bartlett MS, Lee CH, Lu JJ, Bauer NL, Bettz JF, McLaughlin GL, *et al.* *Pneumocystis carinii* detected in air. *J Eukaryot Microbiol.* 1994;41(5):75S.
- Bartlett MS, Vermund SH, Jacobs R, Durant PJ, Shaw MM, Smith JW, *et al.* Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *J Clin Microbiol.* 1997;35:2511-3
- Bartlett MS, Lee CH. Airborne spread of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis.* 2010;50(3):266
- Barry SM, Johnson MA. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a review of current issues in diagnosis and management. *HIV Med.* 2001;2(2):123-32
- Baughman RP, Liming JD. Diagnostic strategies in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Front Biosci.* 1998;3:e1-12
- 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. Comparison of 3 tests for the diagnosis of pulmonary pneumocystosis in AIDS patients. *Rev Argent Microbiol.* 2005;37(3):150-2
- Beaglehole R, Bonita R, Kjellström T. *Epidemiología Básica* [Internet]. Reimpresión 2003. Washington:PAHO;1994. Disponible en: http://publications.paho.org/spanish/PC_551_chapter_7.pdf. Consultado el 24 de marzo de 2011
- 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):265-272
- Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, Unnasch TR, *et al.* Strain Typing Methods and Molecular Epidemiology of *Pneumocystis* Pneumonia. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(10):1729-1735
- Beard CB, Fox MR, Lawrence GG, Guarner J, Hanzlick RL, Huang L, *et al.* Genetic Differences in *Pneumocystis* Isolates Recovered from Immunocompetent Infants and from Adults with AIDS: Epidemiological Implications. *J Infect Dis.* 2005. 192 (10):1815-8
- Benecke E. Eigenartige Bronchiolenerkrankung im ersten Lebensjahr. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1938; 31: 402-6.
- Beser J, Hagblom P, Fernandez V. Frequent In Vitro Recombination in Internal Transcribed Spacers 1 and 2 during Genotyping of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol.* 2007 Mar;45(3):881-886
- Board KF, Patil S, Lebedeva I, Capuano S 3rd, Trichel AM, Murphey-Corb M, *et al.* Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Infect Dis.* 2003;187: 576-88

- de Boer MG, Gelinck LB, Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, *et al.* Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2005; 45(3):405-10
- de Boer MG, van Coppenraet B, Gaasbeek A, Berger SP, Gelinck LB; van Houwelingen HC, *et al.* An Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia with 1 Predominant Genotype among Renal Transplant Recipients: Interhuman Transmission or a Common Environmental Source? *Clin Infect Dis.* 2007;44:1143-9
- Du Bois RM, Goh N, McGrath D, Cullinan P. Is there a role for microorganisms in the pathogenesis of sarcoidosis? *J Int Med.* 2003;253:4-17
- Bottaro E. Neumonía por *Pneumocystis carinii* en pacientes con SIDA. Nuevos conceptos para un viejo problema. *Medicina (B Aires).* 1999; 59(2): 187-94
- Boylan CJ, Current WL. Improved rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia: induced laboratory infections in *Pneumocystis*-free animals. *Infect Immun.* 1992 ;60(4):1589-97
- Cabezas Peña C, Robledo de Dios T, Marqués F, Ortega Sánchez-Pinilla R, Nebot Adell M, Megido Badía MJ, *et al.* Grupos de expertos del PAPPS. Recomendaciones sobre el estilo de vida. *Aten Primaria.* 2007;39(Supl 3):27-46
- Calderon EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet.* 1996;347:977
- 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, Varela JM, Medrano FJ, Nieto V, Gonzalez-Becerra C, Respaldiza N, *et al.* Epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia in southern Spain. *Cl Microb and Inf.* 2004 July; 10(7): 673-676
- Calderón EC, de la Horra C, Medrano FJ, López-Suarez A, Montes-Cano M, Respaldiza N, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase (DHPS) mutations in patients with chronic bronchitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:545-9
- Calderón E, de la Horra C, Montes-Cano MA, Respaldiza N, Martín-Juan J, Varela JM. Resistencia genotípica a sulfamidas en pacientes con neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. *Med Clin.* 2004; 122(16):617-9
- Calderón EJ, Rivero L, Respaldiza N, Morilla R, Montes-Cano MA, Friaiza V, *et al.* Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis.* 2007;45:e17-e19
- Calderón EJ. Epidemiology of *Pneumocystis* infection in human. *J Myc Med.* 2009; 19: 270-275
- Calderón EJ. *Pneumocystis* Infection: Seeing beyond the Tip of the Iceberg. *Clin Infection Dis.* 2010; 50(3):354-356
- 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
- Cano S, Capote F, Pereira A, Calderón E, Castillo J. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without predisposing illnesses. Acute episode and follow-up of five cases. *Chest.* 1993; 104: 376-81

- Carini A. Formas de eschizogonia do *trypanosoma lewisi*. Ol Soc Med Cir São Paulo. 1910; 18: 204
- Carini A, Maciel J. Sobre o *Pneumocystis carinii*. Ann Paulistas Med Cir 1914; 2: 170.
- Cere N, Drouet-Viard F, Dei-Cas E, Chanteloup N, Coudert P. In utero transmisión of *Pneumocystis carinii* sp. *F. oryctolagi*. Parasite. 1997; 4 (4): 325-30
- Casanova-Cardiel L, Leibowitz MJ. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. J Eukaryot Microbiol. 1997;44(Suppl):28
- Centers for Disease Control. Recommendations for prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia for adults and adolescents infected with human immunodeficiency virus. MMWR 1992;41: RR-4
- Chagas C. Nova *tripanozomiazaea* humana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz.1909; 1, 159-218
- Chagas C. Nova entidade morbida do homem: regumo general de estudos etiologicos e clinicos. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1911; 3: 219-75.
- Chagas C. Revisao do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. Brazil Med. 1913; 11: 225.
- Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, *et al*. Immunocompetent host as a reservoir of *Pneumocystis* *organism*: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2004;23:89-97
- Chaves JP, David S, Wauters JP, Van melle G, Francioli P. Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a renal transplant recipient. AIDS. 1992;5:927-32
- Chen F, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. Infect Immun.1993; 61: 5406-9
- Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet JC, Nevez G, Garin YJF, *et al*. Quantification and Spread of *Pneumocystis jirovecii* in the Surrounding Air of Patients with *Pneumocystis* Pneumonia. CID. 2010; 51(3):259-265
- Chusid MJ, Heyrman KA. An outbreak of *Pneumocystis carinii* Pneumonia at a Pediatric Hospital. Pediatrics. 1978; 62: 1031-5
- Cisneros JM, Muñoz P, Torre-Cisneros J, Gurgui M, Rodriguez-Hernandez MJ, *et al*. Pneumonia after heart transplantation: a multiinstitutional study. Clin Infect Dis. 1998; 27: 324-31
- Cissé OH, Pagni M, Hauser PM. De novo assembly of the *Pneumocystis jirovecii* genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. mBio. 2012 ; 4(1):e00428-12. <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00428-12>.
- Coles AC. Multiplication forms of *Trypanosoma lewisi* in the body of the rat. Parasitology 1915; 8: 184-6.
- Collin BA, Ramphal R. Pneumonia in the compromised host including cancer patients and trasplant patients. Infect Dis Clin North Am.1998;12(3):781-805
- Contini C, Villa MP, Romani R, Merolla R, Delia S, Ronchetti R. Detection of *Pneumocystis carinii* among children with chronic respiratory disorders in the absence of HIV infection and immunodeficiency. J Med Microbiol. 1998; 47: 329-333
- Correa-Nazco VJ, Miguélez Morales M, Laynez Cerdeña P, Linares Feria M.

- Neumonía por *Pneumocystis carinii* en pacientes con infección por el virus de inmunodeficiencia humana: Revisión de 70 casos. An. Med. Interna. 2000; 17(12): 55-56.
- Costa MC, Helweg-Larsen J, Lundgren B, Antunes F, Matos O. Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portuguese patients with *Pneumocystis* pneumonia. International Journal of Antimicrobial Agents. 2003; 22:516-520
- Cregan P, Yamamoto A, Lum A, VanDerHeide T, MacDonald M, Pulliam L. Comparison of four methods for rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. J Clin Microbiol. 1990; 28(11): 2432-6
- Croix DA, Board K, Capuano S 3rd, Murphey-Corb M, Haidaris CG, Flynn JL, *et al.* Alterations in T lymphocyte profiles of bronchoalveolar lavage fluid from SIV- and *Pneumocystis carinii*-coinfected rhesus macaques. AIDS Res Hum Retroviruses. 2002;18:391-401
- Crothers K, Beard CB, Turner J, Groner G, Fox M, Morris A, *et al.* Severity and outcome of HIV- associated *Pneumocystis* pneumonia containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. AIDS. 2005; 19 (8): 801-5
- Cushion MT, Ebbets D. Growth and metabolism of *Pneumocystis carinii* in axenic culture. J Clin Microbiol. 1990;28(6):1385-94
- Cushion MT. *Pneumocystis*: unraveling the cloak of obscurity. Trends in Microbiology. 2004 May;12(5):243-249
- Cushion MT, Smulian AG, Slaven BE, Sesterhenn T, Arnold J, Staben C, *et al.* Transcriptome of *Pneumocystis carinii* during fulminate infection: carbohydrate metabolism and the concept of a compatible parasite. PLoS One. 2007;2(5):e423
- Damiani C, Choukri F, Le Gal S, Menotti J, Sarfati C, Nevez G, *et al.* Possible nosocomial transmission of *Pneumocystis jirovecii*. Emerg Infect Dis. 2012 ;18 :877-8
- Davis JL, Welsh DA, Beard CB, Jones JL, Lawrence GG, Fox MR, *et al.* *Pneumocystis* colonization is common among hospitalised HIV infected patients with non-*Pneumocystis* pneumonia. Thorax. 2008; 63: 329-34
- Dei-Cas E, Brun-Pascaud M, Bille-Hansen V, Allaert A, Aliouat EM. Animal models of pneumocystosis. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998 ;22(1-2):163-8
- Dei-Cas E, Mazars E, Aliouat EM, Nevez G, Cailliez JC, Camus D. The host-specificity of *Pneumocystis carinii*. J Mycol Med. 1998; 8: 1-6
- Dei-Cas E. *Pneumocystis* infections: the iceberg? Med Mycol. 2000;38(Suppl 1):23-32
- Dei-Cas E, Aliouat EM, Cailliez JC. Cellular structure. 2004 In PD Walzer, MT Cushion, *Pneumocystis* pneumonia, 3rd ed., Marcel Dekker Inc, New York, p. 61-94.
- Djawa K, Daly KR, Vargas SL, Santolaya ME, Ponce CA, Bustamante R, *et al.* Seroepidemiological study of *Pneumocystis jirovecii* infection in healthy infants in Chile using recombinant fragments of the *P. jirovecii* major surface glycoprotein. Int J Infect Dis. 2010;14(12):e1060-6
- 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
- Demanche C, Berthelemy M, Petit T, Polack B, Wakefield AE, Dei-Cas E, *et al.* Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host

- specificity and suggests coevolution. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39: 2126-33
- Demanche C, Wanert F, Herrenschmidt N, Moussu C, Durand-Joly I, Dei-Cas E, *et al.* Influence of climatic factors on *Pneumocystis* Carriage within a Socially Organized Group of Immunocompetent Macaques (*Macaca fascicularis*). *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50(1):611-3
- Demanche C, Wanert F, Barthelemy M, Mathieu J, Durand-Joly I, Dei-Cas E, *et al.* Molecular and serological evidence of *Pneumocystis* circulation in a social organization of healthy macaques (*Macaca fascicularis*). *Microbiology.* 2005;151:3117-25
- Dimonte S, Berrilli F, D'Orazi C, D'Alfonso R, Placco F, Bordi E, *et al.* Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infect, Genet Evol.* 2013;14:68-72
- Dumoulin A, Mazars E, Seguy N, Gargallo-Viola D, Vargas S, Cailliez JC, *et al.* Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;19(9):671-8
- Durand-Joly I, Aliouat EM, Recourt C, Guyot KF, Wauquier M, Camus D, *et al.* *Pneumocystis carinii* f.sp.*hominis* Is Not Infectious for SCID mice. *J Clin Microbiol.* 2002; 40(5):1862-5
- Durand-Joly I, Soula F, Chabe M, Dalle JH, Lafitte JJ, Senechal M, *et al.* Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: a challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50 (Suppl):614-5
- Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Immunology and Medical Microbiology.* 2005;45: 405-410
- Egan JJ, Woodcock AA, Stewart JP. Viruses and idiopathic pulmonary fibrosis. *Europ Resp J.* 1997;10:1433-1437
- Eisen D, Ross BC, Fairbairn J, Warren RJ, Baird RW, Dwyer B. Comparison of *Pneumocystis carinii* detection by toluidine blue O staining, direct immunofluorescence and DNA amplification in sputum specimens from HIV patients. *Pathology.* 1994;26:198-200
- Eriksson, O. *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (Pneumocystidaceae, Pneumocystidales, Ascomycota). *Syst. Ascomycetum.* 1994;13:165-80
- Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, Costa MC, Calderon EJ, Antunes F, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:356-362
- Esteves F, Gaspar J, Marques T, Leite R, Antunes F, Mansinho K, *et al.* Identification of relevant single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: relationship with clinical data. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16:878-84
- Fisher JM, Keely SP, Stringer JR. Evolutionary Rate of Ribosomal DNA in *Pneumocystis* Species is Normal Despite the Extraordinarily Low Copy-Number of rDNA Genes. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53(S1):S156-S158
- Fisk DT, Meshnick S, Kazanjian PH. *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Patients in the Developing World Who Have Acquired Immunodeficiency Syndrome. *CID.* 2003; 36:70-78
- Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, *et al.* Comparison

- between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from broncho-alveolar lavage specimens. *J Med Microbiol.* 2004;53(Pt 7):603-7
- Fraire AE, Kemp B, Greenberg SD, Kim HS, Estrada R, McBride RA. Calcofluor white stain for the detection of *Pneumocystis carinii* in transbronchial lung biopsy specimens: a study of 68 cases. *Mod Pathol.* 1996; 9(8):861-4
- Frenkel JK, Good JT, Shultz JA. Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse and chemotherapy. *Lab Invest.* 1966; 15(10):1559-77
- Frenkel JK. *Pneumocystis jirovecii* n.sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1976; 43:13-30
- Friaza V, Montes-Cano MA, Respaldiza N, Morilla R, Calderón EJ, de la Horra C. Prevalence of dihydropteroate synthase mutations in Spanish patients with HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2009; 64:104-5
- Friaza V, Morilla R, Respaldiza N, de la Horra C, Calderón EJ. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations among colonized individuals and *Pneumocystis* pneumonia patients from Spain. *Postgrad Med.* 2010; 122(6):24-8
- Friaza V, de la Horra C, Rodríguez-Domínguez MJ, Martín-Juan J, Cantón R, Calderón EJ, *et al.* Metagenomic analysis of bronchoalveolar lavage samples from patients with idiopathic interstitial pneumonia and its antagonistic relation with *Pneumocystis jirovecii* colonization. *J Microb Methods.* 2010;82: 98-101
- Galli VB. Parasitologische Untersuchungen und Beiträge zur parasitologischen Technik *Zentralbl Bakteriol.* 1917; 79: 41.
- Gianella S, Haeberli L, Joos B, Ledergerber B, Wuthrich RP, Weber R, *et al.* Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2009: 1-10. DOI:10.1111/j.1399-3062.2009.00447.x
- Gigliotti F, Harmsen AG, Wright TW. Characterization of Transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* through Immunocompetent BALB/c Mice. *Infect. Immun.* 2003;71(7): 3582-6
- Golab E. Use of restriction fragment length polymorphism to detect dihydropteroate synthase gene mutations in strains of *Pneumocystis jirovecii* isolated in Poland. *Med Dosw Mikrobiol.* 2007;59(2):177-82
- 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;301:267-2
- Gutierrez S, Respaldiza N, Campano E, Martinez-Risquez MT, Calderon EJ, de la Horra C. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. *Parasite.* 2011;18:1-6
- van Hal SJ, Gilgado F, Doyle T, Barratt J, Stark D, Meyer W, *et al.* Clinical Significance and Phylogenetic Relationship of Novel Australian *Pneumocystis jirovecii* Genotypes. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1818-23
- Halford JA, Shield PW, Wright RG. The value of direct fluorescent antibody (DFA) testing for the detection of *Pneumocystis carinii* in cytological specimens. *Cytopathology.* 1994;5(4):234-42

- Hauser PM, Francioli P, Bille J, Telenti A, Blanc DS. Typing of *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* by single-strand conformation polymorphism of four genomic regions. J Clin Microbiol. 1997;35:3086-91
- Hauser PM, Blanc DS, Bille J, Francioli P. Typing methods to approach *Pneumocystis carinii* genetic heterogeneity. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998;22 (1-2):27-35
- Hauser PM, Blanc DS, Sudre P, Senggen ME, Nahimana A, Bille J, *et al.* Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. AIDS. 2001;15:461-6
- Hauser P, Rabodonirina M, Nevez G. Hypothetical *Pneumocystis jirovecii* Transmission from Immunocompetent Carriers to Infant. Emerg Infect Dis. 2009;15(3):506-7
- Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, Bille J, Rabodonirina M. Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. Clin Infect Dis. 2010;51(4):e28-33
- Hauser P, Bille J, Lass-Flörl C, Geltner C, Feldmesser M, Levi M, *et al.* Multicenter, prospective clinical evaluation of respiratory samples from subjects at risk for *Pneumocystis jirovecii* using a commercial real-time PR assay. J Clin Microbiol. 2011;49:1872-8
- Helweg-Larsen J, Jensen JS, Lundgren B. Non-invasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by PCR on oral washes. Lancet. 1997 8;350 (9088):1363
- Helweg-Larsen J, Jensen JS, Benfield T, Svendsen UG, Lundgren JD, Lundgren B. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. J Clin Microbiol. 1998;36:2068-72
- Helweg-Larsen J, Benfield TL, Eugen-Olsen J, Lundgren JD, Lundgren B. Effects of mutations in dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS associated *P. carinii* pneumonia. Lancet. 1999; 354(9187): 1347-51
- Helweg-Larsen J, Skov JJ, Dohn B, Benfield TL, Lundgren B. Detection of *Pneumocystis* DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia- a case-control study. BMJ. 2002;2:1-6.
- Helweg-Larsen J. *Pneumocystis jirovecii*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. Dan Med Bull. 2004;51: 251-73
- Hennequin C, Page B, Roux P, Legendre C, Kreis H. Outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a renal transplant unit. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1995.14:122-6
- Herrag M, Elfassy Fihry MT, Alaoui Yazidi A. *Pneumocystis jirovecii*: ce nom, que signifie-t-il? M Rev Pneumol Clin. 2010 ;66(6):342-6
- Höcker B, Wendt C, Nahimana A, Tönshoff B, Hauser PM. Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. Emerg Infect Dis. 2005 ;11(2):330-2
- de la Horra C, Varela JM, Fernández-Alonso J, Medrano FJ, Respaldiza N, Montes-Cano M, *et al.* Association between human *Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. Eur J Clin Invest. 2004;34:229-35
- De la Horra C, Varela JM, Friaiza V, Respaldiza N, Muñoz-Lobato F, *et al.* Comparison of single and touchdown PCR protocols for detecting *Pneumocystis jirovecii* DNA in paraffin-embedded lung tissue samples. J Eukaryot Microbiol. 2006;53 Suppl 1:S98-9

- Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, *et al.* Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis.* 2000; 182:1192-8
- 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(6):616-7
- Huang L, Crothers K, Atzori C, Benfield T, Miller R, Rabodonirina M, *et al.* Dihydropteroate Synthase Gene Mutations in *Pneumocystis* and Sulfa Resistance. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(10): 1721-8
- Huang L. Clinical presentation and diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. In: Walzer P., *Pneumocystis* pneumonia, 3^a ed., Marcel and Dekker ed., 2005, p.349-406
- Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM. ATS *Pneumocystis* Workshop Participants. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in *Pneumocystis* pneumonia (PCP). *Proc Am Thorac Soc.* 2006;3(8):655-64
- Hughes WT. Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis.* 1982. 145:842-8.
- Hughes WT. Current issues in the epidemiology, transmission, and reactivation of *Pneumocystis carinii*. *Semin Respir Infect.* 1998;13:283-8
- Hughes WT. Transmission of *Pneumocystis* Species among Renal Transplant Recipients. *CID.* 2007;44:1150-1
- Icenhour CR, Rebholz SL, Collins MS, Cushion MT. Early acquisition of *Pneumocystis carinii* in neonatal rats using targeted PCR and oral swabs. *J Eukaryot Microbiol.* 2001; Suppl:135S-6S
- Icenhour CR, Rebholz SL, Collins MS, Cushion MT. Widespread occurrence of *Pneumocystis carinii* in commercial rat colonies detected using targeted PCR and oral swabs. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 3437-41
- Icenhour CR, Rebholz SL, Collins MS, Cushion MT. Early Acquisition of *Pneumocystis carinii* in Neonatal Rats as Evidenced by PCR and Oral Swabs. *Eukaryot Cell.* 2002;1(3):414-9
- Icenhour CR, Arnold J, Medvedovic M, Cushion MT. Competitive coexistence of two *Pneumocystis* species. *Infect Genet Evol.* 2006;6(3):177-86
- Itatani CA. Ultrastructural morphology of intermediate forms and forms suggestive of conjugation in the life cycle of *Pneumocystis carinii*. *J Parasitol.* 1996;82:163-71
- Jacobs JL, Libby DM, Winters RA, Belmont DM, Fried ED, Hartman BJ, *et al.* A cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in adults without predisposing illnesses. *N Engl J Med.* 1991; 324: 246-50
- James RS, Charles BB, Robert FM, Ann EW. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8: 891-6
- Jasmer RM, Edinburgh KJ, Thompson A, Gotway MB, Creasman JM, Webb WR, *et al.* Clinical and radiographic predictors of the etiology of pulmonary nodules in HIV- infected patients. *Chest.* 2000;117(4):1023-30
- Kai M, Matsuoka M, Nakata N, Maeda S, Gidoh M, Maeda Y, *et al.* Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;177:231-5
- Kaneshiro ES. Lipid metabolism of *Pneumocystis*: toward the definition of new

- molecular targets. FEMS Immunol Med Microbiol. 1998;22(1-2):135-43
- Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, *et al.* Mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. AIDS. 1998; 12: 873- 8
- Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee CH, *et al.* *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. J Infect Dis. 2000; 182: 551-7
- Kazanjian PH, Fisk D, Armstrong W, Shulin Q, Liwei H, Ke Z, *et al.* Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P carinii* pneumonia, in the United States and China. J Infect Dis. 2004; 189: 1684-7
- Keely SP, Stringer JR, Baughman RP, Linke MJ, Walzer PD, Smulian AG. Genetic variation among *Pneumocystis carinii hominis* isolates in recurrent pneumocystosis. J Infect Dis. 1995;172: 595-8
- Keely SP, Baughman RP, Smulian AG, Dohn MN, Stringer JR. Source of *Pneumocystis carinii* in recurrent episodes of pneumonia in AIDS patients. AIDS. 1996; 10:881- 8
- Keely SP, Stringer JR. Multi-locus genotype switching in *Pneumocystis carinii* sp. f. *hominis*: evidence for reinfection. J Eukaryot Microbiol. 1996;43(5): 50S
- Keely SP, Stringer JR. Sequences of *Pneumocystis carinii* s.f. *hominis* strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. J Clin Microbiol. 1997;35:2745-7
- Kim HY, Hughes WT, Feldman S. Studies of morphology and immunofluorescence of *Pneumocystis carinii*. Proc Soc Exp Biol Med. 1972; 141: 304
- Kling HM, Shipley TW, Patil S, Morris A, Norris KA. *Pneumocystis* Colonization in Immunocompetent and Simian Immunodeficiency Virus-Infected Cynomolgus Macaques. J Infect Dis. 2009;199(1):89-96
- Kovacs JA, Masur H. Evolving health effects of *Pneumocystis*: one hundred years of progress in diagnosis and treatment. JAMA. 2009;301(24):2578-85
- Kuper H, Adami HO, Trichopoulos D. Infections as a major preventable cause of human cancer. J Int Med. 2000; 248:171-183
- Laakkonen J, Fisher RN, Case TJ. *Pneumocystosis* in wild small mammals from California. J Wildl Dis. 2001; 37: 408-12
- Laakkonen J, Fisher RN, Case TJ. Spatial analysis on the occurrence of *Pneumocystis carinii* in the shrew *Notiosorex crawfordi* in fragmented landscape in southern California. J Eukaryot Microbiol. 2001; Suppl: 111S-112S
- Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, *et al.* Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. J Infect Dis. 1997; 175:482-5
- Larsen HH, Kovacs JA, Stock F, Vestereng VH, Lundgren B, Fisher SH, *et al.* Development of a Rapid Real-Time PCR Assay for Quantitation of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii*. J Clin Microbiol. 2002;40(8):2989-93
- Larsen HH, von Linstow ML, Lundgren B, Hogh B, Westh H, Lundgren JD. Primary *Pneumocystis* Infection in Infants Hospitalized with Acute Respiratory Tract Infection. Emerg Inf Dis. 2007;13(1):66-72
- Latouche S, Roux P, Poirot JL, Lavrard I, Hermelin B, Bertrand V. Preliminary results of *Pneumocystis carinii* strain differentiation by using molecular

- biology. *J Clin Microbiol.* 1994; 32: 3052-3
- Latouche S, Ortona E, Mazars E, Margutti P, Siracusano A, Tamburrini E, *et al.* Biodiversity of French and Italian human *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol.* 1996;43 (S):54-5
- Latouche S, Ortona E, Mazars E, Margutti P, Tamburrini E, Siracusano A, *et al.* Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: Typing with different DNA regions. *J Clin Microbiol.* 1997;35:383-7
- Latouche S, Rabodonirina M, Mazars E. *Pneumocystis*: the 'carrier state': epidemiology and transmission of human pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Mic.* 1998;22:81-86
- Latouche S, Lacube P, Maury E, Bolognini J, Develoux M, Girard PM, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in French patients with pneumocystosis: a 1998- 2001 prospective study. *Med Mycol.* 2003;41:533-7
- Leibovitz E, Pollack H, Moore T, Papellas J, Gallo L, Krasinski K, *et al.* Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol.* 1995;33:3004-7
- Leigh TR, Kangro HO, Gazzard BG, Jeffries DJ, Collins JV. DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect sub-clinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. *Resp Medic.* 1993;87:525-9
- Leigh TR, Millett MJ, Jameson B, Collins JV. Serum titres of *Pneumocystis carinii* antibody in health care workers caring for patients with AIDS. *Thorax* 1993;48:619-21
- Le Gal S, Damiani C, Perrot M, Rouillé A, Virmaux M, Quinio D, *et al.* Circulation of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(2):119-24
- Le Gal S, Damiani C, Rouillé A, Grall A, Tréguer L, Virmaux M, *et al.* A cluster of *Pneumocystis* infections among renal transplant recipients: molecular evidence of colonized patients as potential infectious sources of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis.* 2012;54 (7):e62-71
- Ley orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. España. Boletín Oficial del Estado. 1999; 298:43088-99
- Lidman C, Olsson M, Björkman A, Elvin K. No evidence of nosocomial *Pneumocystis carinii* infection via health care personnel. *Scand J Infect Dis.* 1997;29(1):63-4
- Lobos JM, Royo-Bordonada MA, Brotons C, Álvarez-Sala L, Armario P, Maiques A, *et al.* Guía Europea de Prevención Cardiovascular en la Práctica Clínica. Adaptación española del CEIPC 2008. *SEMERGEN.* 2009;35(2):66-85
- López de Ullibarri Galparsoro I, Pita Fernández S. Medidas de concordancia: el índice de Kappa. *Cad Aten Primaria.* 1999;6:169-71
- Lubis N, Baylis D, Short A, Stebbing J, Teague A, Portsmouth S, *et al.* Prospective cohort study showing changes in the monthly incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Postgrad Med J.* 2003;79:164-6
- Lundgren B, Elvin K, Rothman LP, Ljungstrom I, Lidman C, Lundgren JD. Transmission of *Pneumocystis carinii* from patients to hospital staff. *Thorax.* 1997;52:422-4
- Lundgren B, Wakefield AE. PCR for detecting *Pneumocystis carinii* in clinical or environmental samples. *Immunol Med Microbiol.* 1998;22:97-101

- Ma L, Borio L, Masur H, Kovacs JA. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *J Infect Dis.* 1999; 180:1969-78
- Ma L, Kovacs JA, Cargnel A, Valerio A, Fantoni G, Atzori C. Mutations in the dihydropteroate synthase gene of human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from Italy are infrequent but correlate with prior sulfa prophylaxis. *J Infect Dis.* 2002;185:1530-2
- Magne D, Angoulvant A, Botterel F, Bouges-Michel C, Bougnoux ME, Bouree P, *et al.* Pneumocystosis: a network survey in the Paris area 2003-2008. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011;30(5):673-5
- Magne D, Lacube P, Angoulvant A, Meliani L, Botterel F, Bougnoux ME, *et al.* Pneumocystosis: survey and DHPS genotype analysis in 14 Parisian hospitals in 2003 and 2004. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53 (S1): s106-7
- Magne D, Angoulvant A, Botterel F, Bouges-Michel C, Bougnoux ME, Bouree P, *et al.* Pneumocystosis: a network survey in the Paris area 2003-2008. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30 (5): 673-5
- Maher N , Dillon HK , Awooda A, Lee JH, Vermund SH, Unnasch TR: A Comparison of Two Surface Sample Collection Devices for Use in Polymerase Chain Reaction Based Detection of *Pneumocystis carinii* in House Dust, *Applied Occupational and Environmental Hygiene.* 2002; 17 (6),416-23
- Manoloff ES, Francioli P, Taffé P, van Melle G, Bille J, Hauser PM. Risk for *Pneumocystis carinii* Transmission among Patients with Pneumonia: a Molecular Epidemiology Study. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(1):132-4
- Martin-Juan J, Gómez-Izquierdo L, Lara L, Rodríguez-Becerra E, de la Horra C, Montes-Cano MA, *et al.* Factores relacionados con la infección por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial difusa. *Neumosur.* 2008;20:65-73
- Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JCT, Wakefield AE, Miller RF, *et al.* Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax.* 2003; 58:594-7
- Matos O, Costa MC, Lundgren B, Caldeira L, Aguiar P, Antunes F. Effect of oral washes on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia with a low parasite burden and on detection of organisms in subclinical infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2000;20:573-5.
- Matos O, Lundgren B, Caldeira L, Mansinho K, Aguiar P, Forte M, *et al.* Evaluation of two nested polymerase chain reactions for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect.* 2000;6:149-52.
- Matos O, Lee CH, Jin S, Li B, Costa MC, Gonçalves L, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infect Genet Evol.* 2003;3:281-5
- Matos O, Costa MC, Correia I, Monteiro P, Monteiro M, Soares J, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* carriage in Portuguese Immunocompetent Patients: preliminary results. *J Eukar Microbiol.* 2003;50(6):647-8
- Matos O, Esteves F. Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite.* 2010;17:219-32

- Matsumoto Y, Yoshida Y. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J Protozool.* 1984;31(3):420-8
- Matsumura Y, Shindo Y, Iinuma Y, Yamamoto M, Shirano M, Matsushima A, *et al.* Clinical characteristics of *Pneumocystis* pneumonia in non-HIV patients and prognostic factors including microbiological genotypes. *BMC Infect Dis.* 2011;11:76
- Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JCT, Wakefield AE, Miller RF, *et al.* Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax.* 2003;58:594-597
- Medrano FJ, Respaldiza N, Medrano A, Varela JM, Montes-Cano M, de La Horra C, *et al.* Seroprevalence of *Pneumocystis* human infection in southern Spain. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50(S):649-50
- Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gash A, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* in General Population. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(2):245-250
- Mekinian A, Durand-Joly I, Hatron PY, Moranne O, Denis G, Dei-Cas E, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. *Rheumatology.* 2011; 50:569-77
- Van der Meer G, Brug SL. Infection a *Pneumocystis* chez l`homme et chez les animaux. *Ann Soc Belg Med Trop.* 1942;22:301-7.
- Visconti E, Ortona E, Mencarini P, Margutti P, Marinaci S, Zolfo M, *et al.* Mutations in dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis carinii* in HIV patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Int J Antimicrob Agents.* 2001;18:547-51
- Merali S, Frevert U, Williams JH, Chin K, Bryan R, Clarkson AB Jr. Continuous axenic cultivation of *Pneumocystis carinii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(5):2402-7
- Meuwissen JH, Tauber I, Leeuwenberg AD, Beckers PJ, Sieben M. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J Infect Dis.* 1977;136:43-9
- Miller RF, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* genotypes and severity of pneumonia. *Lancet.* 1999;353(9169): 2039-40
- Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3877-82
- Miller RF, Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE. Genotypes of *Pneumocystis jirovecii* Isolates Obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(12): 3979.
- Miller RF, Lindley AR, Copas A, Ambrose HE, Davies RJ, Wakefield AE. Genotypic variation in *Pneumocystis jirovecii* isolates in Britain. *Thorax.* 2005; 60: 679-682.
- Miller RF, Evans HE, Copas AJ, Cassell JA. Climate and genotypes of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Microbiol Infect.* 2007;13(4):445-448
- Mirovsky P, Fishman JA. An improved method for the prolonged maintenance of *Pneumocystis carinii* *in vitro*. *J Infect Dis.* 1993;167(6):1470-3
- Monheit JG, Brown G, Kott MM, Schmidt WA, Moore DG. Calcofluor white detection of fungi in cytopathology. *Am J Clin Pathol.* 1986;85(2):222-5

- Montes-Cano MA, de la Horra C, Martín-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* Genotypes in the Spanish population. *CID*. 2004;39:123-8
- Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena F., Mateos I, Friaiza V, Respaldiza N, *et al.* Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect*. 2007;13:1008-11
- 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):126-7
- Morgan DJ, Vargas S, Reyes-Mugica M, Walterspiel J, Carver W, Gigliotti F. Identification of *Pneumocystis carinii* in the lungs of infants dying of sudden infant death syndrome. *Ped Infect Dis*. 2001; 20(3):306-9
- Morris A, Ben BC, Huang L. Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*. *Microbes Infect* 2002;4:95-103
- Morris A, Kingsley LA, Groner G, Lebedeva IP, Beard CB, Norris KA. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV-infected men. *AIDS*. 2004;18:793-8
- Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and Clinical Significance of *Pneumocystis* Colonization. *J Infect Dis*. 2008; 197:10-7
- Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2):297
- Mortier E, Pouchot J, Bossi P, Molinie V. Maternal-fetal transmission of *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med*. 1995;332:825-6
- Muñoz C, Zuluaga A, Restrepo A, Tobón A, Cano LE, González A. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012;72:204-13
- Murphy MJ, Pifer LL, Hughes WT. *Pneumocystis carinii in vitro*: a study by scanning electron microscopy. *Am J Pathol*. 1977; 86:387-401
- Nahimana A, Rabodonirina M, Zanetti G, Meneau I, Francioli P, Bille J, *et al.* Association between a specific *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutation and failure of pyrimethamine/sulfadoxine prophylaxis in human immunodeficiency virus-positive and -negative patients. *J Infect Dis*. 2003; 188:1017-3.
- Navin TR, Rimland D, Lennox JL, Jernigan J, Cetron M, Hightower A, *et al.* Risk Factors for Community-Acquired Pneumonia among Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis*. 2000;181:158-64
- Nevez G, Jounieaux V, Linas MD, Guyot K, Leophonte P, Massip P, *et al.* High frequency of *Pneumocystis carinii* sp.f. *hominis* Colonization in HIV-Negative Patients. *J Euk Microbiol*. 1997;44(6):36S
- Nevez G, Raccurt C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E. Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS*. 1999;13:535-6
- Nevez G, Totet A, Pautard JC, Raccurt C. *Pneumocystis carinii* detection using nested-PCR in nasopharyngeal aspirates of immunocompetent infants with bronchiolitis. *J Eukaryot Microbiol*. 2001. 48(Suppl):122S-3S
- Nevez G, Magois E, Duwat H, Gouilleux V, Jounieaux V, Totet A. Apparent Absence of *Pneumocystis jirovecii* in Healthy Subjects. *Cl Infect Dis*. 2006;42:e99-101

- Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M, Virmaux M, Dei-Cas E, Hauser PM, *et al.* Nosocomial *Pneumocystis Jirovecii* Infections. *Parasite*. 2008;15:359-65
- Ng VL, Yajko DM, Keith HW. Extrapulmonary Pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev*.1997;10(3):401-18
- Nkinin SW, Daly KR, Walzer PD, Ndzi ES, Asonganyi T, Respaldiza N, *et al.* Evidence for high prevalence of *Pneumocystis jirovecii* exposure among Cameroonians. *Acta Trop*. 2009;112(2):219-24
- O'Donnell WJ, Pieciak W, Chertow GM, Sanabria J, Lahive KC. Clearance of *Pneumocystis carinii* cystic in acute *P. carinii* pneumonia: assessment serial sputum induction. *Chest*. 1998;114:1264-8
- Ognibene FP, Shelhamer JH, Hoffman GS, Kerr GS, Reda D, Fauci AS, *et al.* *Pneumocystis carinii* pneumonia: a major complication of immunosuppressive therapy in patients with Wegener's granulomatosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:795-9
- De Oliveira A, Unnasch TR, Crothers K, Eiser S, Zucchi P, Moir J, *et al.* Performance of a molecular viability assay for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;5 (2):169-76
- Olsson M, Sukura A, Lindberg LA, Linder E. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in filtration of air. *Scand J Infect Dis*. 1996; 28:279-82
- Olsson M, Lidman C, Latouche S, Bjorkman A, Roux P, Linder E, *et al.* Identification of *Pneumocystis carinii* f.sp.*hominis* Gene Sequences in Filtered Air in Hospital Environments. *J Clin Microbiol*. 1998;36(6):1737-40
- 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
- Opravil M, Marincek B, Fuchs WA, Weber R, Speich R, Battegay M, *et al.* Shortcomings of chest radiography in detecting *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 1994;7(1):39-45
- Oz HS, Hughes WT. DNA amplification of nasopharyngeal aspirates in rats: a procedure to detect *Pneumocystis carinii*. *Microb Pathog*. 1999;27:119-21
- Pachón J, Pujol E, Rivero A. La infección por el VIH: guía práctica. 2ª ed. Sevilla: Sociedad Andaluza de Enfermedades Infecciosas; 2003. 611 p.
- Palange P, Serra P, Di Sorbato F, Contini C, Giacobazzo M. *Pneumocystis carinii* pneumonia in a patient with chronic obstructive pulmonary disease but no evident immunoincompetence. *Clin Infect Dis*. 1994;19:543- 4
- Parella FJ, Delaney KM, Moorman AC, Loveless MO, Fuhrer J, Satten GA, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med*. 1998; 338:853-60
- Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, Morilla R, de la Horra C, Montes-Cano MA, *et al.* High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol*. 2012; 50(5):556-60
- Peters SE, Wakefield AE, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. A search for *Pneumocystis carinii* in postmortem lungs by DNA amplification. *J Pathol*. 1992;166:195-8
- Peterson JC, Cushion MT. *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Current Opinion in Microbiology*. 2005;8:393-8
- Pifer LL, Hughes WT, Stagno S, Woods D. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children.

- Pediatrics. 1978;61:35-41
- Pinlaor S, Mootsikapun P, Pinlaor P, Phunmanee A, Pipitgool V, Sithithaworn P, *et al.* PCR diagnosis of *Pneumocystis carinii* on sputum and bronchoalveolar lavage samples in immuno-compromised patients. Parasitol Res.2004;94(3):213-8
- Pissani P, Parkin DM, Muñoz N, Ferlay J. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 1997;6:387-400
- The *Pneumocystis* Workshop. Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. J Eukaryot Microbiol. 1994;41(5): 121S-2S
- Porollo A, Meller J, Joshi Y, Jaiswal V, George SA, Cushion M. Analysis of Current Antifungal Agents and their targets within the *Pneumocystis carinii* genome. Curr Drug Targets. 2012;13(12):1575-85
- Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. *Pneumocystis* en autopsias en la población general. Clin Infect Dis. 2010;50:347-53
- Powles MA, McFadden DC, Pittarelli LA, Schmatz DM. Mouse model for *Pneumocystis carinii* pneumonia that uses natural transmission to initiate infection. Infect Immun. 1992;60(4):1397-400
- Porter A. The occurrence of *Pneumocystis carinii* in mice in England. Parasitology. 1915;8:255.
- Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, *et al.* Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods. J Clin Microbiol. 2004;42(7):3333-5
- Puerto Segura, E., Rodríguez Díaz, V. y Rodríguez Romero, E. Procesos de geocodificación en el ámbito sanitario. Una comparativa de resultados. En: Ojeda, J., Pita, M.F. y Vallejo, I. (Eds.), Tecnologías de la Información Geográfica. La Información Geográfica al servicio de los ciudadanos. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla. Sevilla. 2010. P. 337-347. ISBN: 978-84-472-1294-1
- Redhead SA, Cushion M, Frenkel JK, Stringer JR. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. J Eukaryot Microbiol. 2006;53(1):2-11
- Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, *et al.* High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. Clin Microbiol Infect. 2004;10(11):1029-31.
- Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, *et al.* Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. Clin Microbiol Infect. 2005;11:1012-5
- Respaldiza N, Montes-Cano MA, Friaiza V, Muñoz-Lobato F, Medrano FJ, Varela JM, *et al.* Usefulness of Oropharyngeal Washings for Identifying *Pneumocystis jirovecii* Carriers. J Eukaryot Microbiol 2006; 53:S100-S101
- Richardson JD, Queener SF, Bartlett M, Smith J. Binary fission of *Pneumocystis carinii* trophozoites grown *in vitro*. J Protozool. 1989; 36 (Suppl.): 27S-29S
- del Rio C, Guarner J, Honig EG, Slade BA. Sputum examination in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. Arch Pathol Lab Med. 1988;112(12):1229-32
- Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, Huang L, Schuhegger 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
- Rivero L, de la Horra C, Montes-Cano MA, Rodríguez-Herrera A, Respaldiza N, Friaza V, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1116-8
- Robbarts 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
- Rodriguez M, Fishman JA. Prevention of infection due to *Pneumocystis spp.* In human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):770-82
- Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf JD. Detection of by two staining methods and two quantitative PCR assays. *Infection.* 2009;37(3):261-5.
- Rubin E, Zak FG. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the adult. *N Engl J Med.* 1969; 262: 1315-7
- Russian DA, Levine SJ. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without HIV infection. *Am J Med Sci.* 2001;321(1):56-65
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, *et al.* Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985; 230(4732): 1350-4
- Sanchez CA, Sanchez CA, Chabe M, Aliouat EM, Durand-Joly I, Gantois N, *et al.* Exploring transplacental transmission of *Pneumocystis oryctolagi* in first-time pregnant and multiparous rabbit does. *Med Mycol.* 2007;45 (8):701-7
- Sánchez Cruz JJ, Sánchez Villegas P, Moya Garrido MN, Mayoral Cortés JM. La salud en Andalucía según las Encuestas Andaluzas de Salud (EAS): EAS-1999, EAS-2003 y EAS-2007. [CD-ROM]. 1era ed. Granada: Escuela Andaluza de Salud Pública; 2010:306
- Santos LD, Lacube P, Latouche S, Kac G, Mayaud C, Marteau M, *et al.* Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* epidemiology. *J Eukaryot Microbiol.* 1999;46(5):133S-4S
- Sassi M, Ripamonti C, Mueller NJ, Yazaki H, Kutty G, Ma L, *et al.* Outbreaks of *Pneumocystis* Pneumonia in 2 renal transplant centers linked to a single strain of *Pneumocystis*: implications for transmission and virulence. *Cl Infect Dis.* 2012;54(10):1437-44
- Schmoldt S, Schuegger R, Wendler T, Huber I, Sollner H, Hogardt M, *et al.* Molecular evidence of Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 Patients after Kidney Transplantation. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):966-71
- Sepkowitz, K, Schluger N, Godwin T, Armstrong, D, Cerami A, Bucala R. DNA Amplification in Experimental Pneumocystosis: Characterization of Serum *Pneumocystis carinii* DNA and Potential *P. carinii* Carrier States. *J Infect Dis.* 1993;168(2):421-6
- Shelhamer JH, Ognibene FP, Macher AM, Tuazon C, Steiss R, Longo D, *et al.* Persistence of *Pneumocystis carinii* in lung tissue of acquired immunodeficiency syndrome patients treated for *Pneumocystis* pneumonia. *Am Rev Respir Dis.* 1984;130(6):1161-5
- Silletti RP, Glezerov V, Schwartz IS. Pulmonary *paracoccidioidomycosis* misdiagnosed as *Pneumocystis* pneumonia in an immunocompromised host. *J Clin Microbiol.* 1996;34(9):2328-30.

- Shimizu Y, Sunaga N, Dobashi K, Fueki M, Fueki N, Makino S, *et al.* Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. BMC Infect Dis. 2009;9:47
- SIMA, Año 2008. Instituto de Estadística de Andalucía, Consejería de Economía y Hacienda, Junta de Andalucía. Disponible en: www.juntadeandalucia.es/institutodeestadistica/SIMA Año 2008. Consultado el 25 de abril del 2011
- Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. J Clin Microbiol. 1999;37:3409-10
- Sing A, Geiger AM, Hogardt M, Heeseman J. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. J Cl Microb. 2001;39:2717-8
- Sing A, Schmoldt S, Laubender RP, Heesemann J, Sing D, Wildner M. Seasonal variation of *Pneumocystis jirovecii* infection: analysis of underlying climatic factors. Clin Microbiol Infect. 2009;15(10):957-60
- Schatz DM, Romancheck MA, Pittarelli LA, Schwartz RE, Fromtling RA, Nollstadt KH, *et al.* Treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia with 1, 3-beta-glucan synthesis inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87:5950-4
- Schatz DM, Powles M, McFadden DC, Pittarelli LA, Liberator PA, Anderson JW. Treatment and prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia and further elucidation of the *P. carinii* life cycle with 1, 3-beta-glucan synthesis inhibitor L-671,329. J Protozool. 1991;38 (Supl.):151S-153S
- Sepkowitz K, Schluger N, Godwin T, Armstrong D, Cerami A, Bucala R. DNA amplification in experimental pneumocystosis: characterization of serum *Pneumocystis carinii* DNA and potential *P. carinii* carrier states. J. Infect. Dis. 1993; 168:421-6.
- Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. Clin Infect Dis. 2002;34(8):1098-107
- Silva RM, Bazzo ML, Borges AA. Induced sputum versus bronchoalveolar lavage in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in human immunodeficiency virus-positive patients. Braz J Infect Dis. 2007;11(6):549-53
- Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. J Clin Microbiol. 1999;37:3409-10
- Sing A, Geiger AM, Hogardt M, Heesemann J: *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. J Clin Microbiol. 2001,39: 2717- 8
- Smulian AG, Sesterhenn T, Tanaka R, Cushion MT. The ste3 pheromone receptor gene of *Pneumocystis carinii* is surrounded by a cluster of signal transduction genes. Genetics. 2001;157:991-1002
- Soeiro Ade M, Hovnanian AL, Parra ER, Canzian M, Capelozzi VL. Post-mortem histological pulmonary analysis in patients with HIV/AIDS. Clinics (Sao Paulo). 2008;63(4):497-502
- de Souza W, Benchimol M. Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005;100(8):903-8
- Spencer L, Ukwu M, Alexander T, Valadez K, Liu L, Frederick T, *et al.* Epidemiology of *Pneumocystis* Colonization in Families. Clin Infect Dis. 2008;46(8):1237-40.

- Stein CR, Poole C, Kazanjian P, Meshnick SR. Sulfa use, dihydropteroate synthase mutations, and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:1760-5
- Stringer SL, Stringer JR, Blas MA, Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosome RNA implies a clear relationship with fungi. *Exp Parasitol* 1989;68:450-61
- Stringer JR. *Pneumocystis carinii*: what is it, exactly? *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9:489-98
- Stringer JR, Walzer PD. Molecular biology and epidemiology of *Pneumocystis carinii* infection in AIDS. *AIDS.* 1996;10(6):561-572
- Stringer JR, Cushion MT. The genome of *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1998;22:15-26
- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name for *Pneumocystis* from humans and new perspectives on the host-pathogen relationship. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(9):891-6
- Sukura A, Lindberg L, Soveri T, Guerrero O, Chinchilla M, Elvin K, *et al.* Establishment of *Pneumocystis carinii* infection in a rat population. *Acta Vet Scand.* 1991;32:135-7.
- 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
- Takahashi T, Hosoya N, Endo T, Nakamura T, Sakashita H, Kimura K, *et al.* Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J Clin Microbiol.* 2000; 38: 3161-4
- Tansuphasawadikul S, Amornkul PN, Tanchanpong C, Limpakarnjanarat K, Kaewkungwal J, Likanonsakul S, *et al.* Clinical presentation of hospitalized adult patients with HIV infection and AIDS in Bangkok, Thailand. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 1999;21(4):326-32.
- Taylor SM, Meshnick SR, Worodria W, Andama A, Cattamanchi A, Davis JL, *et al.*; International HIV-associated Opportunistic Pneumonias Study. 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. doi:10.1371/journal.pone.0049991
- Thomas CF Jr, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia. *N Engl J Med.* 2004;350 (24):2487-98
- Thomas CF Jr, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:298-308
- Tipirneni R, Daly KR, Jarlsberg LG, Koch JV, Swartzman A, Roth BM, *et al.* Healthcare Worker Occupation and Immune Response to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerging Infectious Diseases.* 2009;15(10):1590-7
- Totet A, Meliani L, Lacube P, Pautard JC, Raccurt C, Roux P, *et al.* Immunocompetent infants as a human reservoir for *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50 Suppl:668-9
- Totet A, Latouche S, Duwat H, Magois E, Lacube P, Pautard JC, *et al.* Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in patients developing diverse forms of parasitismo: implication for a wide human reservoir for the fungus. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50 Suppl:670-1

- Totet A, Respaldiza N, Pautard JC, Raccurt C, Nevez G. *Pneumocystis jirovecii* Genotypes and Primary Infection. Clin Infect Dis. 2003;36:1340-2
- Totet A, Latouche S, Lacube P, Pautard JC, Jounieaux V, Racurt C, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. Emerg Infect dis. 2004;10:667-73
- Totet A, Duwat H, Magois E, Jounieaux V, Roux P, Raccurt C, *et al.* Similar genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in different forms of *Pneumocystis* infection. Microbiology. 2004;150:1173-8
- Travis J, Hart E, Helm J, Duncan T, Vilar J. Retrospective review of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia over two decades. International J STD&AIDS 2009;20:200-201.
- Triglia T, Wang P, Sims PF, Hyde JE, Cowman AF. Allelic exchange at the endogenous genomic locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. EMBO J. 1998; 17(14): 3807-15
- Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS Era Isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *Hominis*: High Genotypic Similarity with Contemporary Isolates. J Clin Microbiol. 1998;36(1):90-3
- Tsolaki AG, Miller RF, Wakefield AE. Oropharyngeal samples for genotyping and monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. J Med Microbiol. 1999;48(10):897-905
- Tuncer S, Ergüven S, Kocagöz S, Unal S. Comparison of cytochemical staining, immunofluorescence and PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* on sputum samples. Scand J Infect Dis. 1998;30(2):125-8
- 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
- Valerio A, Tronconi E, Mazza F, Cargnel A, Fantoni G, Atzori C. DHPS- mutated isolates of *Pneumocystis jirovecii* from HIV- infected individuals: analysis of related ITS genotypes. J Eukaryot Microbiol. 2006;53 (Suppl 1):s108-9
- Varela JM, Dapena J, Regordan C, Blanco M, Gonzalez de la Puente MA, Calderon EJ. Absence of *Pneumocystis carinii* carriers among patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1998;17:741-2
- Varela JM, Regordan C, Medrano FJ, Respaldiza N, de la Horra C, Montes-Cano MA, *et al.* Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infection in southern Spain. Clin Microbiol and Infect Dis. 2004;10:749-72
- Varela Aguilar JM, Medrano Ortega JM, Calderón Sandubete E. *Pneumocystis jirovecii*: un nuevo nombre para un viejo patógeno. Rev Clin Esp. 2006; 206(6):278-80.
- Vargas SL, Hughes WT, Wakefield AE, Oz HE. Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. J Infect Dis. 1995; 172:506-10.
- Vargas SL, Ponce CA, Hughes WT, Wakefield AE, Weitz JC, Donoso S, *et al.* Association of Primary *Pneumocystis carinii* Infection and Sudden Infant Death Syndrome. Clin Infect Dis. 1999;29(6):1489-93
- Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, Ulloa AV, Prieto S, Muñoz MP, *et al.* Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a Patient with *P. carinii* Pneumonia to Immunocompetent Contact Health Care Workers. J Clin Microbiol. 2000;38(4):1536-8

- Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, *et al.* Search for Primary Infection by *Pneumocystis carinii* in a Cohort of Normal, Healthy Infants. *Clin Infect Dis.* 2001;32:855-61
- Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, *et al.* Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal health children. *Clin Infect Dis.* 2001;32:855-61
- Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, Juarez G. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:605-6
- Vargas SL, Ponce CA, Luchsinger V, Silva C, Gallo M, López R, *et al.* Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* and viruses in presumably immunocompetent infants who died in the hospital or in the community. *J Infect Dis.* 2005;191:122-6
- Vargas S, Ponce CA, Gálvez P, Ibarra C, Haas EA, Chadwich AE, *et al.* *Pneumocystis* is not a direct cause of sudden infant death syndrome. *Ped Infect Dis.* 2007;26(1):81-3
- Vargas SL. *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. *Clin Infect Dis.* 2010; 50:e19- e21
- Vavra J, Kucera K. *Pneumocystis carinii delanoë*, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J Protozool.* 1970;17(3):463-83
- Vestereng VH, Bishop LR, Hernandez B, Kutty G, Larsen HH, Kovacs J A. Quantitative Real-Time Polymerase Chain-Reaction Assay Allows Characterization of *Pneumocystis* Infection in Immunocompetent Mice. *J Infect Dis.* 2004;189(8):1540-4
- Vidal S, de la Horra C, Martín J, Montes-Cano MA, Rodríguez E, Respaldiza N, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microb Infect.* 2006;12:231-5
- Visconti E, Marinaci S, Zolfo M, Mencarini P, Tamburrini E, Pagliari G, *et al.* Very low frequency of *Pneumocystis carinii* DNA detection by PCR in specimens from patients with lung damage. *J Clin Microbiol.* 2000;38: 1307-8
- Visconti E, Ortona E, Mencarini P, Margutti P, Marinaci S, Zolfo M, *et al.* Mutations in dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis carinii* in HIV patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Internat J Antimicrob Agents.* 2001;18:547-51
- Vogel P, Miller CJ, Lowenstine LL, Lackner AA. Evidence for horizontal transmission of *Pneumocystis carinii* pneumonia on simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Infect Dis.* 1993;168: 836-43
- Volpe G, Sbaiz L, Avanzini C, Caramello P, Savoia D. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* isolated from human immunodeficiency virus-positive patients in Turin, Italy. *J Clin Microbiol.* 2001;39:2995-8
- Varthalitis I, Aoun M, Daneau D, Meunier F. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with cancer. An increasing incidence. *Cancer.* 1993;71:481-5
- Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Millard PR, Hopkin JM. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet.* 1990;336:451-3
- Wakefield AE, Stewart TJ, Moxon ER, Marsh K, Hopkin JM. Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84:800-2

- Wakefield AE, Guiver L, Miller RF, Hopkin JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Lancet. 1991;337:1378-9
- Wakefield AE, Miller RF, Guiver LA, Hopkin JM. Oropharyngeal samples for detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. Q J Med. 1993 ;86(6):401-6
- Wakefield AE, Fritscher CC, Malin AS, Gwanzura L, Hughes WT, Miller RF. Genetic Diversity in Human-Derived *Pneumocystis carinii* Isolates from Four Geographical Locations Shown by Analysis of Mitochondrial rRNA Gene Sequences. J Clin Microbiol. 1994;32(12):2959-61
- Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. J Clin Microbiol. 1996; 34: 1754-9.
- Wakefield AE. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. FEMS Immunol Med Mic. 1998;22:5-13
- Wakefield AE, Stringer JR, Tamburrini E, Dei-Cas E. Genetics, metabolism and host specificity of *Pneumocystis carinii*. Med Mycol. 1998;36Suppl1:183-93
- Wakefield AE. Genetic heterogeneity in human-derived *Pneumocystis carinii*. Immunology and Medical Microbiol. 1998;22:59-65
- 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;187:901-8
- 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;80:83-93
- Walzer PD, Powell RD Jr, Yoneda K. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in different strains of cortisonized mice. Inf Immun. 1979;24(3): 939-47
- Wazir JF, Ansari NA. *Pneumocystis carinii* Infection. Arch Pathol Lab Med. 2004;128:1023-7
- Wezicha JA, Cotes PM, Empey DW, Newland AC, Royston JP, Tam RC. Serum immuno-reactive erythropoietin and hypoxic lung disease with and without polycythemia. Clin Sci. 1985;69:413-22
- WHO. The top 10 causes of death [Internet]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/index.html> Actualizado octubre de 2008. Consultado el 24 de marzo de 2011.
- Wissmann G, Varela JM, Calderón EJ. Prevention of *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory bowel disease based on the detection of *Pneumocystis* colonization. Inflamm Bowel Dis. 2008;14(12):1751-2
- Wissmann G, Morilla R, Friaiza V, Calderón E, Varela JM. El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010;28(1):38-43
- Wissmann G, Morilla R, Martín-Garrido I, Friaiza V, Respaldiza N, Povedano J, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients treated with infliximab. Eur J Clin Invest. 2011;41:343-8
- Worodria W, Okot-Nwang M, Yoo SD, Aisu T. Causes of lower respiratory infection in HIV-infected Ugandan adults who are sputum AFB smear-negative. Int J Tuberc Lung Dis. 2003;7(2):117-23
- Yoshida Y. Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. J Protozool. 1989;

36:53-60

- Zar HJ, Álvarez-Martínez MJ, Harrison A, Meshnick SR. Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. Clin Infect Dis. 2004;39:1047-51
- Zingale A, Carrera P, Lazzarin A, Scarpellini P. Detection of *Pneumocystis carinii* and characterization of mutations associated with sulfa resistance in bronchoalveolar lavage samples from human immunodeficiency virus-infected subjects. J Clin Microbiol. 2003; 41:2709-12.

Epidemiología de la colonización por *Pneumocystis* en población general

8. ANEXOS

ANEXOS

- Consentimiento informado
- Cuaderno de recogida de datos
- Glosario

ANEXO 1.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACION AL PACIENTE

ESTUDIO: **Epidemiología molecular de la colonización por *Pneumocystis* en población general**

La siguiente información describe el estudio a realizar y las consideraciones más importantes de la infección subclínica por *Pneumocystis*.

Por favor lea cuidadosamente esta información y no dude en preguntar a su médico si no entiende algún punto de la misma.

***Pneumocystis jirovecii* es un hongo atípico y poco virulento que se encuentra muy extendido entre los humanos y otras especies de mamíferos a lo largo del mundo. Este microorganismo puede producir una infección respiratoria a pacientes que, por diferentes causas, padecen alteraciones de su sistema inmunológico que es el encargado de la defensa frente a las infecciones. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que personas sin alteración de su sistema inmunológico pueden ser portadoras de este agente sin llegar a padecer neumonía. Esto se ha observado sobre todo en pacientes con enfermedades bronquiales crónicas (10-40%) sin que hasta el momento se conozca el papel que puede desempeñar en la evolución de su enfermedad.**

El **objetivo** de este estudio es aportar información sobre la epidemiología de la infección por *Pneumocystis* en la población general.

Los **procedimientos** del estudio consisten en la toma de unas muestras de enjuagues bucales que Vd. expulsará espontáneamente para comprobar si es portador de este microorganismo y realizar un análisis del mismo. Además en algunos casos se extraerán unas muestras de sangre para realizar un estudio inmunológico.

Los datos de los estudios científicos disponibles hasta la fecha apoyan que en personas sin alteración del sistema inmune este agente no provoca alteraciones importantes y, por tanto, no se precisa tratamiento para erradicarlo. Por tanto, usted no recibirá tratamiento en caso que se detecte el patógeno. Si la evolución clínica hiciese sospechar que este microorganismo le puede estar causando algún problema de salud usted recibirá tratamiento antibiótico específico frente al mismo, y recibirá todos los cuidados médicos necesarios para el control de su enfermedad. A todos los participantes en el estudio se les pide su aceptación por escrito.

El Dr. _____ es el investigador responsable del estudio y está a su disposición en caso de que tuviera alguna duda, pregunta o problema.

La confidencialidad de los datos relacionados con este estudio será respetada, a los cuales solo tendrá acceso el médico investigador, persona encargada de su control.

La participación es voluntaria y en cualquier momento puede retirarse del estudio sin que esto altere la relación con su médico ni produzca perjuicio sobre su seguimiento. Si esta información le parece suficiente y está de acuerdo en participar en el estudio por favor firme el formulario de consentimiento escrito. **MUCHAS GRACIAS.**

CONSENTIMIENTO INFORMADO

ESTUDIO: Epidemiología molecular de la colonización por *Pneumocystis* en población general

Por favor marque el recuadro apropiado

➤ ¿ Ha leído la hoja informativa de consentimiento que se le ha entregado? Si No

--	--

➤ ¿Ha recibido suficiente información sobre el estudio y ha tenido la oportunidad de preguntar sobre el mismo obteniendo respuestas satisfactorias a las preguntas efectuadas? Si No

--	--

➤ ¿Con quién ha hablado? Dr _____

➤ ¿Está de acuerdo en que su participación es voluntaria y que puede retirarse del estudio:

- en cualquier momento?
- sin tener que dar explicaciones?
- sin que esto repercuta en mis cuidados médicos?

--	--

➤ ¿Está de acuerdo en que su historial médico sea examinado por personal autorizado manteniendo la confidencialidad de su identidad y que esta no sea divulgada ? Si No

--	--

He contestado SI a todas las preguntas arriba indicadas y estoy de acuerdo en participar libremente en el estudio.

Firma del participante: _____ Fecha: ___/___/___
(padre o representante legal en caso de ser menor de edad) d m a

Nombre del participante en mayúsculas: _____

Firma del testigo: _____ Fecha: ___/___/___
d m a

Nombre del testigo en mayúsculas: _____

ANEXO 2.
CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS DE EL CORONIL

CRITERIOS DE EXCLUSION

Consentimiento informado

--	--

CODIFICACION

CÓDIGO ⁽¹⁾

CO-

 FECHA DE INCLUSIÓN (d/m/a)

//____

DATOS DEMOGRÁFICOS

Nombre del paciente (iniciales) ⁽²⁾	
Sexo (V/M)	
Fecha de nacimiento (d/m/a)	_/_/____
Lugar de nacimiento (localidad)	
Lugar de nacimiento (provincia)	
Residencia habitual (localidad)	

NIVEL DE ESTUDIOS / DATOS ANTROPOMÉTRICOS

Tipo de probando (sano/enfermo)	
Si es enfermo especificar motivo de consulta en el Centro de Salud	
Nivel de estudios (sin estudios/primarios/secundarios/universidad)	
Datos antropométricos:	Peso: ____ Talla: ____ Perímetro abdominal ³ : ____ TA (mmHg): ____/____

	SÍ	NO
Diagnóstico confirmado o sospecha de Enfermedad respiratoria crónica		
Diagnóstico confirmado o sospecha de Neoplasia		
Inmunodepresión de cualquier origen ⁽⁴⁾		
Contacto laboral con pacientes hospitalizados en los últimos 12 meses		

COMENTARIOS _____

NOTAS

- ¹ Usar la clave CO seguida por un número correlativo para cada caso incluido
- ² Una sola inicial para el nombre y dos para los apellidos
- ³ Medir a nivel del ombligo
- ⁴ Enfermedad autoinmune, trasplante, tratamiento durante más de tres en el último año con esteroides u otros fármacos inmunosupresores

ANTECEDENTES PERSONALES

	SÍ	NO	
DIABETES	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
ENFERMEDAD HEPÁTICA (si la respuesta es SÍ, especificar)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
INSUFICIENCIA RENAL (si la respuesta es SÍ, especificar)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
OTROS (si la respuesta es SÍ, especificar)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Transfusión de hemoderivados	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Factor de riesgo para infección por VIH (prácticas sexuales de riesgo, ADVP)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabaquismo (si la respuesta es SÍ, especificar número de paquetes-año) ⁽⁵⁾	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Consumo de alcohol (si la respuesta es SÍ, especificar g/día)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	_____
Uso de esteroides en los últimos 6 meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ, especificar : inhalados (IN) / orales (OR) / ambos (AM)			_____
Si la respuesta es SÍ especificar: número de días de tratamiento (últimos 6 m.)			_____
Uso de cotrimoxazol en los últimos 6 meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ especificar: número total de días de tratamiento y dosís total de <u>sulfametoxazol</u> en gramos (últimos 6 meses)			Días: ____ Dosis: (g): _____
Uso de macrólidos o fármacos con actividad anti-PC ⁽⁶⁾ en los últimos 6 meses	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ, especificar el fármaco			_____

ESTADO ACTUAL DE SALUD

	SÍ	NO	
Fiebre/febrícula	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Síntomas respiratorios/catarrales	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Si la respuesta es SÍ, especificar			_____

MUESTRAS RECOGIDAS

	SI	NO	No. de muestras	Código de las muestras ⁽⁷⁾
Lavado orofaríngeo (LO)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Suero (SU) 10 cm, tapón amarillo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
EDTA (ED) 5 cm + 5 cm	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Otras (OT), especificar muestra	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		_____
Bioquímica enviada al hospital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		
Hemograma enviada al hospital	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		

NOTAS

⁵ El parámetro recoge intensidad y duración global del hábito. Paquetes-año = N° cigarrillos fumados al día/20 x años de hábito. Por ejemplo: a) Un paquete al día durante 1 año = 1 paquete-año, b) Dos paquetes durante dos años: 4 paquetes-año

⁶ Incluir pentamidina, dapsona, atovaquona, primaquina, clindamicina, pirimetamina

⁷ Código del caso/código de muestra. Por ejemplo, suero del paciente 4; Código de la muestra: CO-02/SU

EXAMENES COMPLEMENTARIOS

HEMOGRAMA/ BIOQUÍMICA

NR	Realizado

Si se realizó, especificar:

Hemoglobina (g/dl)	
WBC x 10 ⁹ /l	
Neutrofilos x 10 ⁹ /l	
Linfocitos x 10 ⁹ /l	
Creatinina sérica (mg/dl)	
LDH (UI/l)	
PCR (mg/l)	
Glucemia	
Colesterol total	
Colesterol HDL	
Colesterol LDL	
Trigliceridos	
Ácido Úrico	

Rx de torax

--	--

Si se realizó, especificar de 1 al 8 ⁽⁸⁾:

--

⁸ 1= normal; 2 = infiltrado alveolar; 3 = infiltrado intersticial; 4 = infiltrado mixto; 5 = derrame pleural; 6 = bronchiectasias
7, bullas; 8, otros (especificar)

INMUNOLOGÍA

--	--

Si se realizó, especificar:

CD4 cell/mm ³	
CD8 cell/mm ³	

SEROLOGÍA VIH

--	--

Si se realizó, especificar (Pos/Neg)

--

MICROBIOLOGÍA (esputo)

--	--

Si se realizó, especificar resultado

--

DIAGNOSTICO de infección por *PNEUMOCYSTIS*

	Pos	Neg	NR
Lavado orofaríngeo			

DATOS DE LOCALIZACIÓN

Nombre completo

Médico de Atención Primaria

Teléfono de contacto (particular)

Para recoger resultados

Domicilio

Modo: Consulta Carta Teléfono

COMENTARIOS: _____

GLOSARIO

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BDU	Base de Datos del Usuario
CDC	<i>Centers for Diseases Control</i>
DHPS	Dihidropteroato sintasa
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
INE	Instituto Nacional de Estadística
ITS	<i>Internal Transcribed Spacer Regions</i>
LBA	Lavado broncoalveolar
LDH	Láctico deshidrogenasa
LOF	Lavado orofaríngeo
MSL	Muerte súbita del lactante
mtLSU-rRNA	Subunidad larga del RNA ribosómico mitocondrial
PcP	Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
PCR-TR	PCR a tiempo real
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polimorphism</i>
TAC	Tomografía Axial Computerizada
TARGA	Terapia Antirretroviral de Gran Actividad
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
wt	<i>wild type</i> (tipo silvestre o salvaje)

