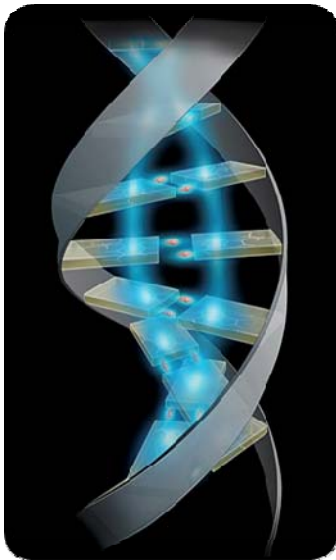




INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
HOSPITAL DEL IPK
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

***Pneumocystis jirovecii* en fallecidos por sida, IPK, 1995-2008.**

Autor: Lic. Yaxsier de Armas Rodríguez, M.Sc



**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO
CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**La Habana, Cuba
-2012-**



INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"
HOSPITAL DEL IPK
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA

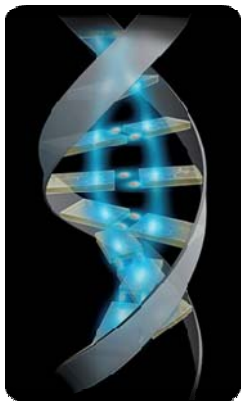
***Pneumocystis jirovecii* en fallecidos por sida, IPK,
1995-2008.**

Autor: Lic. Yaxsier de Armas Rodríguez, M.Sc

Tutores:

Dra. Virginia Capó de Paz, Dr.C.

Dr. Enrique José Calderón Sandubete, Dr.C.



**TESIS PRESENTADA EN OPCIÓN AL GRADO
CIENTÍFICO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD**

**La Habana, Cuba
-2012-**

Aquello que puedas hacer, o soñar, comiéndalo. La audacia tiene genio, poder y magia

Goethe

Confíe ciegamente, no en su capacidad para conseguir el triunfo, sino en la fuerza con que lo desea.

Horacio Quiroga

Siempre la culminación de un trabajo de tesis requiere la ayuda y el apoyo de un grupo necesario de personas vinculadas o no a esta actividad. Estas pueden ser clasificadas como protagónicas, otras esenciales e imprescindibles, pero sin lugar a dudas todas son consideradas importantes y de un valor extraordinario.

Este trabajo no existiría, hoy, sin el apoyo, la confianza y la ayuda de tres personas que se conjugaron en tres momentos bien diferentes de mi vida.

Al **Dr Jorge Pérez** por permitirme estar aún entre los trabajadores del IPK. Por confiar en mí cuando apenas me conocía, cuando realmente tenía un volcán entre sus manos. Gracias por su ayuda y posterior amistad, motivos importantes para seguir cada día trabajando mejor.

A la **Dra Virginia Capó** quien ha sido muy importante para mi vida, para alcanzar los objetivos y metas de mi tesis. Por brindarme su apoyo, su cariño, su respeto, por ser cada día una amiga, una madre, una profesora excelente. Por brindarme esperanza y hacerme soñar, por guiar mis locuras en la ciencia, por estar aquí... siempre a mi lado.

Al profesor y amigo el **Dr. Enrique Calderón**, por apostar todo al trabajo en la parafina, por brindarme la oportunidad de trabajar en su magnífico grupo, por estar siempre entre amigos, por entregarme su confianza, por escuchar mis comentarios y por brindarme los suyos, pero sobre todas las cosas, por ser mi amigo y dejarme saber que puedo contar siempre con su ayuda.

A los **amigos de allá, de Sevilla**, de la caracola, por permitirme estar como en casa en esos fructíferos 6 meses de mi estancia en esa bella ciudad. Por su amistad, por su compañía cuando era necesario, por su ayuda eterna. Para todos ellos mis más sinceros agradecimientos y el mejor de mis abrazos. Siempre estaré en deuda con vosotros, tíos.

A **mis amigos de aquí**, los del día a día, los que han aportado su ayuda sin pedir nada a cambio, a esos que son otros autores anónimos de este trabajo. Gracias a todo por su sincera amistad, por existir.

A **mi familia**, lo más importante en mi vida, la razón de ser de mi existencia.

A **mi madre** que cada día esta presente en todos los momentos de mi vida, por ser como es: lo más especial y mejor que conozco.

A **mi padre** por brindarme sus consejos y por enseñarme la otra cara de la vida.

A **mi hermana y su nueva familia** por su amor, por su amistad, por su entrega y cariño, por quererme tanto o más que como yo la quiero a ella.

A **mi esposa** por estar siempre a mi lado, en los buenos y en los malos momentos de la vida, por ser mi hombro solidario cuando algo anda mal, por ser mi columna cuando se necesita un apoyo, por ser mi amiga cuando necesito un consejo, por ser mi mujer cuando necesito amor. Su comprensión, ayuda y amor, unido al mejor obsequio que me ha entregado, es el mejor y máspreciado regalo que he tenido jamás.

A **mi hija** por ser esa fuerza extra, esa razón superior para existir, esa esperanza que se necesita cada día para seguir adelante, esa llama que nunca se agota, por ser simplemente eso: mi hija adorada.

Finalmente agradecer a **todos aquellos que puedan quedarse en el olvido** y que desafortunadamente no he nombrado por descuido, porque ellos, aún en el anonimato saben que les estoy totalmente agradecido.

El autor.

A mi adorada familia: el motor de mi vida.

A mis añorados abuelos que desafortunadamente ya no están con nosotros, pero sus enseñanzas guían a los que aún vivimos en este mundo.

Síntesis

SÍNTESIS

Se presentan los resultados de la caracterización genotípica de *Pneumocystis jirovecii* procedentes de 41 pacientes cubanos fallecidos por sida con neumocistosis entre los años 1995 y 2008. La secuenciación nucleotídica de los dos genes mitocondriales (mayor y menor) del patógeno permitió comprobar que existía un predominio mantenido en el tiempo del genotipo 3 (85T/248C) del mitocondrial mayor. De la misma manera, el estudio reportó por primera vez en la literatura mundial un nuevo genotipo del mitocondrial menor del patógeno (160A/196T). Estos resultados sugieren, que en nuestro medio, circula con una alta frecuencia (81,3 %) el genotipo 85T/248C//160A/196T. Adicionalmente, el análisis multilocus de las muestras investigadas sugiere una circulación limitada del patógeno en nuestra isla con la existencia de un genotipo clonal con estructura epidémica. El estudio también ofrece datos que indican que no existen mutaciones vinculadas a la resistencia a sulfamidas en muestras de tejidos embebidos en parafina de fallecidos cubanos por sida con *P. jirovecii* en la serie analizada. La investigación describe por primera vez en Cuba características socio-demográficas y clínicas de la infección por *P. jirovecii* en pacientes con VIH/sida. Los resultados obtenidos en este estudio demuestran la utilidad de las muestras fijadas en formol y embebidas en parafina para realizar estudios de epidemiología molecular de *P. jirovecii* durante 14 años. Este trabajo no solo es de un valor extraordinario para el conocimiento de la neumocistosis en Cuba, sino a nivel mundial. Por lo tanto, los resultados brindan informaciones novedosas que pueden ser utilizadas en un mejor manejo de esta enfermedad en los servicios de salud.

Abreviaturas

ABREVIATURAS

A

A: Adenina

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico

B

B3: Solución amortiguadora de lisis.

B5: Solución amortiguadora de lavado.

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

C

C: Citosina.

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

CTX: Cotrimoxazol

D

DHFR: Dihidrofolato reductasa (siglas en inglés).

DHPS: Dihidropteroato sintetasa (siglas en inglés).

dNTP: Desoxirribonucleótidos trifosfato.

d: días

E

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

EE.UU.: Estados Unidos de América.

F

FQ: Fibrosis quística.

FFPE: Tejido fijado en formol y embebido en parafina (siglas en inglés).

G

G: Guanina.

GMS: Coloración de plata metenamina de Gomori (siglas en inglés).

H

HC: Historias clínicas.

HE: Coloración de hematoxilina y eosina.

Hsp 70: Proteína de choque térmico 70 (siglas en inglés).

I

ICBN: Código Internacional de Nomenclatura Botánica (siglas en inglés).

IPK: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”.

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

K

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

Kb: Tamaño molecular aproximado de los cromosomas, expresado en Kilo bases (10^3 bases).

L

LPL: Leucoplasia pilosa en la lengua.

M

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

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

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

Mb: Tamaño molecular aproximado del genoma, expresado en Mega bases (10^6 bases)

P

PCMAPK: Proteína involucrada en los cambios morfológicos y en el ciclo de vida de

Pneumocystis jirovecii.

PcP: Neumonía causada por *Pneumocystis jirovecii*.

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

PCSTE20: Proteína involucrada en la adhesión del microorganismo a las células epiteliales alveolares.

PFGE: Electroforesis de campo pulsado (siglas en inglés).

PRT1: Proteína relacionada con la degradación de moléculas exógenas y con los procesos de variación antigénica del microorganismo

R

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

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

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

O

OR: Razón de disparidad (siglas en inglés)

S

SCID: Línea de ratones con inmunodeficiencia combinada grave

SMX: Sulfametoxazol.

SSCP: Polimorfismo conformacional de simple cadena

T

T CD4⁺: Linfocitos T, conocidas como células cooperadoras o ayudantes.

T: Timina

T1: Tampón de reacción lisis.

TA: Temperatura ambiente.

TARGA: Terapia antirretroviral de gran actividad.

TMP: Trimetoprim

TS: Timidilato sintasa.

V

VIH: Virus de inmunodeficiencia humana.

Índice

ÍNDICE

Acápites	Páginas
I. Introducción	1
I.1. Hipótesis	4
I.2. Objetivos	4
I.2.1. Objetivo General	4
I.2.2. Objetivos Específicos	4
I.3. Novedad Científica	5
I.4. Valor Práctico	5
I.5. Valor Teórico	6
II. Revisión Bibliográfica	7
II.1. Historia del microorganismo	8
II.2. Taxonomía	11
II.3. Microorganismo	13
II.4. Ciclo de vida	13
II.5. Microbiología	14
II.6. Genética	16
II.7. Prevalencia e incidencia de la enfermedad	17
II.8. Reservorio	19
II.9. Transmisión	20
II.10. Manifestaciones clínicas	22
II.11. Tratamiento y profilaxis	24
II.12. Caracterización Molecular	24
II.12.1. Genes estudiados en <i>P. jirovecii</i>	25
II.13. Métodos de tipificación molecular	31
III. Materiales y Métodos	33
III.1 Universo y muestra	34
III.1.1. Selección de los casos y los controles para el estudio	34
III.2 Extracción de ADN	35
III.3. Iniciadores	36

III.4. Caracterización genotípica de muestras de <i>P. jirovecii</i> procedentes de pacientes cubanos fallecidos por sida, mediante el empleo de los genes mt LSU rRNA y mt SSU rRNA.	37
III.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa para el gen mt LSU rRNA.	37
III.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa para el gen mt SSU rRNA.	37
III.4.3. Detección de los productos amplificados por la PCR.	38
III.4.4. Purificación de los productos de la PCR.	38
III.4.5. Secuenciación de los productos purificados de la PCR.	39
III.4.6. Métodos empleados para analizar y comparar secuencias.	39
III.5. Identificación de la existencia de muestras de <i>P. jirovecii</i> con resistencia a las sulfamidas mediante el estudio del gen de la DHPS.	39
III.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa para la DHPS.	39
III.5.2. Detección de los productos amplificados por la PCR.	40
III.5.3. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del gen de la DHPS.	40
III.6. Evaluación de la factibilidad de dos nuevos sistemas de PCR para la caracterización de <i>P. jirovecii</i> en muestras embebidas en parafina.	41
III.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa para el fragmento de 136 pb del gen mt LSU rRNA.	41
III.6.2. Detección de los productos amplificados por la PCR.	42
III.6.3. Purificación de los productos de la PCR.	42
III.6.4. Secuenciación de los productos purificados de la reacción en cadena de la polimerasa.	42
III.6.5. Métodos empleados para analizar y comparar secuencias.	42
III.6.6. Reacción en cadena de la polimerasa para el fragmento de 186 pb del gen de la DHPS.	43
III.6.7. Detección de los productos amplificados por la PCR.	43
III.6.8 Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del fragmento de 186 pb del gen de la DHPS.	43
III.7. Descripción de algunas variables socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico de los pacientes cubanos fallecidos por sida con neumonía por <i>P. jirovecii</i> y sus posibles	44

asociaciones con esta infección.	
III.7.1. Revisión de las historias clínicas de los fallecidos por sida con <i>P. jirovecii</i> .	44
III.8. Análisis estadístico	45
III.9. Aspectos éticos	46
IV. Resultados.	47
IV.1. Caracterización genotípica de muestras de <i>P. jirovecii</i> procedentes de pacientes cubanos fallecidos por sida, mediante el empleo de los genes mt LSU rRNA y mt SSU rRNA.	48
IV.2. Identificación de la existencia de muestras de <i>P. jirovecii</i> con resistencia a las sulfamidas mediante el estudio del gen de la DHPS.	51
IV.3. Evaluación de la factibilidad de dos nuevos sistemas de PCR para la caracterización de <i>P. jirovecii</i> en muestras embebidas en parafina.	52
IV.4. Descripción de algunas variables socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico de los pacientes cubanos fallecidos por sida con neumonía por <i>P. jirovecii</i> y sus posibles asociaciones con esta infección.	55
V. Discusión.	67
V.1. Caracterización genotípica de muestras de <i>P. jirovecii</i> procedentes de pacientes cubanos fallecidos por sida, mediante el empleo de los genes mt LSU rRNA y mt SSU rRNA.	68
V.2. Identificación de la existencia de muestras de <i>P. jirovecii</i> con resistencia a las sulfamidas mediante el estudio del gen de la DHPS.	73
V.3. Evaluación de la factibilidad de dos nuevos sistemas de PCR para la caracterización de <i>P. jirovecii</i> en muestras embebidas en parafina.	74
V.4. Descripción de algunas variables socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico de los pacientes cubanos fallecidos por sida con neumonía por <i>P. jirovecii</i> y sus posibles asociaciones con esta infección.	77
VI. Conclusiones.	87
VII. Recomendaciones	89
VIII. Referencias Bibliográficas	91
Anexos	

Introducción

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, el término *Pneumocystis* hace referencia a un género de hongos unicelulares que se encuentra en los seres humanos y en diversos mamíferos. Sin embargo, originalmente se creó para describir a un único microorganismo denominado *Pneumocystis carinii* que durante más de 80 años se consideró erróneamente como un protozoo capaz de infectar una amplia variedad de especies de animales. Esta idea se mantuvo hasta finales de los años 80 del siglo XX, cuando mediante técnicas de biología molecular se pudo identificar como un hongo atípico. Estudios posteriores permitieron demostrar que no se trataba de un patógeno único, sino de un grupo de microorganismos ubicuos con tropismo por los pulmones y con una alta especificidad por los huéspedes en los que habitan. Otras investigaciones llevaron a identificar diferentes especies dentro del género y han determinado que la especie que infecta al ser humano se denomine *Pneumocystis jirovecii*.¹

La neumonía causada por *Pneumocystis jirovecii* (PcP, siglas en inglés) es considerada una de las enfermedades oportunistas más frecuentes en los pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). A pesar del empleo de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) y de la quimioprofilaxis recomendada para su control, continúa ocasionando un impacto negativo en la salud de dichos pacientes en muchos países.¹ Todavía hoy es la infección oportunista más prevalente en los pacientes con sida y su frecuencia es elevada entre sujetos que presentan situaciones de inmunodepresión no relacionada con el VIH.¹

La carencia de un medio de cultivo microbiológico para este microorganismo es un obstáculo importante para su estudio, lo cual ha imposibilitado el conocimiento amplio de la epidemiología de la enfermedad que produce el patógeno, así como de su biología y susceptibilidad ante los fármacos de elección para su tratamiento.² Por esa razón, resulta decisivo el empleo de herramientas moleculares que permitan la detección y caracterización del mismo. Entre las dianas moleculares más empleadas para el estudio del microorganismo se encuentran los genes que codifican para la subunidad mayor y menor del ARN ribosómico mitocondrial (mt LSU rRNA y mt SSU rRNA, siglas en inglés, respectivamente) y el gen que codifica para la

dihidropteroato sintetasa (DHPS, siglas en inglés), en el cual se han descrito mutaciones puntuales que inducen resistencia a fármacos empleados para tratar la infección por *P. jirovecii*.¹

En Cuba, pocos estudios abordan esta problemática, hasta la actualidad solo existen cinco artículos científicos publicados. El primer caso de PcP en el país se reportó en 1969 por Rodríguez-Vigil.³ Posteriormente, Razón y colaboradores describieron la infección en siete niños malnutridos, de esta manera brindaron los primeros aportes a la clínica y epidemiología de la enfermedad en Cuba.⁴ Por su parte, Menéndez-Capote y Millán-Marcelo calcularon una tasa del 15 % de la enfermedad entre 40 pacientes VIH/sida ingresados en el Hospital del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK).⁵ Estos resultados fueron basados en los síntomas clínicos y los patrones radiológicos de los pacientes examinados. Arteaga y sus colegas, mediante el empleo de técnicas de tinción, encontraron 32 % de PcP entre 211 fallecidos por sida. Este estudio se desarrolló en casos con intensa inmunodepresión, cuyas necropsias se realizaron en el IPK en el periodo de 1986-1998.⁶ Finalmente, Hernández Puentes y colaboradores describieron un caso fatal de infección por *P. jirovecii* en una mujer con antecedentes de asma bronquial.⁷

Básicamente, el diagnóstico de la PcP se realiza por la observación microscópica de cualquier estadio de vida del patógeno en muestras clínicas tomadas de vías respiratorias provenientes del individuo. Entre estas, las obtenidas mediante broncoscopia muestran los mejores resultados. Sin embargo, su obtención representa un manejo invasivo para el paciente y en muchos países del mundo no se realizan de forma rutinaria para identificar al patógeno.¹ Por otra parte, en la literatura científica se constatan pocos estudios de este hongo en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (FFPE, siglas en inglés). Generalmente, estos últimos trabajos van encaminados solo a la identificación del microorganismo en este tipo de muestras.⁸

El diagnóstico de la PcP en Cuba se basa fundamentalmente en los hallazgos clínicos-radiológicos, lo cual puede conllevar a posibles errores pues existen agentes etiológicos que producen síntomas, signos y patrones radiológicos similares a los descritos en la infección por *P. jirovecii*.¹ Además, en el país, se desconoce el estado actual sobre la resistencia a los medicamentos de elección para tratar esta infección y no existe ningún método para evaluarla, lo

que conlleva a un problema importante a la hora de imponer el régimen terapéutico correcto para el paciente. Tampoco se cuenta con publicaciones que describan la distribución de genotipos en la isla. Por estas razones, decidimos emprender el estudio sobre este patógeno.

I.2 Hipótesis

Las muestras de pulmón conservadas en parafina de pacientes cubanos fallecidos por sida con neumonía por *P. jirovecii* son útiles para la caracterización genética, estudiar la epidemiología de esta infección y demostrar la asociación que existe entre ellas.

I.3. Objetivos

I.3.1. Objetivo General

Caracterizar la infección por *P. jirovecii* a partir de muestras de pulmón embebidas en parafina de pacientes cubanos fallecidos por sida entre 1995 y 2008.

I.3.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar genotípicamente muestras de *P. jirovecii* procedentes de pacientes cubanos fallecidos por sida, mediante el empleo de los genes mt LSU rRNA y mt SSU rRNA.
2. Identificar la existencia de muestras de *P. jirovecii* con resistencia a las sulfamidas mediante el estudio del gen de la DHPS.
3. Evaluar la factibilidad de dos nuevos sistemas de reacción en cadena de la polimerasa para la caracterización de *P. jirovecii* en muestras embebidas en parafina.
4. Describir algunas variables socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico de los pacientes cubanos fallecidos por sida con neumonía por *P. jirovecii* y sus posibles asociaciones con esta infección.

I.4. Novedad Científica

Este trabajo presenta varios aspectos de novedad científica, entre ellos se destacan:

- Primer estudio molecular de *P. jirovecii* y sida en Cuba.
- Primera caracterización genética de *P. jirovecii* en muestras cubanas de tejidos conservados en parafina.
- Primer reporte a nivel mundial de la existencia de un nuevo genotipo del gen mt SSU rRNA.
- Primera caracterización genética multilocus a nivel mundial de *P. jirovecii* en tejidos parafinados.
- Único reporte en la literatura internacional que describe la epidemiología molecular de *P. jirovecii* en muestras embebidas en parafinadas en un país durante 14 años de estudio.
- Primera evidencia mundial de una limitada variabilidad genética de muestras de *P. jirovecii* procedentes de un ámbito insular.
- Primera evaluación genética a nivel mundial de dos nuevos sistemas de amplificación genética (mt LSU rRNA y DHPS) en muestras parafinadas.
- Aporta información, a nivel internacional, para profundizar en los estudios genéticos en muestras conservadas en formol y embebidas en parafina.
- Este estudio brinda nuevos conocimientos sobre la biología y epidemiología de *P. jirovecii*, con lo cual se podrían trazar nuevas estrategias diagnósticas y de control de esta infección en pacientes VIH/sida, transplantados, diabéticos, con neoplasias y colonizados por este microorganismo.

I.5. Valor Práctico

Los resultados obtenidos permitieron la introducción de nuevos procedimientos y técnicas avanzadas para la detección y caracterización de *P. jirovecii* en pacientes con sospecha clínica de la infección por este agente. Además, la incorporación de métodos moleculares para determinar la resistencia a las sulfamidas en las muestras analizadas.

Gracias a la obtención de estos resultados el Hospital del IPK cuenta con las herramientas necesarias para realizar el diagnóstico rápido y fidedigno de este mortal patógeno, así como brindar tratamiento específico y oportuno a los pacientes seropositivos al VIH. Finalmente, se demuestra en el presente estudio, la factibilidad del empleo de los tejidos embebidos en parafinados para la detección y caracterización de *P. jirovecii* en individuos con esta infección.

I.6. Valor Teórico

Los resultados obtenidos en este trabajo tienen un importante valor teórico pues contribuyen al conocimiento de la biología y epidemiología de *P. jirovecii* en nuestro país. De la misma manera, brinda la primera información sobre la distribución de los genotipos del microorganismo y aporta elementos teóricos novedosos al conocimiento mundial sobre *P. jirovecii*.

Los resultados que conforman esta tesis fueron presentados en:

- 12 eventos científicos (5 nacionales y 7 internacionales)
- 6 publicaciones (una revista nacional y cuatro extranjeras).
- Dos Resultados Relevantes Institucionales en el 2008 y 2011.
- Ponencia Destacada a nivel municipal y provincial en el XVI Fórum Provincial de Ciencia y Técnica 2009.
- Proyecto Ramal 100138 aprobado por el MINSAP en el 2010.
- Premio al mejor trabajo al desempeño técnico en la jornada de las BTJ del IPK en el 2011.
- Premio Nacional de Academia de Ciencias de Cuba en el 2012.

Revisión Bibliográfica

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. Historia del microorganismo

Los microorganismos que hoy se conocen como *Pneumocystis* se observaron por primera vez en 1909 por Carlos Chagas (1879-1934). Este investigador describió en los pulmones de cobayos la presencia de numerosas formas esquizogónicas que interpretó de modo erróneo como una parte del ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*.⁹ Antonio Carini (1872-1950), un año después realizó una descripción similar de quistes en el pulmón de ratas infectadas con *Trypanosoma lewisi*.¹⁰ Sin embargo, ante la sospecha de que los quistes pertenecieran a un organismo desconocido, envió muestras histológicas a 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.

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.¹¹ 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 como Chagas se retractaron de sus descripciones originales. Ellos aportaron datos que sustentaban la investigación del matrimonio francés y Chagas tuvo que modificar su descripción inicial del ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*. En 1913, Aragão sugirió que este nuevo organismo debería colocarse dentro

del género *Klebsiella*, aunque reconoció su semejanza con otro protozoo encontrado en el intestino de los ratones, *Cryptosporidium*. Comenzaban así las dudas sobre su ubicación como protozoo.¹²

Los pocos estudios que precedieron a estas descripciones estuvieron orientados a conocer la distribución de *Pneumocystis* en el reino animal. Su presencia en una gran variedad de mamíferos (ratas, cobayos, monos y conejos en Brasil, ratas y ratones en Gran Bretaña y ratones en Suiza) sin evidencia de enfermedad hizo cuestionar su patogenicidad.¹³ Esto conllevó a 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 fueron escasas y un gran silencio lo acompañó.¹²

Una generación debió pasar antes de que pudiera relacionarse a *Pneumocystis* con alguna enfermedad en el hombre, aunque de forma inadvertida, Chagas ya había descrito en 1911 la presencia de los quistes típicos de *Pneumocystis* en la primera autopsia de un sujeto fallecido con tripanosomiasis americana.¹² En 1938 Ammich¹⁴ y Benecke¹⁵ reconocieron una forma de neumonía de origen desconocido que afectaba típicamente a niños prematuros o malnutridos, la cual se denominó neumonía intersticial de células plasmáticas. Esta infección adquirió proporciones epidémicas en Europa Central en el preludio de la Segunda Guerra Mundial y en los años inmediatamente posteriores. 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 casi inadvertido. Una década después, tres investigadores checos, Vanêk, Jírovec y Lukes hallaron la etiología de esta forma de neumonía, por lo que son considerados con frecuencia como sus primeros descubridores.¹²

En ese momento se pensaba que *Pneumocystis* solo afectaba a niños y no es hasta el inicio de la década de los sesenta cuando comienzan a describirse en Estados Unidos de América (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.¹⁶ Entonces no se disponía de estudios amplios que evaluaran el impacto real de la

enfermedad. Sería en 1974, cuando Peter Walzer realizó la primera investigación, al recopilar datos de 194 casos confirmados de neumocistosis. Este trabajo demostró que la malnutrición era un factor de riesgo para desarrollar la enfermedad y planteó además que esta podía presentarse en los pacientes con leucemias, linfomas, tumores sólidos y con trasplantes, lo que abrió las puertas a la investigación en esos grupos poblacionales.¹⁷

Los años entre 1970 y 1980 resultaron muy importantes en el estudio de *Pneumocystis*, porque unido al conocimiento alcanzado mediante la microscopia electrónica y los métodos de tinción existentes (plata metenamina de Gomori y Giemsa),¹⁸ aparecieron los primeros estudios con anticuerpos aislados de sueros de ratas. Los resultados fueron realmente sorprendentes, porque los anticuerpos procedentes de los sueros de ratas no reaccionaban con *Pneumocystis* obtenidos de humanos, pero sí lo hacían con otros procedentes de ratas.¹⁹ 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 jiroveci* en honor al científico checo Otto Jírovec, quien en 1951 relacionara el patógeno con la neumonía que aparecía en los niños prematuros y malnutridos.¹⁹

Más tarde, en febrero de 1981, Sandra Ford, una auxiliar de farmacia del Centro para la Prevención y el 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 constató 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.¹² Se descubría de esa manera los primeros casos de sida gracias a la infección de pacientes por un 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.

II.2. Taxonomía

La clasificación taxonómica de *Pneumocystis* ha sido problemática desde su descubrimiento y ha cambiado a largo de los años. Como se ha 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 (Tabla 1). Sin embargo, en 1970, Vavra y Kucera sugieren, basados en sus estudios ultraestructurales, que *Pneumocystis* puede ser un hongo.¹⁸ Ellos plantearon un prolongado debate sobre la naturaleza de este microorganismo que se vería esclarecido con el advenimiento de las técnicas de biología molecular.

Tabla 1. Características de *Pneumocystis* que comparten con los protozoos y hongos.

Protozoos	Hongos
Ciclo de vida similar a los protozoos.	La secuenciación de los cDNA de alrededor de 2 000 genes conservan homología con la secuencia de 1 412 genes homólogos en los hongos.
Ausencia de algunas características fenotípicas de los hongos.	Ausencia de estructura para la motilidad.
Presencia de características morfológicas típicas de los protozoos.	Ausencia de estructura para fagocitar.
Inefectividad de los fármacos antifúngicos	Presencia de 1,3 β D glucano en la pared
Efectividad de los fármacos empleados para tratar a los protozoos.	Similitud con la pared celular de los hongos.

Modificado de Sritangratanakul S, Nuchprayoon S, Nuchprayoon I. Pneumocystis Pneumonia: An Update. J Med Assoc Thai 2004; 87 (Suppl 2): S309-17

La primera evidencia molecular de que este microorganismo es un hongo fue aportada por Edman y colaboradores en 1988. Estos investigadores encontraron que la secuencia nucleotídica

del gen 16 S del ARN ribosómico de *Pneumocystis* presentaba mayor homología con la de los hongos que con la de los protozoos.²⁰ Estos mismos resultados fueron corroborados por Stringer y sus colegas un año más tarde.²¹ Además, otros genes importantes como la subunidad mayor del ARN ribosómico mitocondrial y otros siete genes mitocondriales contiguos mostraron una significativa similitud con sus respectivos genes en los hongos.²¹ Otras evidencias importantes se identificaron; 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 (TS) y la dihidrofolato reductasa (DHFR) en *Pneumocystis* son dos enzimas diferentes, mientras en los protozoos es una proteína con doble función.¹²

Las técnicas moleculares también evidenciaron que existía una gran heterogeneidad genética en *Pneumocystis*, la cual está estrictamente correlacionada con la especie del huésped.²² Para reflejar estas diferencias se propuso en 1994 de forma provisional, mientras se describían o reescribían cada una de las especies del género *Pneumocystis*, un sistema de denominación 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 *P. carinii* f. sp. *hominis*, mientras que *P. carinii* f. sp. *carinii* es una de las especies que infecta a las ratas y *P. carinii* f. sp. *murine* la que infecta al ratón.²³

Sin embargo, Frenkel en 1976 ya había propuesto el nombre de *P. jiroveci* para el patógeno que afecta al hombre, en aquel momento el microorganismo 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, siglas en inglés). Eso conllevó a que cambiara el nombre anterior por *P. jirovecii* (ICBN artículos 32.7 y 60.11). Su ubicación taxonómica actual es en el Reino: Fungi, Phylum: Ascomycota, Clase: Pneumocystidomycetes, Orden: Pneumocystidales y Familia: *Pneumocystidaceae*.²⁴

II.3. Microorganismo

P. jirovecii es un hongo atípico, extracelular, ubicuo, unicelular, no cultivable y con marcado estenoxenismo. Usualmente se encuentra restringido a 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 Antártida.²⁵

II.4. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Pneumocystis* ha sido revisado recientemente²⁶, pero la ausencia de proliferación de este hongo atípico en medios de cultivos tradicionales ha impedido esclarecer detalles importantes del mismo. Están interrelacionadas en el ciclo de vida 3 principales formas morfológicas: las tróficas, las esporocíticas y los quistes maduros (Figura 1). Cada una de ellas difiere en cuanto a tamaño, diámetro de la pared celular, así como en la filopodia (proyecciones citoplasmática). También otras diferencias como la forma del estadio, presentes en el ciclo de vida, varían desde irregular en la forma trófica, hasta ovoide en el resto de las formas morfológicas. Se considera que las formas tróficas son el estadio más abundante en el ciclo de vida del organismo, que representa de 90 a 95 % de la población de *Pneumocystis* en el pulmón del paciente infectado.²⁶ En 1984, Matsumoto y Yoshida observaron la formación del complejo sinaptonémico en el núcleo de esporocitos tempranos, lo que sugiere la división mitótica del ciclo sexual.²⁷ Con estas y otras evidencias importantes, se sugiere un ciclo de vida peculiar, en el cual tanto la forma asexual como sexual se describen como modo de multiplicación del patógeno.^{26,27}

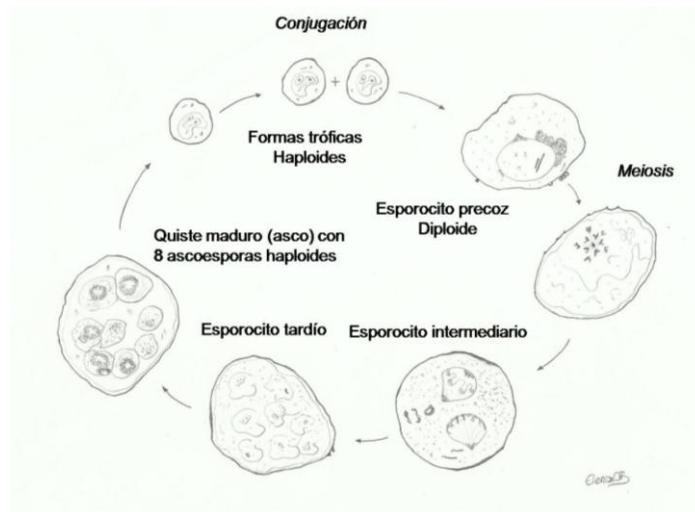


Figura 1. Ciclo de vida de *Pneumocystis jirovecii* (Modificado del artículo: Aliouat-Denis CM, Martinez A, Aliouat el M, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E. The *Pneumocystis* life cycle. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(3):419-26).

II.5. Microbiología

El principal obstáculo en el conocimiento de la biología y para el estudio genético de *Pneumocystis* radica en la carencia de crecimiento continuo en medios de cultivo *in vitro*.² El intento por obtener *Pneumocystis* no deja de ser interesante y muchos investigadores no han perdido el interés por el tema. En 1979, Bartlett y otros consiguieron mantener el microorganismo durante un tiempo breve en una línea celular de mamíferos²⁸ y en 1990, Cushion y colaboradores en un medio axénico.²⁹ Posteriormente, utilizando otra vez líneas celulares de mamíferos cocultivadas, se logró mantener la infectividad en animales experimentales durante 42 d, aunque el número de microorganismos disminuía a los 10 d de inicio del experimento.³⁰ Por último, Merali y sus colegas comunicaron el logro del cultivo continuo de *P. carinii* en medio axénico, sin embargo, este hallazgo no ha podido ser reproducido jamás en otros laboratorios, por lo cual queda como un reto pendiente esta temática.³¹

Lo esencial que ha ayudado a esclarecer algunas cuestiones sobre la biología de *Pneumocystis* ha sido el desarrollo de modelos animales de neumocistosis.² Varios mamíferos han servido como ejemplo, donde se ha logrado desarrollar la infección por *Pneumocystis* spp.

Estos experimentos son de suma importancia para estudios moleculares, bioquímicos, evaluaciones de fármacos y para la visualización microscópica del ciclo de vida del patógeno.³²

La carencia de ergosterol en la membrana celular 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 celulares de los mamíferos. La ausencia de ergosterol en su membrana explica su resistencia natural a la anfotericina B, azoles y alilaminas.³³

Desde el punto de vista proteico, lo fundamental de *Pneumocystis* radica en la glicoproteína mayor de superficie (MSG, siglas en inglés), la más abundante en el microorganismo. Se estima que constituye las tres cuartas partes de las proteínas totales, siendo la primera proteína aislada y caracterizada en el microorganismo. Posee un peso molecular de 120 kDa, con un porcentaje de carbohidratos entre 5 y 10 %; la manosa es el principal componente de sus hidratos de carbono.³⁴ La MSG desempeña un papel importante al presentar una gran variabilidad antigénica, que probablemente le sirve para evadir la respuesta inmune del huésped. También se ha reportado que la síntesis de antígenos recombinantes de la misma se ha utilizado para estudios seroepidemiológicos y de respuesta serológica frente a la infección por *Pneumocystis*.³⁵

La PCSTE20 y la PCMAPK son otras proteínas importantes en este patógeno. Se ha demostrado que estas moléculas participan en los cambios morfológicos, el ciclo sexual y en la unión del hongo a las células del epitelio alveolar.³⁶ Asimismo, las PRT1 también desempeñan una función relevante relacionada con la degradación de moléculas exógenas y con los procesos de variación antigénica del microorganismo.³⁷ La proteína de choque térmico 70 (*Hsp 70*) es otra de las más abundantes en *Pneumocystis*, se involucra en procesos relacionados con el estrés, con un papel esencial en el metabolismo del hongo.³⁸ La importancia de la DHPS radica en su posible vínculo con la resistencia a las sulfamidas. Por otra parte, la identificación de mutaciones presentes en el gen que controla la síntesis de esta enzima resulta útil para estudios de epidemiología molecular de *Pneumocystis*.¹

II.6. Genética

El conocimiento del genoma de *Pneumocystis* puede esclarecer muchas cuestiones oscuras relacionadas con la biología de este patógeno. Sin embargo, la ausencia de crecimiento *in vitro* del microorganismo ha limitado de modo considerable los estudios relacionados sobre 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 limitante del cultivo microbiológico y a la mezcla del ADN del huésped cuando se utilizan modelos animales para la obtención de estos microorganismos.³⁹

A pesar de estas dificultades, con otras técnicas moleculares 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 alrededor de 15 cromosomas lineales con un tamaño aproximado entre los 300 y 700 Kb. Se estima además, que el genoma total del microorganismo sea de 7,7 Mb, con una composición nucleotídica rica en contenido de A/T (60-65 %). Es válido mencionar, que las regiones codificadoras del material genético contienen un intrón o más de tamaño corto, aproximadamente 50 pb. Otro elemento de sumo interés son las regiones terminales de los cromosomas, porque estos contienen genes que codifican antígenos de superficie del microorganismo.⁴⁰ Para que se tenga en cuenta la dimensión del genoma lineal de *Pneumocystis*, una simple comparación de materiales genéticos de diferentes microorganismos demostró que se ubica entre el genoma de *Echerichia coli* (4,2 Mb) y el de *Saccharomyces cerevisiae* (12 Mb). Esta comparación de genomas resulta de mucho interés, porque revela posibles asociaciones entre el contenido de genes y el estilo de vida de los microorganismos considerados. Específicamente, en el caso de *Pneumocystis*, su dependencia del huésped para realizar muchas funciones vitales. Al parecer, la esencia del problema, radica en que una parte sustancial del genoma de *Pneumocystis* no codifica ninguna proteína y ocupan un valor importante (10 %) los espacios intergénicos.⁴¹ Estimaciones realizadas sugieren que alrededor de 6 Mb del material genético de *Pneumocystis* puede ser codificable. Si se considera que el promedio de las proteínas del patógeno está alrededor de los 50 kDa, este genoma pudiera codificar unas 4 000 moléculas proteicas, lo cual coincide con lo comunicado para *E. coli* con su correspondiente menor tamaño (4,2 Mb).⁴¹

Muchas esperanzas se depositan en el proyecto de secuenciación del genoma de *P. carinii* (<http://pgp.cchmc.org>), porque ayudaría a esclarecer cuestiones importantes sobre la biología del microorganismo.

II.7. Prevalencia e incidencia de la enfermedad

Hasta 1980 la PcP no era frecuente y se asociaba con síndromes de inmunodeficiencias o situaciones de intensa inmunosupresión, particularmente con la quimioterapia del cáncer. En la pandemia del VIH, la neumocistosis emergió como la enfermedad más común definitoria de sida en los países industrializados. Antes de la introducción de la profilaxis, 60 % de los pacientes con sida eran identificados por presentarla. Además, se estimó que hasta 80 % de los pacientes con números de linfocitos T CD4⁺ menores que 200 células/mm³ podían desarrollar esta enfermedad.⁴²

En la era de la TARGA ha ocurrido una franca disminución de muchas infecciones oportunistas y la PcP no es una excepción. Los casos de la enfermedad disminuyeron 3,2 % por año desde 1992 hasta 1995 con la utilización de quimioprofilaxis. Después con la introducción de la TARGA, la tasa continuó descendiendo hasta valores de 21,5 % por año desde 1996 hasta 1998.⁴³ En la actualidad, la PcP presenta una incidencia de 9,5 episodios por 100 personas al año en pacientes infectados por el VIH y se observa en más de 50 % de los pacientes con sida.⁴⁴ En un estudio prospectivo realizado recientemente en Uganda se demostró que la PcP no era una enfermedad tan rara como se creía en el continente africano, porque se identificó *P. jirovecii* en 40 % de los individuos seropositivos al VIH.²⁵

Actualmente, la neumocistosis ha adquirido una importancia creciente, sobre todo, en sujetos inmunodeprimidos no infectados con el VIH, como pacientes con cáncer, hemopatías malignas, afecciones inflamatorias crónicas para las cuales se utiliza tratamiento con fármacos inmunodepresores y receptores de trasplante de cualquier tipo. La incidencia de la enfermedad entre estos grupos de pacientes puede alcanzar hasta 40 %, con 50 % de mortalidad.⁴⁴

La incidencia de la PcP varía de acuerdo con el tipo de proceso en los pacientes con cáncer, que oscila entre 22 y 45 % en aquellos con leucemia linfoblástica aguda o con linfoma no-Hodgkin; 25 % en los individuos con rhabdomyosarcoma y 1,3 % en los sujetos con tumores sólidos que reciben tratamiento con esteroides. También, la PcP ha sido identificada como complicación del mieloma múltiple y la macroglobulinemia. Por otra parte, la enfermedad afecta a más de 25 % de los pacientes con inmunodeficiencia severa combinada.⁴⁵

En los individuos sometidos a trasplante cardíaco se ha descrito una incidencia de 2 a 10 % de la enfermedad, que varía de acuerdo con su distribución mundial. Por otra parte, se ha estimado una incidencia de la PcP de 25 % en los pacientes sometidos a trasplantes de pulmón y de corazón-pulmón.⁴⁶

La PcP también puede afectar a pacientes con otros tipos de enfermedades, como granulomatosis de Wegener, asma, glomerulonefritis, rectocolitis ulcerosa; y otras condiciones como lupus eritematoso sistémico, poliarteritis nodosa, polimiositis, dermatomiositis, artritis reumatoide, sarcoidosis y pénfigo. En general son personas que han estado recibiendo terapia inmunosupresora intensa. Además, la infección por *P. jirovecii* ha sido vinculado con el desarrollo de trastornos autoinmunes como el desarrollo de anticuerpos anticardiolipina y el síndrome de Goodpasture.⁴⁴⁻⁴⁷

En dos investigaciones seroepidemiológicas se ha puesto de manifiesto que la primoinfección por *Pneumocystis* se produce en los primeros años de la vida y constituye una circunstancia muy frecuente. Estudios realizados en niños de España y Chile demostraron una seroprevalencia de 73 y 85 %, respectivamente.^{48,49} También, existe evidencia de la relación entre este fenómeno y el aumento de la edad (52 % a los 6 años, 80 % a los 13 años).⁵⁰ Por otra parte, resulta interesante conocer que publicaciones realizadas en EE.UU. y España describen pacientes sin predisposición aparente o inmunocompetentes que desarrollaron PcP. Sin embargo, este hallazgo es poco frecuente.^{50,51}

La identificación del microorganismo por métodos moleculares como la PCR ha permitido demostrar la presencia del patógeno en diferentes muestras biológicas sin manifestaciones

clínicas ni radiológicas de neumonía; ese fenómeno se conoce como colonización.⁵² Este hecho ha revolucionado la epidemiología de la PcP porque estas personas pueden actuar como reservorio del microorganismo y transmitirlo a otros individuos susceptibles. La colonización por *P. jirovecii* es frecuente en pacientes con infección por el VIH. Se ha descrito prevalencia desde 46 hasta 68 %, en los que se destaca como factores de riesgos el número de linfocitos T CD4⁺ < 50 células/mm³, la ausencia de quimioprofilaxis con cotrimoxazol (CTX, siglas en inglés), el tabaquismo y la ciudad de residencia.⁵³

Otro grupo importante de pacientes colonizados son aquellos con enfermedad pulmonar crónica, entre los que la prevalencia de colonización oscila desde 21,5 % en los pacientes con fibrosis quística (FQ) hasta 40,5 % en los casos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). En pacientes con enfermedades pulmonares intersticiales, este fenómeno se observa en 33,8 %; que varía entre 19,8 % descrito en la sarcoidosis y 37,8 % observado en la neumopatía intersticial idiopática.^{53,54} Además, 10 % de los niños sanos y 15 % de aquellos con síntomas respiratorios pueden estar colonizados por el patógeno.⁴⁹

Un mejor conocimiento de la epidemiología de la PcP resulta esencial para poder trazar estrategias correctas, para la prevención de la enfermedad en las poblaciones de riesgo en que este patógeno actúa.

II.8. 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 material genético del patógeno en aguas de charcas y en el aire circundante en huertos; incluso en muestras obtenidas en habitaciones de pacientes con la enfermedad, lo que sugiere su capacidad infectiva. Sin embargo, hasta la fecha, ningún reservorio ambiental ha sido encontrado, aunque no puede excluirse esta posibilidad.⁵⁵

El estudio comparativo del material genético de *Pneumocystis* obtenido de diferentes mamíferos, ha demostrado que se trata de especies distintas; trabajos realizados con modelos

animales han evidenciado la imposibilidad de que se produzcan infecciones cruzadas entre especies. Esto demuestra que la enfermedad en el hombre es una antroponosis, donde el único reservorio es el propio ser humano.⁵³ Existe una hipótesis que sugiere que los niños pueden actuar también como reservorio de *P. jirovecii*, esto se sustenta en que 85 % de ellos presentan anticuerpos contra este microorganismo a los 20 meses de edad.⁵⁶ Además, los individuos colonizados pueden actuar como reservorio del microorganismo y ser potencialmente transmisores del patógeno a sujetos susceptibles.⁵⁷

II.9. Transmisión

El modo de transmisión de *P. jirovecii* ha sido un aspecto interesante y no menos debatido en la epidemiología de este 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 reciente de la infección.⁵⁸ En la actualidad, gracias a evidencias moleculares, los estudios abogan por la adquisición reciente más que por la reactivación de una infección latente.¹ La primera evidencia que soporta esta hipótesis fue demostrada por Keely y sus colegas que encontraron diferentes genotipos de *P. jirovecii* en pacientes con sida que habían sufrido episodios recurrentes de la enfermedad.⁵⁹ Por otra parte, Beard y colaboradores realizaron un estudio en pacientes con PcP de varias ciudades estadounidenses. Ellos observaron la variación geográfica de los genotipos de *P. jirovecii* y demostraron que el genotipo presente en el momento del diagnóstico del paciente correspondía al lugar de residencia actual y no a su lugar de nacimiento.⁶⁰ Si hubiese sido una reactivación de una infección latente, el genotipo resultante del individuo coincidiría con el existente en su lugar de nacimiento. Otra evidencia descrita, es la presencia de muestras de *P. jirovecii* con mutaciones en el gen que codifica para la DHPS, enzima diana de las sulfonamidas utilizadas para la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad, en pacientes que nunca habían sido expuestos a estos fármacos. Este hallazgo sugiere una adquisición reciente de la infección desde otros individuos que han sido sometidos previamente a una presión selectiva por el fármaco en cuestión.⁶¹

Se han publicado otros estudios importantes que corroboran esta hipótesis y desechan la teoría de la reactivación de una infección latente. De esa manera varios brotes de PcP se han

descrito en diferentes regiones geográficas, con agrupamientos similares de genotipos del patógeno en las muestras de los individuos involucrados.^{62,63} Finalmente, estudios realizados en ratas con *P. carinii*, examinadas durante 1 año con métodos histológicos y moleculares, demostraron la curación de la enfermedad con una erradicación completa del microorganismo en la mayoría de los casos.⁶⁴

El modo exacto de transmisión de un individuo a otro no ha sido del todo esclarecido y la forma infectiva del parásito todavía no se identifica. En el caso de *Pneumocystis* se propone un modelo de transmisión similar al que se describe para *Mycobacterium tuberculosis*. Se plantea la vía aérea como vehículo, ya que las formas tróficas del parásito de 2 a 4 µm, son similares en tamaño al bacilo tuberculoso (1-3 µm), las cuales pueden ser expectoradas por el paciente infectado y mediante gotas de Pflügge inhaladas por los sujetos susceptibles. Esta teoría fue postulada por Ng y colaboradores en 1997.⁶⁵ Por otra parte, investigaciones por microscopía 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. Otros estudios sugieren, que los quistes maduros presentes en la luz bronquial podrían alcanzar el medio ambiente y transmitirse a otros huéspedes susceptibles.⁵⁸ Recientemente, estudios en ratones experimentales han demostrado que los quistes son probablemente la forma de infección del microorganismo.⁶⁶

Se ha debatido mucho sobre la cuestión del periodo de incubación de la infección por *Pneumocystis*. Estudios realizados sugieren que el mismo pudiera estar comprendido entre las 3 y 12 semanas, lo cual coincide con los experimentos desarrollados en animales de experimentación.^{67,68} En estos, se ha comprobado que es suficiente solo con 1 d de exposición para que ratones inmunocompetentes adquieran la infección de ratones SCID con *P. carinii*.⁶⁹ La transmisión interindividual de *P. jirovecii* desde pacientes hospitalizados se ha constatado en diferentes estudios que incluyeron una amplia gama de lugares: unidades pediátricas, salas de enfermedades infecciosas, unidades de cuidados intensivos, unidades de trasplantes o salas de oncología.⁵⁸ Recientemente, Rivero y colaboradores han demostrado en el seno de una familia española la posible transmisión de *Pneumocystis* desde unos sujetos colonizados a un individuo susceptible.⁷⁰ Varios autores consideran que la transmisión directa entre individuos por vía aérea

constituye la forma más importante de diseminación de esta infección.^{58,65,67} Sin embargo, en otros casos no ha existido suficiente evidencia para demostrar la transmisión interindividual del microorganismo, por lo que existen resultados contradictorios en la literatura.⁷¹

La transmisión vertical transplacentaria de *Pneumocystis* ha sido demostrada en conejos, pero no parece ocurrir en ratas y ratones con inmunodeficiencia severa.⁷² En los humanos este tema ha sido discutido y debatido por varios años. Antes de la epidemia de sida se había sugerido esta hipótesis en neonatos con neumonía.¹² Más tarde, en 1995, Mortier y otros publicaron un controvertido caso de infección por *Pneumocystis* en el feto de una madre con infección VIH y PcP que no pudo ser corroborado después utilizando inmunofluorescencia con anticuerpos específicos.⁷³ Recientemente, se ha publicado la primera evidencia molecular de la existencia de transmisión transplacentaria en humanos, que abre las puertas a un nuevo campo de investigación en *Pneumocystis* con profundas implicaciones en la clínica y en la epidemiología del microorganismo.⁷²

II.10. Manifestaciones clínicas

La PcP puede resultar difícil de identificar y un verdadero reto si se pretende diagnosticar solo por la clínica del paciente, ya que diferentes infecciones comparten signos y síntomas similares a esta infección.²⁵ Atendiendo a la edad y a la enfermedad de base responsable de la inmunodepresión, clásicamente se han diferenciado cuatro formas clínicas de infección por *Pneumocystis*: asintomática; infantil o neumonía intersticial de células plasmáticas; neumonitis esporádica niño-adulto de pacientes inmunocomprometidos; e infección extrapulmonar. Hoy día habría que añadir la PcP asociada al síndrome de reconstitución inmune.¹

La enfermedad se presenta generalmente 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 inadvertida y progresar de modo gradual. La fatiga es una de las principales quejas en los pacientes con esta infección, mientras que el dolor torácico, los escalofríos y la sudoración nocturna son menos frecuentes. La hemoptisis también se ha registrado en los pacientes

aquejados por la enfermedad. Por otra parte, la exploración clínica puede mostrar taquicardia, cianosis, y crepitantes finos a la auscultación de los afectados.⁷⁴⁻⁷⁶

La presentación clínica de la PcP difiere en sus características entre individuos con infección VIH de aquellos inmucomprometidos por otras razones.⁴⁴ De manera general los pacientes con infección por VIH presentan un desarrollo subagudo con síntomas más prolongados de la infección; típicamente incluyen el establecimiento de tos seca y disnea con fiebre o sin esta de 1 a 2 semanas de evolución. Al examen físico puede apreciarse taquipnea, taquicardia y, en ocasiones cianosis; pero la auscultación torácica en general es normal, con presencia a veces de algunos sibilantes. La hipoxemia desencadenada por el ejercicio es otro elemento presente en este tipo de sujetos. Hasta un 27 % de los individuos con infección por VIH que desarrollan PcP pueden presentar una insuficiencia respiratoria que requiera ventilación mecánica.⁷⁶

En cambio, en pacientes sin infección por VIH, la enfermedad tiene un comienzo más rápido con pocos días de evolución clínica y mayor gravedad, caracterizada frecuentemente con una marcada hipoxemia.⁷⁷ Un ejemplo interesante lo constituyen los individuos con trasplantes, 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 individuos con trasplantes cardíaco-pulmonares los síntomas pueden estar ausentes debido a la denervación del pulmón trasplantado. Diferentes estudios han señalado que en sujetos con inmunodepresión secundaria al tratamiento de enfermedades neoplásicas o trasplantes, la enfermedad tiene una presentación subaguda, de más de 24 h y menos de una semana. En sujetos con trasplantes de órganos sólidos la PcP puede ocurrir también con un desarrollo crónico.^{44,45}

Phair y otros al comparar dos grupos de pacientes (uno con infección por VIH y otro sin esta), encontraron que los primeros presentaban una mayor tensión arterial de oxígeno y un menor gradiente alvéolo-arterial. También observaron que en estos individuos los lavados broncoalveolares contenían una significativa menor cantidad de neutrófilos en comparación con los sujetos seronegativos al VIH.⁷⁸ En otros estudios publicados se realizaron similares comparaciones y se encontró que los sujetos con sida y PcP tenían una mayor duración media de

los síntomas, menor frecuencia respiratoria y mayor presión parcial arterial de oxígeno, sin encontrarse diferencias en la supervivencia entre los pacientes con sida y sin esta enfermedad.^{44,79} Sin embargo, se ha publicado que las tasas de mortalidad por PcP son diferentes entre estos dos grupos, en aquellos sin infección VIH oscilan entre 30 y 60 %, mientras que entre los VIH positivos resultan de 10 a 20 %.⁶⁶

II.11. Tratamiento y profilaxis

Desde hace años, por su alta eficacia y disponibilidad en forma oral e intravenosa, la asociación a dosis fijas de trimetoprim (TMP) y sulfametoxazol (SMX) (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.¹ 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 a las que en otros microorganismos inducen resistencia a este grupo de fármacos. En *P. jirovecii* estas mutaciones están aparentemente asociadas al uso previo de sulfamidas y podrían indicar también la presencia de fenotipos del parásito resistentes a las mismas.⁴² Existen alternativas al CTX para el tratamiento y la profilaxis de la PcP, que incluyen la dapsona, la pentamidina y la atovacuona entre otras, pero la información disponible sobre su eficacia es más limitada.¹

II.12. Caracterización Molecular

Los estudios moleculares, mediante diversas técnicas como la PCR, la secuenciación del ADN y el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, siglas en inglés) han tenido un importante impacto en el conocimiento de la biología de las diferentes especies de *Pneumocystis*, así como en la epidemiología de la enfermedad en los humanos.⁸⁰ Los constantes avances en esta área han permitido determinar que los microorganismos conocidos como *Pneumocystis* no son una especie de protozoo, sino un género de hongo compuesto por diferentes especies, las cuales están estrechamente adaptadas a sus diversos hospederos mamíferos. Además, han podido demostrar que *P. jirovecii* afecta específicamente a humanos y

que no hay infecciones cruzadas con otros mamíferos.² De la misma manera estas investigaciones han evidenciado que el hombre es el único reservorio del patógeno y que es transitoria la colonización por el mismo durante el transcurso de su vida.^{1,25} Por otra parte, los métodos moleculares han aportado evidencias de que la transmisión del patógeno es de persona a persona y han demostrado que la resistencia a la sulfamida aparece como un proceso emergente y que se debe tener en consideración.^{42,60}

II.12.1. Genes estudiados en *P. jirovecii*

Aproximadamente, se han estudiado unos 15 genes de *Pneumocystis* con diferentes objetivos (Tabla.2), entre los que se destacan: diagnóstico, estudios de patrones de transmisión, severidad de la infección, fracaso del tratamiento y la profilaxis en los pacientes con PcP.^{1,42,60,80}

Tabla 2. Estudios de genes evaluados en *Pneumocystis jirovecii*.

Diana/Tipo de PCR	Abreviatura para identificar los cebadores	Secuencias de Cebadores	Referencia
Arom (5-enolpiruvilsiquimato 3- fosfato sintasa PCR anidada	Primera ronda AroFunivB AroFunivC	5'ATCCCACCAN(T,C)(A,C)NGGCCA3' 5'(A,G)ATATGGA(A,G)(T,C)CAATGACNGA3'	Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998; 36(1):90-3
	Segunda ronda HsPcaro1/RI HsPcaro2/RI	5'GGGAATTCTTAACAACAACAATTTTAGCC3' 5'GGGAATTCGGTGAAATGCATGCCAAGAC3'	Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998; 36(1):90-3
β -tubulina PCR simple	Cebador 1	5'TCATTAGGTGGTGGAACGGG3'	Ma L. J Infect Dis. 2002; 186(11):1647 -54.
	Cebador 2	5'ATCACCATATCCTGGATCCG3'	
cdc 2 PCR tiempo real	Cebador 1	5'AGGTAGGAGAAGGTAAGAAA3'	Arcenas RC. Diag Microbiol Infect Dis 2006; 54(3): 169-75
	Cebador 2 Sondas de hibridación	5'GCTGTGCTTGAACCC3' 5'GATCTTGAAAATGGCACAATAGTAG-fluorescein-3' 5'Red 640-TTAAAAAATCCGGCTAGAAGCAGAAG- phosphate-3'	
Citocromo B PCR simple	CytbFw	5'CCCAGAATTCTCGTTTGGTCTATT3'	Esteves F. Infect Genet Evol. 2010; 10(2):192-9.
	CytbRw	5'AAGAGGTCTAAAAGCAGAACCCTCAA3'	
DHPS PCR anidada	Primera ronda DHPS F1	5'CCTGGTATTAACCAGTTTTGCC3'	Lane BR. J Infect Dis. 1997;175(2): 482-5.
	DHPS B ₄₅	5'CAATTTAATAAATTTCTTTCCAAATAGCATC3'	
	Segunda ronda DHPS A _{Hum} DHPS BN	5'GCGCCTACACATATTATGGCCATTTTAAATC3' 5'GGAACCTTCAACTTGGCAACCAC3'	Lane BR. J Infect Dis. 1997;175(2): 482-5.
DHFR PCR anidada	Primera ronda FR 208	5'GACGAAAGTAGGTACATTATTACGAGA3'	Ma L. J Infect Dis. 1999;180(6): 1969-78
	FR 1038	5'AACCAGTTACCTAATCAAATATATTGC3'	
	Segunda ronda FR 242 FR 1018	5' GTTTGAATAGATTATGTTTCATGGTGTACG3' 5'GCTTCAAACCTTGTGTAACGCG3'	Ma L. J Infect Dis. 1999;180(6): 1969-78

Tabla 2. Continuación...

Diana/Tipo de PCR	Abreviatura para identificar los cebadores	Secuencias de Cebadores	Referencia
ITS PCR anidada	Primera ronda 1724F	5'AAGTTGATCAAATTTGGTC3'	Lu JJ. J Clin Microbiol. 1995;33(10): 2785-8.
	ITS2R	5'CTCGGACGAGGATCCTCGCC3'	
	Segunda ronda ITS1F	5'CGTAGGTGAACCTGCGGAAAGGATC3'	Lu JJ. J Clin Microbiol. 1995;33(10): 2785-8
	ITS2R1	5'GTTTACGCGGGTGATCCTGCCTG3'	
<i>Hsp 70</i> PCR en transcripción reversa	HSP-Ph-SA1 HSP-Ph-SA2	5'GTATTAGGAAAGATGAAAG3' 5'CAGTAGGCTCATTGATTAA3'	Latouche S J Eukaryot Microbiol 2001; Suppl:176S- 177S.
MSG PCR simple	GK242 GK244	5'TATTTCTTGATCTATGCGCT3' 5'TCCGCGCAAAAATAAGCACT3'	Ma L. J Infect Dis. 2002; 186(11):1647 -54.
mt LSU rRNA PCR anidada	Primera ronda pAZ102-H	5'GTGTACGTTGCAAAGTACTC3'	Wakefield AE Lancet. 1990;336(871 3):451-3
	pAZ102-E	5'GATGGCTGTTTCCAAGCCCA3'	
	Segunda ronda pAZ102-X	5'GTGAAATACAAATCGGACTAGG3'	Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998; 36(1):90-3
	pAZ102-Y	5'TCACTTAATATTAATTGGGGAGC3'	
mt SSU rRNA PCR anidada	Primera ronda pAZ112-10F/RI	5'GGGAATTCTAGACGGTCACAGAGATCAG3'	Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998; 36(1):90-3
	pAZ112-10R/RI	5'GGGAATTCGAACGATTACTAGCAATTCC3'	
	Segunda ronda pAZ112-13/RI	5'GGGAATTCGAAGCATGTTGTTTAATTCG3'	Tsolaki AG. J Clin Microbiol. 1998; 36(1):90-3
	pAZ112-14/RI	5'GGGAATTCTTCAAAGAA(T,C)CGAGTT(T,C)CAG3'	
5 S rRNA PCR simple	Cebador 1 Cebador 2	5'AGTTACGGCCATACCTCA3' 5'AAAGCTACAGCACGTC3'	Kidata K J Protozool. 1991;38(6):9 0S-91S.

Tabla 2. Continuación...

Diana/Tipo de PCR	Abreviatura para identificar los cebadores	Secuencias de Cebadores	Referencia
18 S rRNA PCR anidada	Primera ronda 340a	5'CCAGATTAGCTTTTGCTGATCGCGGG3'	Lu JJ. J Clin Microbiol. 1995;33(10): 2785-8
	708	5'ACTTTCAGTAATAGGCTTATCG3'	
	Segunda ronda JK1	5'TGTTGGCATGAAGCCAATGGAA3'	Lu JJ. J Clin Microbiol. 1995;33(10): 2785-8
	JK2	5'CAATAACCCATCACCAGTCCGAAG3'	
26 S rRNA nuclear PCR simple	Cebador 1	5'GAAGAAATTCAACCAAGC3'	Nahimana A J Med Microbiol. 2000;49(8):7 53-8
	Cebador 2	5'ATTTGGCTACCTTAAGAG3'	
SOD (superóxido dismutasa) PCR simple	MnSODFw	5'GGGTTTAATTAGTCTTTTATAGGCAC3'	Esteves F. Infect Genet Evol. 2010; 10(2):192-9
	MnSODRw	5'AAGAGGTCTAAAAGCAGAACCTCAA3'	
TS PCR simple	TSFw	5'GTTTCAATGGCGACCTTCG3'	Esteves F. Infect Genet Evol. 2010; 10(2):192-9
	TSRw	5'GGAACACCTAGCCCCATGTC3'	
Trr1 (tioredoxin reductasa) PCR simple	Trr1Fw	5'ATGGCAACTGGGGCGTAT3'	Esteves F. Infect Genet Evol. 2010; 10(2):192-9
	Trr1Fr	5'CAAGTCCTGCCATACATCCACT3'	

El primer gen que se identificó y se evaluó para uso diagnóstico fue el que codifica para la secuencia del mt LSU rRNA. Además de su empleo en el diagnóstico se ha utilizado para analizar los casos de episodios recurrentes de infección por el microorganismo y para documentar la transmisión vertical y de persona-persona.³⁹ Por otra parte, el uso del gen mt LSU rRNA ha servido para la evaluación de la latencia y la reactivación frente a la transmisión reciente y en la investigación de individuos colonizados.⁴³ De la misma manera, gracias al empleo de esta metodología, se ha demostrado la presencia de *Pneumocystis* en muestras clínicas tales como: lavados broncoalveolares, esputos inducidos, enjuagues orales, aspirados traqueales y nasofaríngeos y biopsias de tejido. También con su ayuda se ha identificado presencia del microorganismo en exteriores rurales como huertos y aguas estancadas, así como en el polvo de las casas, habitaciones y vestíbulos de hospitales.⁴⁰ El gen mt LSU es considerado una diana

atractiva para estudios de epidemiología molecular en diferentes regiones geográficas del mundo.
1,42,60,80

Otro de los genes mitocondriales estudiado es el que codifica para la secuencia del mt SSU rRNA, el cual se ha utilizado en la clasificación de las diferentes especies de *Pneumocystis* que afectan al resto de los hospederos mamíferos y en el análisis multilocus de poblaciones con VIH/sida.⁸¹ El gen de la citocromo b mitocondrial, es otra diana empleada en estudios moleculares. La proteína codificada por este gen es clave en el sistema de transporte electrónico y sitio de acción de la atovacuona, fármaco de segunda línea en la profilaxis y tratamiento de la PcP. Las mutaciones encontradas en esta diana se han asociado con la exposición previa del medicamento en los pacientes con sida, lo que sugiere una posible emergencia de resistencia a la atovacuona.⁸²

Respecto a los genes nucleares, el espaciador interno de transcripción del ARN ribosómico (ITS1 e ITS2, siglas en inglés) es el que presenta el mayor polimorfismo genético descrito en el patógeno. Hasta el momento, se han descrito 27 genotipos del ITS1 y 35 del ITS2, sin embargo solo 65 diferentes genotipos de sus múltiples combinaciones se reportan en la literatura científica. Estos son de utilidad diagnóstica y de aplicabilidad en estudios de epidemiología molecular, incluyendo análisis de agrupamiento, transmisión persona-persona, las recaídas a los tratamientos, los estudios filogenéticos y la severidad de la infección. No obstante, su presencia en una copia en el genoma del patógeno y las frecuentes mezclas de genotipos en las muestras con PcP dificultan su interpretación en muchas ocasiones.⁴²

Entre los genes que codifican dianas específicas de fármacos, dos han sido los estudiados con mayor profundidad en los últimos años, fundamentalmente debido a su implicación en la resistencia a los fármacos anti-*Pneumocystis*. El gen de la DHFR y el gen de la DHPS codifican para enzimas claves en el metabolismo del ácido fólico. El CTX es el tratamiento de elección y profilaxis para los pacientes con PcP. Estudios previos parecen indicar que el TMP actúa sobre la DHFR, mientras que el SMX lo hace sobre la DHPS. El uso prolongado del CTX, tanto para profilaxis como para el tratamiento, ha ejercido una fuerte presión de selección sobre la DHPS,

que ha provocado mutaciones puntuales no sinónimas en este gen, las cuales inducen resistencia a este fármaco.^{1,60,80}

Dentro de los genes estudiados para la caracterización genética de *Pneumocystis* la MSG ha jugado un papel importante. Esta macromolécula es codificada por una familia de genes multicopia con expresión diferencial. Estudios preliminares de análisis multilocus que emplean la MSG han logrado discernir entre el cuadro clínico de la PcP y el estado de colonización de un individuo.⁸³

El polimorfismo de los genes más utilizados para caracterizar *P. jirovecii* en diferentes muestras clínicas se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Genes utilizados en la tipificación molecular de *P jirovecii*.

Gen	Talla molecular	Número de diferentes tipos de secuencias	Posición nucleotídica polimórfica	Genotipos
mt LSU rRNA	356 pb	7	81 85 248	C/T C/A/T C/T
mt SSU rRNA	300 pb	4	160 196	C/A T/G
5 S rRNA	120 pb	6	23 63 79 82 88	T/G A/T T/C A/G T/C
Arom	237 pb	4	121 208	T/C A/G/C
ITS1	161 pb	21	6,12,15,21,23,24,28, 34,42,53,54,80,81, 116,118	Varias bases
ITS2	192 pb	29	52,57,61,65,68,74, 76,122,160,166,171, 173,177,183	Varias bases
DHPS	838 pb	4	55 57	A/G C/T
Citocromo b	1 038 pb	7	279 362 369 516 1032	C/T C/T G/T C/T T/A
ITS1 26S mt26S β-tubulina	204 pb 426 pb 340 pb 309 pb	35	No aplicable*	3 patrones 6 patrones 4 patrones 3 patrones
MSG	123	5	6 agrupamientos de 10 nucleótidos repetidos	5 patrones: con número de repeticiones de 2-6

*Depende de la migración del fragmento en geles de poliacrilamida.

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

II.13. Métodos de tipificación molecular

Una gran variedad de técnicas se han empleado en el estudio de la diversidad genética intra e inter especie de *Pneumocystis*. Uno de los primeros métodos de tipificación fue el análisis del cariotipo, el cual permite distinguir las diferentes especies del microorganismo mediante la

observación de las bandas cromosómicas en un gel de agarosa separadas por PFGE. La electroforesis enzimática multilocus es otro de los métodos empleados, cuyo principio se basa en la detección de alelos específicos mediante geles de poliacrilamida.⁴¹

La secuenciación directa de los fragmentos de ADN, obtenidos tras la amplificación de una secuencia específica por la PCR, es la técnica más sensible para la detección y caracterización de *Pneumocystis*. Se considera la metodología de referencia en los estudios de epidemiología molecular, de acuerdo al número de diferentes genotipos presente en un gen determinado.^{1,42,60,80}

El análisis del polimorfismo conformacional de simple cadena (SSCP, siglas en inglés) es otra de las variantes de tipificación utilizada en muestras con *P. jirovecii*. Su fundamento versa sobre el concepto de que los cambios específicos en la secuencia de los nucleótidos pueden afectar la migración de los fragmentos de ADN cuando se analizan en electroforesis en geles de poliacrilamida.⁷¹

Otra de las variantes de métodos de tipificación que se puede utilizar para el estudio de la neumocistosis es la RFLP. Esta técnica consiste en digerir un fragmento de ADN, obtenido tras la técnica de la PCR, mediante una enzima de restricción que es específica de una secuencia de nucleótidos que puede estar presente o ausente en dicho fragmento.^{1,42,80}

El más novedoso de los métodos de tipificación molecular es la PCR en tiempo real, que difiere de la PCR convencional, en que permite cuantificar y conocer la dinámica del proceso de amplificación del ADN en el mismo momento en que se está produciendo, además de evitar las contaminaciones debido a menor manipulación de la muestra y que puede desarrollarse en menor tiempo que la PCR convencional. Su empleo en los laboratorios se limita por el alto costo de la tecnología que requiere.⁸⁴

Materiales y Métodos

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación cuenta con dos momentos metodológicos bien definidos. En una primera instancia se realizó un estudio de series de casos para realizar la caracterización genética de *P. jirovecii* en muestras de pulmón conservadas en parafina de pacientes cubanos fallecidos por sida. En un segundo análisis, se desarrolló un estudio de casos y controles con la finalidad de identificar asociación entre algunas variables socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico de los pacientes cubanos fallecidos por sida con la infección por *P. jirovecii*.

III.1. Universo y muestra.

El universo de estudio incluye todas las necropsias realizadas (514) a pacientes sida en el Departamento de Anatomía Patológica del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”, durante el periodo de enero de 1995 hasta mayo de 2008. De cada fallecido se tomaron cortes histológicos correspondientes a un fragmento de pulmón previamente fijado en formol y embebido en parafina. El diagnóstico histopatológico de la infección por *P. jirovecii* se realizó por microscopía óptica con la coloración de hematoxilina y eosina (HE) y plata metenamina de Gomori (GMS). Esta última técnica se considera como referencia para identificar *P. jirovecii* mediante la visualización microscópica de cualquier estadio de vida del patógeno en la muestra analizada. Finalmente, con el análisis de los resultados de la técnica de referencia se seleccionaron como muestra, 41 tejido pulmonar procedente de 41 fallecidos por sida que presentaban neumonía por dicho patógeno. Se realizó la caracterización genética a cada uno de los microorganismos contenidos en los fragmentos de pulmón embebido en parafina seleccionado.

III.1.1. Selección de los casos y los controles para el estudio.

Criterios de inclusión para la selección de los casos: Pacientes cubanos fallecidos con sida en el periodo de 1995-2008 que hayan resultado positivos a infección por *P. jirovecii* según observación microscópica de los cortes histológicos de fragmentos de pulmón embebido en parafina coloreados con HE y GMS, cuyos bloques en parafina se encuentren archivados en el

Departamento de Anatomía Patológica del IPK. Del universo de las 514 necropsias realizadas en periodo, 41 fallecidos cumplían con estos criterios para ser considerados casos en la actual investigación.

Criterios de inclusión para la selección de los controles: Pacientes cubanos fallecidos por sida en el periodo de 1995-2008, que hayan resultado negativos a infección por *P. jirovecii* según observación microscópica de los cortes histológicos de fragmentos de pulmón embebido en parafina coloreados con HE y GMS, cuyos bloques se encuentren archivados en el Departamento de Anatomía Patológica del IPK. Se tomaron dos controles por cada caso, pareado según género y año de fallecimiento, excepto en el año 1998, en este año una mujer fallecida quedó sin parrear, debido a que solo cinco mujeres fallecieron ese año (3 de las cuales por PcP). Finalmente, se contó con 81 controles para este estudio.

III.2. Extracción de ADN.

Se realizó la extracción de ADN de los cortes de tejido pulmonar de los casos incluidos en el estudio (41), obtenidos mediante micrótopo vertical (Leica RM 2035, Alemania). En todas las muestras analizadas se tomaron tres cortes de 10 μm de tejido embebido en parafina como material de partida. A estos cortes se les realizaron tres lavados con xilol (1 mL para cada lavado) para eliminar la parafina y tres lavados con etanol absoluto (1 mL para cada lavado) para hidratar el tejido. Entre cada lavado se realizaron centrifugaciones intermedias a 14 000 revoluciones por minuto (r.p.m) durante 15 min a temperatura ambiente (TA). El precipitado obtenido se incubó a 37 °C en baño termostataado (Tersor, España) durante 15 min para eliminar los restos de etanol absoluto presente en cada muestra.

Posteriormente, se empleó el paquete comercial de Qiagen NucleoSpin[®] Tissue (Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. Al precipitado se le añadió 180 μL de tampón de reacción lisis (T1) y 25 μL de proteinasa K (14 mg/mL) y se incubó el homogenizado toda la noche a 56 °C. A la muestra se le añadió 200 μL de solución amortiguadora de lisis (B3, siglas en inglés) y se incubó a 70 °C (Tersor, España) durante 10 min. Luego, se le añadieron 210 μL de etanol absoluto a la muestra y se agitó inmediatamente el contenido, el cual se

transfirió a una columna de extracción con su correspondiente colector (tubo Eppendorf® 2 mL). Se centrifugó la mezcla resultante a 10 000 r.p.m por 1 min y se desechó el líquido obtenido en el colector. Posteriormente, se adicionó 500 µL de solución amortiguadora de lavado (BW, siglas en inglés) y se repitió nuevamente el paso anterior. La columna se colocó en un colector nuevo y se le añadió 500 µL de solución amortiguadora de lavado tipo 5 (BW5, siglas en inglés); el contenido se centrifugó a 10 000 r.p.m por 1 min. Nuevamente se centrifugó a 14 000 r.p.m por 1 min y se desechó el contenido obtenido de la columna de extracción. A esta se le añadió 75 µL de agua destilada estéril y se dejó reposar durante 2 min. Finalmente, se obtuvo el ADN por centrifugación de la columna a 14 000 r.p.m por 1 min. El ADN se conservó a -20 °C hasta el momento de su utilización.

III.3. Iniciadores.

Los iniciadores empleados en la PCR y secuenciación nucleotídica de los diferentes genes utilizados en este estudio fueron sintetizados por Invitrogen (Life Technologies S.A., Madrid, España) y se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Secuencia de los iniciadores empleados en la caracterización y secuenciación de las muestras embebidas en parafina de fallecidos con *P. jirovecii* en el estudio.

Gen	Talla molecular (pb)	Secuencia 5'-3'
mt LSU rRNA	260	GTGAAATACAAATCGGACTAGG TCACTTAATATTAATTGGGGAGC
	136	GTGTACGTTGCAAAGTACTC GATGGCTGTTTCCAAGCCCA
mt SSU rRNA	308	GAAGCATGTTGTTTAATTCG TCAAAGAA(T,C)CGAGTT(T,C)CAG
DHPS	370	GCGCCTACACATATTATGGCCATTTTAAATC GGAAC TTTCAACTTGGCAACCAC
	186	AAATGCAGGGGCGACGATAAT GCCTTAATTGCTTGTCTGCA

III.4. Caracterización genotípica de muestras de *P. jirovecii* procedentes de pacientes cubanos fallecidos por sida, mediante el empleo de los genes mt LSU rRNA y mt SSU rRNA.

III.4.1. Reacción en cadena de la polimerasa para el mt LSU rRNA.

Se utilizó como secuencia diana un fragmento de 260 pb del gen que codifica para la subunidad mayor del ARN ribosómico mitocondrial de *P. jirovecii* según lo descrito por Wakefield en 1998.³⁹ La mezcla de reacción (50 µL) contuvo Tris/HCl (pH 8,3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, desoxirribonucleótidos (dNTP) 200 µM, iniciadores (Tabla. 4) 0,5 µM, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) y 5 µL de ADN molde. El perfil de amplificación fue: 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 1,5 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador Biometra TGradient (Whatman Biometra, Göttingen, Alemania). Se utilizó un control negativo para cada ensayo donde la mezcla de reacción contenía agua destilada estéril en lugar de ADN molde. Se empleó un control positivo (ADN de un paciente con neumocistosis comprobado por métodos de tinción y PCR) en cada reacción de amplificación. La detección del producto amplificado se describe en detalles en el acápite **III.4.3.**

III.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa para el mt SSU rRNA.

Se utilizó como secuencia diana un fragmento de 308 pb del gen que codifica para la subunidad menor del ARN ribosómico mitocondrial de *P. jirovecii* según lo descrito por Hunter y Wakefield en 1996.⁸⁵ La mezcla de reacción (50 µL) contuvo Tris/HCl (pH 8,3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 400 µM, iniciadores (Tabla. 4) 0,4 µM, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) y 5 µL de ADN molde. El perfil de amplificación fue: 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 63 °C y 1,5 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra TGradient (Whatman Biometra, Göttingen, Alemania). Se utilizó un control negativo para cada ensayo donde la mezcla de reacción contenía agua destilada estéril en lugar de ADN molde. Se empleó un control positivo (ADN de un paciente con neumocistosis comprobado por

métodos de tinción y PCR) en cada reacción de amplificación. La detección del producto amplificado se describe en detalles en el acápite **III.4.3.**

III.4.3. Detección de los productos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa.

Una vez concluidas las PCR antes descritas, se tomaron 8 μ L de cada uno de los productos de la reacción de amplificación y se mezclaron con 2 μ L de tampón estabilizador de muestra 6X (EDTA 500 mM, Glicerol 10 %, azul de bromofenol 0,01 %). Estos productos fueron detectados en geles de agarosa al 1,5 % en TBE 1X (Tris 0,089 M, ácido bórico 0,089 M, EDTA 0,002 M) mediante tinción con bromuro de etidio (10 mg/mL). La corrida se realizó a 90 V durante 1 h en cámara electroforética (Mupid® One, BDC, Bélgica), con el empleo del marcador de peso molecular PCR 100 bp (Low Ladder, Sigma, EE.UU.), cuyas bandas se encuentra entre 100 y 1 000 pares de bases (pb). La visualización de las bandas se realizó por exposición del gel a la luz ultravioleta en un equipo transiluminador (Macrovue 2011, LKB, Suecia). El tamaño del fragmento amplificado para el gen mt LSU rRNA fue 260 pb y 308 pb para el mt SSU rRNA. El producto amplificado restante se conservó a -20 °C hasta el momento de su empleo para realizar la reacción de secuenciación.

III.4.4. Purificación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa.

El ADN amplificado por cada una de las PCR empleadas se purificó mediante cromatografía de exclusión molecular.⁸¹ Para la purificación se empleó una columna (Qiagen, Hilden, Alemania) para cada muestra analizada, a la cual se le añadió 650 μ L de agua destilada estéril y se centrifugó dos veces a 3 000 r.p.m por 1 min secando el extremo de la columna con papel de filtro. Posteriormente, a la columna se le adicionó el Sephacryl-400 (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Reino Unido) y se centrifugó a 3 000 r.p.m por 2 min. Se eliminó el líquido obtenido y se repitió el paso anterior nuevamente. Luego, se agregó 30 μ L del producto amplificado de cada reacción anteriormente obtenido (mt LSU rRNA y mt SSU rRNA) lentamente por el centro de la columna, se centrifugó a 3 000 r.p.m durante 2 min y se obtuvo el producto purificado de cada PCR. Este se chequeó de la misma manera que lo descrito previamente en el acápite **III.4.3.**

III.4.5. Secuenciación de los productos purificados de la reacción en cadena de la polimerasa.

La secuenciación nucleotídica, se realizó con el paquete comercial ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.). Para cada reacción de secuenciación se preparó un tubo Eppendorf® con la mezcla de reacción (3,5 µL del producto de la PCR purificado, 2 µL de cada iniciador (2,5 µM), 3,5 µL del tampón de la reacción, 1µL de la Termo Secuenasa I ADN Polimerasa (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) (10 U/µL) y agua bidestilada estéril libre de RNAsa para un volumen final de 30 µL). La misma fue mezclada por vórtex y colocada en el termociclador descrito anteriormente. Se efectuaron 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95 °C por 0,5 min, hibridación 60 °C por 0,5 min y extensión a 72 °C por 1,5 min). Para la secuenciación se utilizaron los mismos iniciadores descritos en la Tabla. 4.

III.4.6. Métodos empleados para analizar y comparar secuencias.

Se obtuvo la secuencia consenso de cada caso analizado (de ambas cadenas) utilizando el programa Clustal X con ajuste manual. Los datos correspondiente a cada secuencia se alinearon entre ellos y con una secuencia tipo de *P. jirovecii* (previamente descrita en el banco de genes) usando el programa MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Análisis) versión 4.1 disponible en (<http://www.megasoftware>). El mismo permitió determinar el polimorfismo en las posiciones 85 y 248 para el gen mt LSU rRNA y en las posiciones 160 y 196 para el gen mt SSU rRNA, respectivamente.

III.5. Identificación de la existencia de muestras de *P. jirovecii* con resistencia a las sulfamidas mediante el estudio del gen de la DHPS.

III.5.1. Reacción en cadena de la polimerasa para la DHPS.

Se utilizó como secuencia diana un fragmento de 370 pb del gen que codifica para la dihidropteroato sintetasa de *P. jirovecii* según lo descrito por Beard y colaboradores en el 2000.⁶⁰

La mezcla de reacción (50 μ L) contuvo Tris/HCl (pH 8,3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 400 μ M, iniciadores (Tabla. 4) 0,4 μ M, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) y 5 μ L de ADN molde. El perfil de amplificación fue: 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 57 °C y 1,5 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. Se utilizó un control negativo para cada ensayo donde la mezcla de reacción contenía agua destilada estéril en lugar de ADN molde. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra TGradient (Whatman Biometra, Göttingen, Alemania). Se utilizó un control negativo para cada ensayo donde la mezcla de reacción contenía agua destilada estéril en lugar de ADN molde. Se empleó un control positivo (ADN de un paciente con neumocistosis comprobado por métodos de tinción y PCR) en cada reacción de amplificación. El producto amplificado restante se conservó a - 20 °C hasta el momento de su empleo para realizar la restricción enzimática.

III.5.2. Detección de los productos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa.

La detección de los productos amplificados por la PCR para el gen de la DHPS se realizó como se describió en el experimento **III.4.3**. El tamaño del fragmento amplificado para el gen de la DHPS fue 370 pb.

III.5.3. Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del gen de la DHPS.

Se utilizaron 10 μ L de cada uno de los productos de la reacción de la amplificación (370 pb) con los iniciadores anteriormente descritos (Tabla. 4). Los cuales fueron escindidos con 1 μ L de *Acc1* (10 U/ μ L) y 1 μ L de *Hae* III (10 U/ μ L) (Roche Diagnostics, Alemania) con 2,5 μ L de tampón de reacción para cada enzima utilizada. Además, se añadieron 6,5 μ L de agua destilada estéril para completar la mezcla de reacción en un volumen final de 20 μ L.

Ambas restricciones fueron digeridas a las temperaturas óptimas de sus correspondientes enzimas: 37 °C para *Hae* III y 60 °C para *Acc1* según lo descrito por Costa y colaboradores en el 2006.⁸⁶ Los productos de restricción fueron detectados como se describió en el acápite **III.4.3**.

El polimorfismo de longitud en el gen de la DHPS se detecta en las posiciones nucleotídicas 55 y 57 según lo descrito por Costa y colaboradores en el 2006.⁸⁶ Se considera genotipo salvaje (wild type, término en inglés) y se interpreta como un microorganismo (*P. jirovecii*) con ausencia de resistencia a las sulfamidas, aquel fragmento de 370 pb que posee secuencias nucleotídicas que pueden ser reconocidas (55A/57C) y escindidas por las dos enzimas utilizadas en el experimento. Estas respectivas restricciones generan dos fragmentos de 229 y 141 pb con la enzima *AccI* y dos fragmentos de 221 y 131 pb con *Hae* III, los cuales pueden ser visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. Por otra parte, se considera genotipo mutado y que se interpreta como un microorganismo (*P. jirovecii*) con posible resistencia a las sulfamidas, aquel fragmento de 370 pb que no posee secuencias nucleotídicas que pueden ser reconocidas y escindidas por las dos enzimas utilizadas en el experimento. La actividad de ambas enzimas es inhibida por las mutaciones que ocurren en las posiciones 55 y 57 debido a cambios nucleotídicos. Según los resultados que se obtengan pueden existir simples mutantes (solo en la posición 55 ó solo en la posición 57) ó dobles mutantes (cambios en ambas posiciones). Para el genotipo mutado debe esperarse un fragmento de 370 pb en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.⁸⁶

En cada reacción de restricción se utilizó un control positivo de una muestra con genotipo salvaje y otra muestra con genotipo mutado previamente analizado en el laboratorio.

III.6. Evaluación de la factibilidad de dos nuevos sistemas de reacción en cadena de la polimerasa para la caracterización de *P. jirovecii* en muestras embebidas en parafina.

III.6.1 Reacción en cadena de la polimerasa para el fragmento de 136 pb del gen mt LSU rRNA.

Se utilizó como secuencia diana un fragmento de 136 pb del gen que codifica para el gen mt LSU rRNA de *P. jirovecii* según lo descrito por De la Horra y colaboradores en el 2004.⁸⁷ La mezcla de reacción (50 µL) contuvo Tris/HCl (pH 8,3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 400 µM, iniciadores (Tabla. 4) 0,2 µM, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) y 5 µL de ADN molde. El perfil de amplificación fue: 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 61 °C y 1,5 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a

72 °C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra TGradient (Whatman Biometra, Göttingen, Alemania). Se utilizó un control negativo para cada ensayo donde la mezcla de reacción contenía agua destilada estéril en lugar de ADN molde. Se empleó un control positivo (ADN de un paciente con neumocistosis comprobado por métodos de tinción y PCR) en cada reacción de amplificación. El producto amplificado restante se conservó a -20 °C hasta el momento de su empleo para realizar la reacción de secuenciación.

III.6.2. Detección de los productos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa.

La detección de los productos amplificados por la PCR para el fragmento de 136 pb del gen mt LSU rRNA se realizó como se describió en el experimento **III.4.3**.

III.6.3. Purificación de los productos de la reacción en cadena de la polimerasa.

La purificación de los productos amplificados por la PCR para el fragmento de 136 pb del gen mt LSU rRNA se realizó como se describió en el experimento **III.4.4**.

III.6.4. Secuenciación de los productos purificados de la reacción en cadena de la polimerasa.

La secuenciación de los productos purificados de la PCR para el fragmento de 136 pb del gen mt LSU rRNA se realizó como se describió en el experimento **III.4.5**. En este caso, solo se determinó el polimorfismo en la posición 85 del gen mt LSU rRNA, debido a la pequeña talla del fragmento que amplifica el iniciador empleado en el estudio (136 pb).

III.6.5. Métodos empleados para analizar y comparar secuencias.

Los métodos empleados para analizar y comparar las secuencias del fragmento de 136 pb del gen mt LSU rRNA se realizó como se describió en el experimento **III.4.6**.

III.6.6. Reacción en cadena de la polimerasa para el fragmento de 186 pb del gen de la DHPS.

Se utilizó como secuencia diana un fragmento de 186 pb del gen que codifica para la dihidropteroato sintetasa de *P. jirovecii* según lo descrito por Costa y colaboradores en el 2006.⁸⁶ La mezcla de reacción (50 µL) contuvo Tris/HCl (pH 8,3) 10 mM, KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dNTP 400 µM, iniciadores (Tabla. 4) 0,5 µM, 2 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Bioline, Londres, Reino Unido) y 5 µL de ADN molde. El perfil de amplificación fue: 94 °C por 4 min, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 59 °C y 1,5 min a 72 °C, con una extensión final de 7 min a 72 °C. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Biometra TGradient (Whatman Biometra, Göttingen, Alemania). Se utilizó un control negativo para cada ensayo donde la mezcla de reacción contenía agua destilada estéril en lugar de ADN molde. Se empleó un control positivo (ADN de un paciente con neumocistosis comprobado por métodos de tinción y PCR) en cada reacción de amplificación. El producto amplificado restante se conservó a -20 °C hasta el momento de su empleo para realizar la restricción enzimática.

III.6.7. Detección de los productos amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa.

La detección de los productos amplificados por la PCR para el fragmento de 186 pb del gen de la DHPS se realizó como se describió en el experimento **III.4.3**.

III.6.8 Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del fragmento de 186 pb del gen de la DHPS.

El polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del fragmento de 186 pb del gen de la DHPS se realizó como se describió en el experimento **III.5.3**. En este caso, los productos de restricción esperados fueron: dos fragmentos de 148 y 38 pb con la enzima *AccI* y dos fragmentos de 140 y 46 pb con *Hae* III. Estos productos de restricción fueron detectados como se describió en el acápite **III.4.3**.

El análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción del fragmento de 186 pb del gen de la DHPS se realizó como se describió en el experimento **III.5.4**. Las interpretaciones de genotipo salvaje y genotipo mutado son muy similares a las realizadas en el acápite **III.5.4**, solo varía el fragmento amplificado (186 pb) y los fragmentos obtenidos tras las digestiones con las enzimas utilizadas. En este caso: dos fragmentos de 148 y 38 pb con la enzima *Acc1* y dos fragmentos de 140 y 46 pb con *Hae III*.

III.7. Descripción de algunas variables socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico de los pacientes cubanos fallecidos por sida con neumonía por *P. jirovecii* y sus posibles asociaciones con esta infección.

III.7.1. Revisión de las historias clínicas de los fallecidos por sida con *P. jirovecii*.

Se revisó cada una de las historias clínicas (HC) de los fallecidos involucrados en la investigación (41 casos y 81 controles). De las mismas se extrajeron variables de interés socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico del paciente. Entre las variables socio-demográficas se analizaron: edad (años), género (masculino y femenino), color de la piel (blanco, mestizo, negro), ocupación de los fallecidos (técnico, profesional, obrero, estudiante, ama de casa, recluso, jubilado) y lugar de residencia actual (provincia de residencia recogida en cada HC al momento del ingreso, referida antes de la división política administrativa del año 2011). En cuanto a las variables de manejo clínico del paciente se recogieron: fecha de diagnóstico de VIH (año), fecha de fallecimiento por sida con PcP (año), tratamiento antirretroviral (presencia o ausencia), exposición a las sulfamidas en los tres meses previos al fallecimiento (presencia o ausencia), tratamiento con sulfamidas al ingreso (presencia o ausencia), enfermedad definitoria de sida en cada caso (enfermedad reportada como tal en la HC), debut clínico (tiempo menor de un año entre el diagnóstico de VIH y presentar una infección oportunista que define sida), leucoplasia pilosa (presencia o ausencia), enfermedad con la cual tuvo el debut clínico y enfermedades o agentes concomitantes con la PcP. Las enfermedades concomitantes fueron diagnosticadas desde el punto de vista histopatológico y microbiológico. Solo una variable de laboratorio clínico se extrajo de cada HC, el número de linfocitos T CD₄⁺ (células/mm³). Este dato se obtuvo del último examen realizado al paciente antes del mes de fallecer, los casos cuyos

resultados no cumplieran con este requisito se le colocó la denominación de ND: no disponible para esa variable.

III.8. Análisis estadístico.

Se realizó un estudio de casos y controles según lo descrito en el acápite **III.1.1**. Para el almacenamiento de la información se confeccionó una base de datos en Microsoft Excel. Para el análisis de la misma se utilizó el sistema SPSS para Windows (versión 18.0, Chicago, IL, EE.UU.). Fueron calculadas frecuencias absolutas y relativas como medida de resumen para variables cualitativas y se usaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y D'Agostino-Pearson para evaluar si los datos cumplían la distribución normal.

En el caso de variables cualitativas se utilizó la prueba de Chi-cuadrado para investigar la asociación entre las mismas y la prueba de Fisher si el número de casos era escaso (<5). Mientras que para comparar las variables cuantitativas (edad y número de linfocitos T CD₄⁺) se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney.

En la investigación se calculó además el OR o razón de disparidad (*Odds Ratio*, por las siglas en inglés) como medida de asociación entre las variables analizadas y se estimaron los intervalos de confianza al 95 %. Además se realizó una regresión logística multivariada con los OR que resultaron estadísticamente significativos en el análisis univariado. Se incluyeron en la misma aquellos valores de OR que tuvieran una probabilidad (*p*) menor que 0,15.

Finalmente, se determinó la asociación de los genotipos obtenidos para los genes mt LSU, mt SSU rRNA y su combinación con las variables edad, género, tratamiento antirretroviral, tratamiento con sulfamidas al ingreso, debut clínico, periodo de fallecimiento (mayo-octubre y noviembre-abril) y el número de linfocitos T CD₄⁺.

En todos los análisis se consideraron como significativos los valores *p* con un nivel de significación menor que 0,05.

III.9. Aspectos éticos.

Los familiares de los fallecidos brindaron su consentimiento informado por escrito para que se les realizara la necropsia a los mismos y para que los tejidos de estos fueran utilizados con fines investigativos. La identidad de los pacientes nunca será revelada y la información solo será del conocimiento y manejada por los profesionales involucrados en la presente investigación. Los familiares fueron informados posteriormente de los resultados del estudio. Se anexa el modelo de consentimiento informado empleado para este trabajo. (Anexo 4).

Resultados

IV. RESULTADOS

IV.1. Caracterización genotípica de muestras de *P. jirovecii* procedentes de pacientes cubanos fallecidos por sida, mediante el empleo de los genes mt LSU rRNA y mt SSU rRNA.

El fragmento de 260 pb del gen mt LSU rRNA de *P. jirovecii* se logró amplificar en 26 muestras (63,4 %) procedente de los 41 bloques de parafina analizados (Figura 2). Con respecto a la distribución de genotipos del mt LSU en las muestras amplificadas de la serie analizada hubo un predominio mayoritario del genotipo 3 (23 muestras) en los 14 años de duración del estudio (Figura 3). Por otra parte, dos muestras secuenciadas correspondieron al genotipo 1 (Figura 3). Además, en el estudio se encontró la presencia del genotipo 2 solo en una muestra (4 %), la cual correspondía a una infección mixta de los genotipos 2 y 3 (Figura 3).

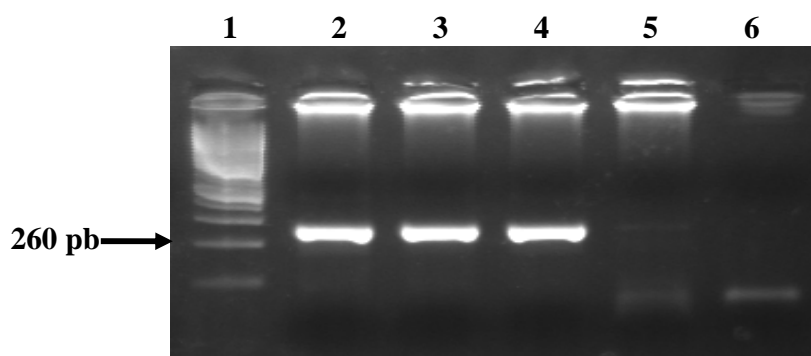


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento de 260 pb del gen mt LSU rRNA en los pulmones embebidos en parafina de los fallecidos por sida con PcP, IPK, 1995-2008. Línea 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.), línea 2 control positivo de la reacción, líneas 3-5 muestras positivas, línea 6 control negativo de la reacción.

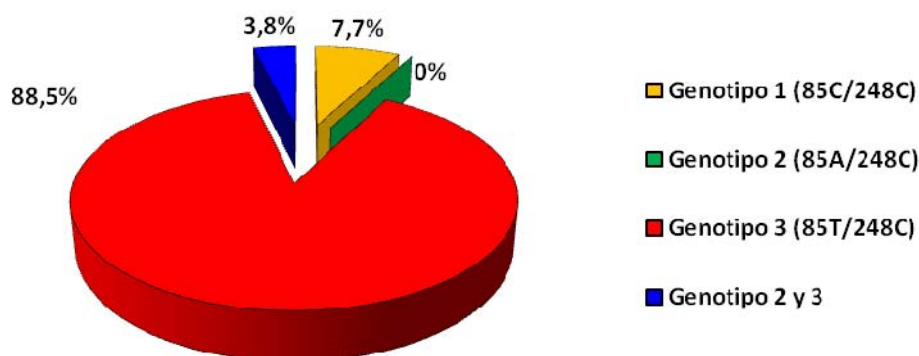


Figura 3: Distribución de genotipos del gen mt LSU rRNA en muestras de fallecidos por sida con PcP, IPK, 1995-2008.

El fragmento de 308 pb del gen mt SSU rRNA se amplificó en 16 (39,0 %) de los 41 bloques de parafina analizados (Figura 4). De las 26 muestras positivas para el gen mt LSU rRNA, 16 (61,5 %) fueron amplificadas y secuenciadas para el gen mt SSU rRNA. El 93,8 % de estas muestras correspondieron al genotipo 3 (160A/196T) (Figura 5), genotipo no descrito hasta el momento en la literatura mundial y cuya secuencia fue reportada al Banco de genes (GenBank, siglas en inglés) con número de acceso (HQ228547) (Figura 6). La muestra restante analizada correspondió al genotipo 2 (160A/196G) (Figura 5).

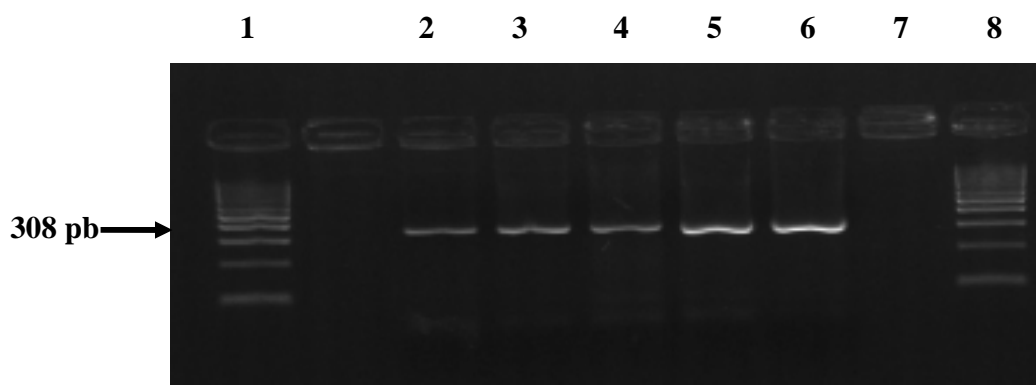


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento de 308 pb del gen mt LSU rRNA en los pulmones embebidos en parafina de los fallecidos por sida con PcP, IPK, 1995-2008. Líneas 1 y 8: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.), líneas 2-5: muestras positivas, línea 6: control positivo de la reacción, línea 7: control negativo de la reacción.

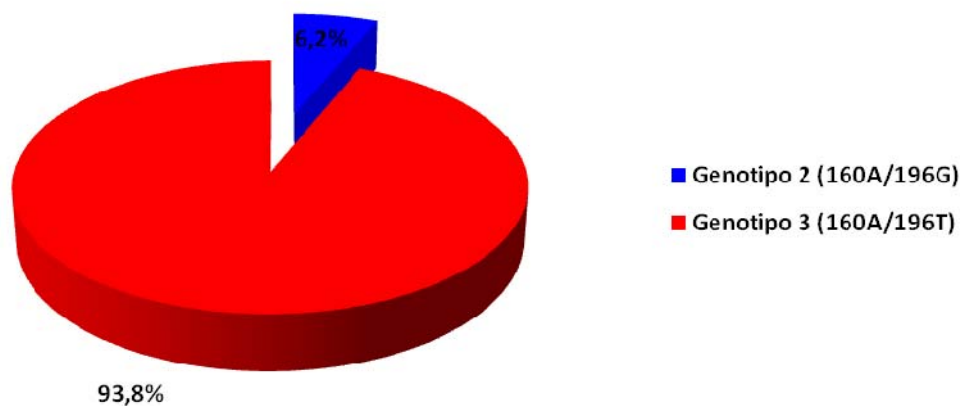


Figura 5: Distribución de genotipos del gen mt SSU rRNA en muestras de fallecidos por sida con PcP, IPK, 1995-2008.

```
1   gaagcatggtt gtttaattcg ataaccacg ataaatctta ccacttcttg catattttcc
61  tattcggaaat ttacaggtgt tgcattggctg tctttagttc gtgttgtaa atgtaggtt
121 tattccgata acgaacgtaa acctgtcct taattattta aaggaaatgt ctatcgatat
181 tatagatgaa ttaggttagaa gacaagtctt catgaccctt atgaagtggg ctacagacgt
241 gctgcaaaat ttctacaat gggatgcaat gatggaagtc ggagctaate ccctaaaaga
301 ttgttagtc cggataagt cctggaact ggctcttt
```

Figura 6: Secuencia nucleotídica del nuevo genotipo del gen mt SSU rRNA (160A/196T) reportada al Banco de Genes con número de acceso (HQ228547).

El análisis multilocus (interpretación de los resultados de los genes mt LSU y mt SSU rRNA de manera simultánea) identificó un 81,3 % (13/16) del genotipo (85T/248C//160A/196T) en la serie analizada.

IV.2. Identificación de la existencia de muestras de *P. jirovecii* con resistencia a las sulfamidas mediante el estudio del gen de la DHPS.

Con el empleo de los iniciadores para amplificar el gen que codifica para la DHPS (Tabla. 4), se obtuvo un fragmento de 370 pb en 2 muestras de los 41 bloques de parafina analizados en la investigación (Figura 7).

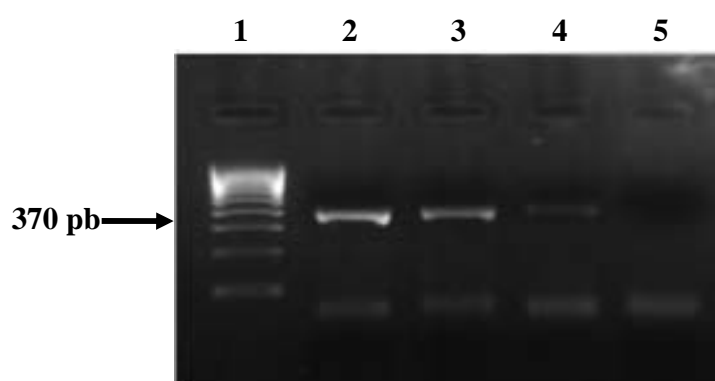


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento de 370 pb del gen DHPS en los pulmones embebidos en parafina de los fallecidos por sida con PcP, IPK, 1995-2008. Líneas 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.), línea 2: control positivo de la reacción, líneas: 3-4 muestras positivas, línea 5: control negativo de la reacción.

En los dos casos en que se consiguió la amplificación del gen de la DHPS con la obtención del fragmento de 370 pb, se demostró la ausencia de mutaciones puntuales en este gen. En las electroforesis realizadas se observaron los patrones correspondientes al genotipo salvaje al aplicar la restricción enzimática (Figura 8). Las restricciones para el genotipo salvaje generan dos fragmentos de 229 y 141 pb con la enzima *AccI* y otros dos fragmentos de 221 y 131 pb con *Hae III*, los cuales pueden ser visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Figura 8). La no presencia de mutaciones puntuales en el gen de la DHPS sugiere la ausencia de resistencia a sulfamidas en los microorganismos (*P. jirovecii*) analizados de las muestras seleccionadas.

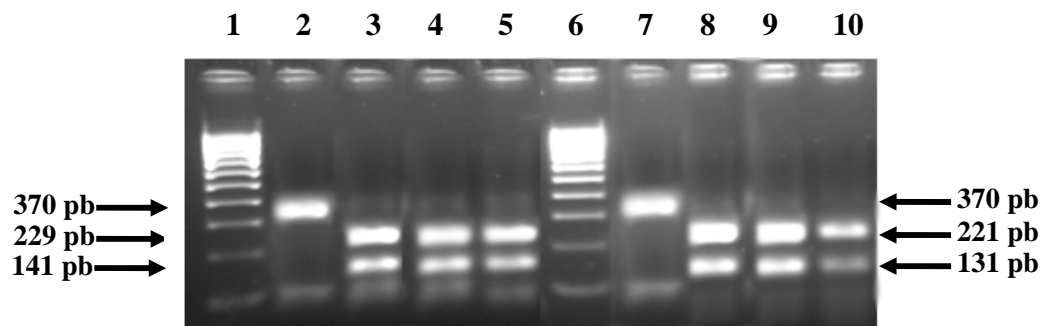


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa de los patrones de restricción del producto de 370 pb de la PCR del gen de la DHPS en los pulmones embebidos en parafina de los fallecidos por sida con PcP, IPK 1995-2008. Líneas 1 y 6: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.), línea 2: Control de genotipo mutado con la enzima *Acc 1*, línea 7: Control de genotipo mutado con *Hae III*, línea 3: Control de genotipo salvaje con la enzima *Acc 1*, línea 8: Control de genotipo salvaje con *Hae III*, líneas 4 y 5: Patrones de restricción de las muestras con la enzima *Acc 1*, líneas 9 y 10: Patrones de restricción de las muestras con la enzima *Hae III*.

IV.3. Evaluación de la factibilidad de dos nuevos sistemas de reacción en cadena de la polimerasa para la caracterización de *P. jirovecii* en muestras embebidas en parafina.

El fragmento de 186 pb del gen de la DHPS se logró amplificar en 7 muestras (17.1 %) de los 41 bloques de parafina analizados en el estudio (Figura 9).

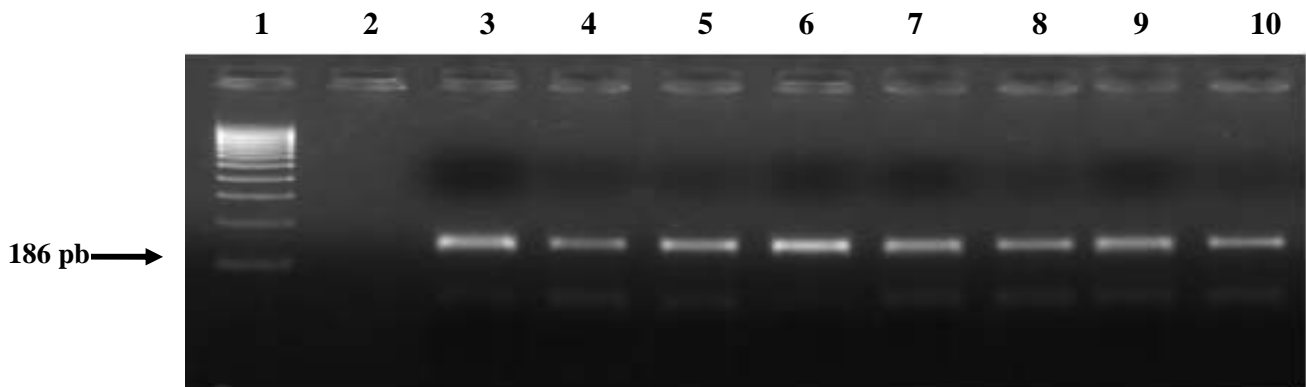


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento de 186 pb del gen DHPS en los pulmones parafinados de los fallecidos por sida con PcP, IPK 1995-2008. Líneas 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU), línea 2: control negativo de la reacción, línea 3: control positivo, líneas 4-10: 7 muestras positivas.

En las 7 muestras que se obtuvo amplificación del fragmento de 186 pb del gen de la DHPS, se demostró la ausencia de mutaciones puntuales. En las electroforesis realizadas se observaron los patrones correspondientes al genotipo salvaje al aplicar la restricción enzimática mediante el empleo de *Acc1* y *Hae III* (Figura 10). Las restricciones realizadas en la investigación generan dos fragmentos de 148 y 38 pb con la enzima *Acc1* y dos fragmentos de 140 y 46 pb con *Hae III*, los cuales pueden ser visualizados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Figura 10). La no presencia de mutaciones puntuales en el gen de la DHPS sugiere la ausencia de resistencia a sulfamidas en los microorganismos (*P. jirovecii*) analizados de las muestras seleccionadas.

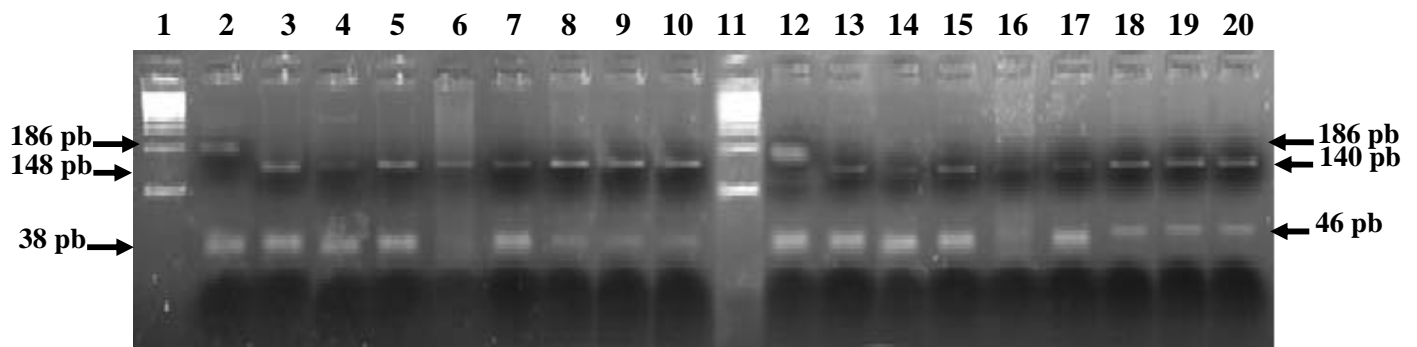


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa de los patrones de restricción del producto de 186 pb de la PCR del gen de la DHPS en los pulmones embebidos en parafina de los fallecidos por sida con PcP, IPK 1995-2008. Líneas 1 y 11: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU), línea 2: Control de genotipo mutado con la enzima *Acc* 1, línea 3: Control de genotipo salvaje con la enzima *Acc* 1, líneas 4-10: Patrones de restricción de las muestras con *Acc* 1, línea 12: Control de genotipo mutado con la enzima *Hae* III, línea 13: Control de genotipo salvaje con la enzima *Hae* III, líneas 14-20: Patrones de restricción de las muestras con *Hae* III.

Finalmente, el fragmento de 136 pb del gen mt LSU rRNA se amplificó en la totalidad de las 41 muestras embebidas en parafina analizadas en el estudio (Figura 11).

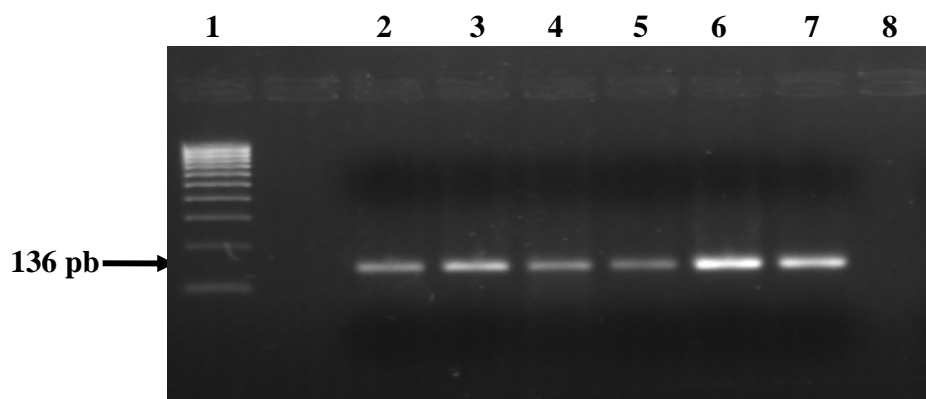


Figura 11: Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación del fragmento de 136 pb del gen mt LSU rRNA en los pulmones embebidos en parafina de los fallecidos por sida con PcP, IPK 1995-2008. Líneas 1: Marcador de peso molecular (100 pb, Promega, EE.UU.), líneas 2-6: muestras positivas, línea 7: control positivo de la reacción, línea 8 control negativo de la reacción.

La secuenciación de los productos de la PCR de este fragmento se logró en el 85,4 % de las muestras amplificadas (35/41). El análisis del polimorfismo en la posición 85 del gen mt LSU rRNA de las muestras secuenciadas demostró que 32 de ellas presentaban la T en dicha posición para un (91,4 %), 2 muestras (5,7 %) la C y en una muestra (2,9 %) se identificó la A y T de manera simultánea en dicha posición, esta última muestra correspondía a una infección mixta.

IV.4. Descripción de algunas variables socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico de los pacientes cubanos fallecidos por sida con neumonía por *P. jirovecii* y sus posibles asociaciones con esta infección.

Durante los 14 años que comprende este estudio, se realizó la necropsia en el IPK a 41 fallecidos por sida con PcP. En la Tabla 5, se muestran las variables socio-demográficas de los casos investigados, los controles obtenidos para cada caso y la razón de disparidad (OR) calculada para cada variable analizada. La media de edad de los casos fallecidos fue de $35,4 \pm 1,6$ años con un intervalo de 20 a 60 años, valor similar se obtuvo para los controles $35,6 \pm 1,0$ años,

sin embargo existió un ligero incremento en el intervalo de edades para estos últimos de 21 a 72 años. No existieron diferencias estadísticas entre las edades analizadas de los casos y los controles ($p = 0,916$). La mediana de las edades para ambos grupos fue de 34,0 años. Al estratificar la edad por grupos (Tabla 5) se obtuvo un OR de 19,2 para el grupo de 50-59 años. Este valor, aunque sin diferencias significativas ($p = 0,072$) muestra una alerta epidemiológica pues los fallecidos por sida con insuficiencia respiratoria entre los 50 y 59 años de edad tienen 19,2 veces más probabilidad de fallecer por PcP que el resto de los que mueren por otras causas. En el resto de los grupos de edades estratificados, los OR calculados brindaron resultados similares.

En la investigación, la mayoría de los fallecidos correspondieron al género masculino (80,5 %) con predominio de los individuos con el color de la piel blanca (73,2 %) tanto en los casos como en los controles. En ambas variables los OR no resultaron significativos (Tabla 5).

Las ocupaciones laborales de los casos fallecidos constatadas en el estudio fueron diversas, entre ellas existió un ligero predominio de los trabajadores por cuenta propia y obreros, con resultados similares (26,8 % y 24,4 %, respectivamente). En los controles, las ocupaciones más representadas fueron los obreros y trabajadores por cuenta propia con similares porcentajes (Tabla 5). Es válido destacar, que los fallecidos cubanos por sida con insuficiencia respiratoria que tuvieron como profesión la de técnico tienen 3 veces más probabilidad de fallecer por PcP que por otras causas aunque sin diferencias significativas ($p = 0,699$). De la misma manera, se obtuvo un OR de 2,6 para los estudiantes y jubilados, no obstante debe mencionarse que existió un reducido número de casos en la muestra con esas profesiones.

La mayoría de los casos y los controles incluidos en este estudio eran residentes en Ciudad de la Habana (68,3 % para los casos y 46,7 % para los controles). Los fallecidos cubanos por sida con insuficiencia respiratoria que vivían en La Habana tienen 5,3 veces más probabilidad de fallecer por PcP que por otras causas, aunque sin diferencias significativas ($p = 0,640$). Similares valores de OR se obtuvieron para los fallecidos de Villa Clara, Guantánamo y Sancti Spíritus con un número reducido de casos en la muestra analizada (Tabla 5).

Tabla 5. Características socio-demográficas de los casos fallecidos con sida por PcP y sus controles, en el IPK, durante el periodo 1995-2008 (No. Casos =41, No. Controles =81).

Características	No. Casos (%) n=41	No. Control (%) n=81	OR (Intervalo 95%)	Valor de p
Estratificación de edad (años)				
20-29	15(36,6)	25(30,9)	2,88 (0,91-9,16)	0,072
30-39	15(36,6)	27(33,3)	2,67 (0,84-8,44)	
40-49	5(12,2)	24(29,6)	1,00 (-)	
50-59	4(9,6)	1(1,2)	19,20 (1,75-210,33)	
≥ 60	2(4,9)	4(4,9)	2,40 (0,34-16,90)	
Género				
Masculino	33 (80,5)	66 (81,5)	0,93 (0,36-2,43)	0,895
Femenino	8 (19,5)	15 (18,5)		
Color de la piel				
Blanco	30 (73,2)	56 (69,1)	1,50 (0,49-4,57)	0,766
Mestizo	6 (14,6)	11 (13,6)	1,53 (0,37-6,35)	
Negro	5 (12,2)	14 (17,3)	1,00 (-)	
Ocupación				
Trabajador por cuenta propia	11 (26,8)	25 (30,7)	1,14 (0,41-3,16)	0,699
Obreros	10 (24,4)	26 (32,1)	1,00 (-)	
Técnicos	7 (17,1)	6 (7,4)	3,03 (0,82-11,26)	
Profesionales	6 (14,6)	12 (14,8)	1,30 (0,38-4,41)	
Ama de casa	5 (12,2)	8 (9,9)	1,63 (0,43-6,17)	
Jubilado	1 (2,4)	1 (1,2)	2,60 (0,15-45,68)	
Estudiante	1 (2,4)	1(1,2)	2,60 (0,15-45,68)	
Recluso	0 (0)	2 (2,5)	-	
Lugar de Residencia				
C. Habana	28 (68,3)	37 (46,7)	5,30 (0,62-45,57)	0,640
Pinar del Río	3 (7,3)	9 (11,1)	2,33 (0,20-27,57)	
La Habana	2 (4,9)	3 (3,7)	4,67 (0,30-73,38)	
Villa Clara	2 (4,9)	2 (2,5)	7,00 (0,40-123,35)	
Guantánamo	2 (4,9)	2 (2,5)	7,00 (0,40-123,35)	
Matanzas	1 (2,4)	7 (8,6)	1,00 (-)	
Sancti Spiritus	1 (2,4)	1 (1,2)	7,00 (0,22-226,00)	
Granma	1 (2,4)	2 (2,5)	3,50 (0,14-84,69)	
Santiago de Cuba	1 (2,4)	6 (7,4)	1,17 (0,06-22,94)	
Cienfuegos	0 (0)	2 (2,5)	-	
Ciego de Ávila	0 (0)	1 (1,2)	-	
Holguín	0 (0)	4 (4,9)	-	
Isla de la Juventud	0 (0)	3 (3,7)	-	
Las Tunas	0 (0)	2 (2,5)	-	

La tasa de mortalidad por PcP calculada para el período 1995-2008 en pacientes con VIH/sida fue de 7,98 % (41/514). El 70,7 % (29/41) de los fallecimientos en esta serie se produjeron antes que se iniciara la TARGA (Tabla 6). En el estudio, el 29,3 % (12/41) de los fallecidos recibieron algún tratamiento antirretroviral en vida, de estos el 41,7 % (5/12) correspondieron al periodo después de iniciada la TARGA en Cuba. (Tabla 6). En la investigación, se debe señalar que el valor del OR calculado para la variable tratamiento antirretroviral tuvo un valor de 1,93, aunque sin diferencias significativas ($p = 0,105$). Por otra parte, el 78,0 % de los casos recibió tratamiento con sulfamidas al ingreso y el 29,3 % tuvo previa exposición a las sulfamidas en los últimos tres meses, lo que contrasta con lo obtenido en los controles (58,0 % y 27,2 %, respectivamente). En el caso de la variable tratamiento con sulfamidas al ingreso tuvo especial interés en la investigación, ya que tuvo un OR de 0,39 con diferencias significativas.

La media del número de linfocitos T CD4⁺ en la serie de casos fue de $90,8 \pm 12,9$ células/mm³ (intervalo 10-308), mientras que una media de $117,6 \pm 158,2$ células/mm³ con intervalo de 0-952 se calculó para los controles. No existieron diferencias significativas entre las medianas (casos: 77,5 y controles: 68,0) de estos dos grupos ($p = 0,734$), ni entre los OR calculados al estratificar esta variable. Sin embargo, es válido mencionar el valor de OR de 3,0 en el intervalo de 50-100 células/mm³. El 62,6 % de los casos fallecidos estaban intensamente inmunodeprimidos con números de linfocitos T CD4⁺ por debajo de las 100 células/mm³, en los controles este valor fue de 53,1 %.

En solo el 17,1 % de los casos incluidos en esta serie la neumonía por *P. jirovecii* fue la enfermedad definitoria de sida, mientras que la neurotoxoplasmosis fue la de mayor porcentaje en los controles (Tabla 6). De interés es resaltar que los fallecidos cubanos por sida con insuficiencia respiratoria cuya enfermedad definitoria de sida es la criptococosis tienen casi 7 veces más probabilidad de fallecer por PcP que los otros fallecidos, sin diferencias significativas. En el caso de los fallecidos donde la enfermedad definitoria de sida fue la pérdida de peso, diarreas crónicas, criptosporidiosis y candidosis oro-esofágica los OR obtenidos fueron 4,0; 4,0; 4,0 y 3,2 respectivamente con interpretaciones similares a la realizada en la criptococosis, aunque sin diferencias significativas.

El 34,1 % de los fallecidos por sida con PcP en el periodo analizado fueron considerados como debut clínico, este valor se redujo hasta el 28,4 % en los controles. Nótese, que aunque no existieron diferencias significativas, los fallecidos cubanos por sida con insuficiencia respiratoria cuyo debut clínico ocurrió por *Cryptococcus* spp. tienen 13,5 veces más probabilidad de fallecer por PcP que los otros fallecidos, lo que representa una alerta epidemiológica. En el caso de los controles fue la PcP con un 39,1 % (Tabla 6).

Además, la investigación constató similares porcentajes entre los casos y controles (51,1 % vs 49,4 %) cuando se analizó la presencia de leucoplasia pilosa en la lengua de los fallecidos en el momento de la necropsia. Adicionalmente, la mayor frecuencia de muertes ocurrió en el mes de abril con un 14,6 % de casos (Figura 12). Al desglosar los datos de los casos y los controles por periodo (noviembre-abril, mayo-octubre) se obtuvieron resultados similares (65,8 % y 58,0 %). Se destaca que los fallecidos cubanos por sida con insuficiencia respiratoria cuyo fallecimiento ocurrió en el periodo de noviembre-abril tienen 1,4 veces más probabilidad de fallecer por PcP que los otros fallecidos, sin diferencias significativas.

Tabla 6. Características de manejo clínico y de laboratorio de los fallecidos con sida por PcP y sus controles, en el IPK, durante el periodo 1995-2008 (No. Casos=41, No. Controles =81).

Características	No. Casos (%) n=41	No. Controles (%) n=81	OR (Intervalo 95 %)	Valor de p
Fallecidos antes/después de TARGA				
Antes	29 (70,7)	57(70,4)	1,02 (0,45-2,32)	0,967
Después	12 (29,3)	24(29,6)		
Tratamiento antirretroviral				
Si	12 (29,3)	36 (44,4)	1,93 (0,86-4,32)	0,105
No	29 (70,7)	45 (55,6)		
Tratamiento con sulfamidas al ingreso				
Si	32 (78,0)	47 (58,0)	0,39 (0,16-0,92)	0,029
No	9 (22,0)	34 (42,0)		
Previa exposición a sulfamidas				
Si	12 (29,3)	22 (27,2)	1,11 (0,48-2,55)	0,806
No	29 (70,7)	59 (72,8)		

Tabla 6. Continuación...

Características	No. Casos (%) n=41	No. Controles (%) n=81	OR (Intervalo 95 %)	Valor de p
Estratificación del número de linfocitos T CD4 ⁺				
< 50 células/mm ³	13 (40,6)	28 (34,6)	2,32 (0,44-12,14)	0,651
50-100 células/mm ³	9 (22,0)	15 (18,5)	3,00 (0,53-16,90)	
101-200 células/mm ³	8 (25,0)	16 (19,7)	2,50 (0,44-14,23)	
> 200 células/mm ³	2 (6,3)	10 (12,3)	1,00 (-)	
ND	9 (22,0)	12 (14,8)		
Enfermedad definitoria de sida				
PcP	7 (17,1)	11 (13,6)	2,55 (0,23-27,71)	0,722
Neurotoxoplasmosis	5 (12,2)	15 (18,5)	1,33 (0,12-14,90)	
Pérdida de peso	5 (12,2)	5 (6,2)	4,00 (0,32-49,60)	
Criptococosis	5 (12,2)	3 (3,7)	6,67 (0,49-91,33)	
Diarreas crónicas	5 (12,2)	5 (6,2)	4,00 (0,32-49,60)	
Candidosis oro-esofágica	4 (9,8)	5 (6,2)	3,20 (0,25-41,21)	
Neumonías	3 (7,3)	9 (11,1)	1,33 (0,11-17,10)	
Tuberculosis	3 (7,3)	8 (9,9)	1,50 (0,12-19,49)	
Número de linfocitos T CD4 ⁺	2 (4,9)	3 (3,7)	2,67 (0,16-45,14)	
Criptosporidiosis	1 (2,4)	1 (1,2)	4,00 (0,2-136,46)	
Linfoma no Hodgkin	1 (2,4)	4 (4,9)	1,00 (-)	
Debut clínico				
No	27 (65,9)	58 (71,6)		0,513
Si	14 (34,1)	23 (28,4)	0,76 (0,34-1,71)	
con <i>Cryptococcus</i> spp.	3 (21,4)	1 (4,3)	13,50 (0,88-207,62)	0,606
con <i>P. jirovecii</i>	2 (14,3)	9 (39,1)	1,00 (-)	
con <i>Candida</i> spp.	2 (14,3)	3 (13,0)	3,00 (0,28-31,63)	
por pérdida de peso	2 (14,3)	4 (17,4)	2,25 (0,23-22,14)	
por diarreas crónicas	2 (14,3)	0 (0)	-	
con Tuberculosis	1 (7,1)	2 (8,7)	2,25 (0,13-38,81)	
con <i>Toxoplasma gondii</i>	1 (7,1)	3 (13,0)	1,50 (0,10-23,07)	
por neumonías	1 (7,1)	1 (4,3)	4,50 (0,19-106,82)	
Presencia de leucoplasia pilosa				
Si	21 (51,2)	40 (49,4)	1,08 (0,51-2,28)	0,848
No	20 (48,8)	41 (50,6)		
Fallecido Período Nov-Abril	27 (65,8)	47 (58,0)	1,40 (0,34-3,04)	0,403
Fallecido Período Mayo-Oct	14 (34,1)	34 (42,0)		

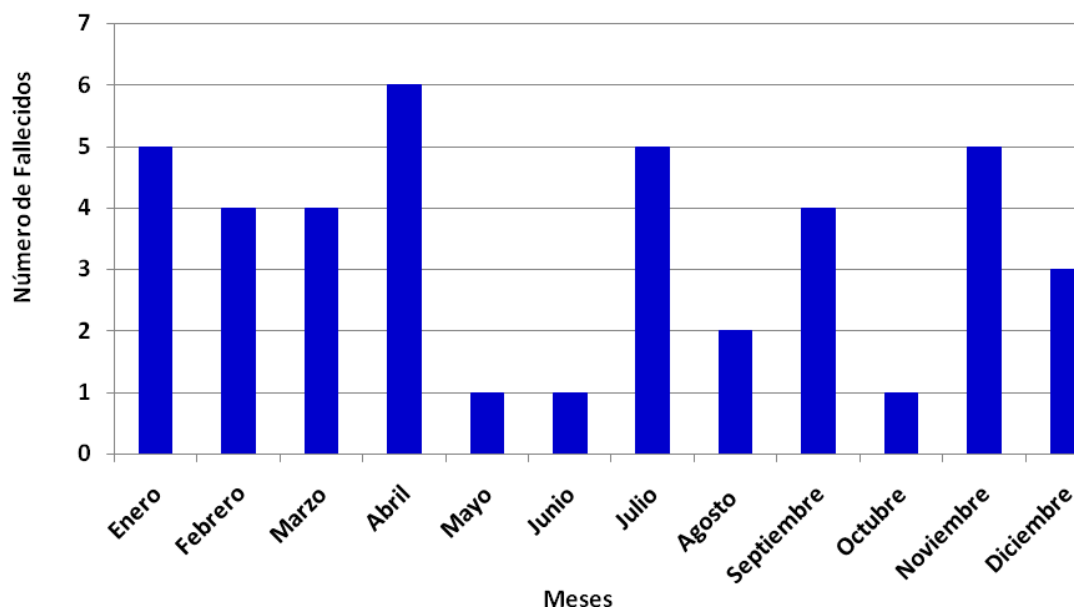


Figura 12: Distribución de los casos fallecidos por sida con PcP según meses del año donde ocurrió su muerte, IPK 1995-2008.

La mayor frecuencia de diagnóstico de la infección VIH entre los fallecidos del estudio se realizó en el año 1998 (12,2 %), de la misma manera coincidió con la mayor frecuencia de casos fallecidos por año, 14,8 % (6/41) (Tabla 7).

Tabla 7: Años de vida con VIH de los casos fallecidos por sida con PcP en el IPK durante el período 1995-2008. (No. Casos =41).

Casos	FDVIH^a	FF^b	Años de vida con VIH
95-02	1989	1995	6
95-03	1992	1995	3
95-09	1992	1995	3
95-10	1988	1995	7
95-22	1989	1995	6
96-15	1986	1996	10
96-18	1995	1996	1
96-55	1990	1996	6
97-18	1988	1997	9
97-26	1993	1997	4
97-33	1991	1997	8
97-36	1989	1997	8
97-37	1991	1997	6
98-04	1998	1998	< 1
98-15	1998	1998	< 1
98-16	1997	1998	1
98-27	1988	1998	10
98-30	1998	1998	< 1
98-49	1994	1998	4
99-02	1997	1999	2
99-14	1987	1999	12
99-15	1999	1999	< 1
99-41	1999	1999	<1
99-44	1996	1999	3
00-17	1998	2000	2
00-20	1997	2000	3

Tabla 8: Continuación...

Casos	FDVIH^a	FF^b	Años de vida con VIH
00-37	1999	2000	1
00-47	2000	2000	< 1
01-14	1998	2001	3
02-02	1994	2002	8
02-05	1995	2002	7
02-29	1995	2002	7
03-22	2003	2003	< 1
04-31	2003	2004	1
05-25	2005	2005	< 1
06-03	2006	2006	< 1
07-08	2007	2007	< 1
07-10	2003	2007	4
07-21	1996	2007	11
08-04	2004	2008	4
08-05	1991	2008	17

^a: FDVIH; Fecha de diagnóstico de VIH.

^b: FF; Fecha de fallecimiento por sida.

Números en negrita significa casos diagnosticados por VIH antes de 1995.

La gran mayoría de los fallecidos (92,7 %) presentó al menos una enfermedad concomitante. Entre estas, las infecciones por *Candida* spp. y citomegalovirus fueron las más frecuentes con 48,8 % y 46,3 %, respectivamente (Tabla 8). Resulto llamativo que en cinco casos de la serie se encontró una inusual coinfección de *Microsporidium* spp. y *P. jirovecii*.

Tabla 8: Enfermedades o agentes infecciosos concomitantes encontradas en los casos fallecidos con sida por PcP en el IPK durante el período 1995-2008. (No. Casos =41).

Características	n=41 n (%)
Enfermedades/agentes concomitantes con PcP	
Candidosis	20 (48,8)
Citomegalovirosis	19 (46,3)
Neurotoxoplasmosis	9 (22,0)
Criptococosis	5 (12,2)
Micobacteriosis	5 (12,2)
Microsporidiosis	5 (12,2)
Sarcoma de Kaposi	4 (9,8)
Herpes simplex	4 (9,8)
Hepatitis	3 (7,3)
Linfoma no Hodgkin	2 (4,9)
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 (2,4)
Neumonía bacteriana	1 (2,4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1 (2,4)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	1 (2,4)
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 (2,4)
<i>Cyclospora cayetanensis</i>	1 (2,4)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	1 (2,4)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	1 (2,4)
<i>Enterobacter cloacae</i>	1 (2,4)
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1 (2,4)
<i>Giardia lamblia</i>	1 (2,4)
Diabetes mellitus	1 (2,4)
Onicomiosis	1 (2,4)
<i>Hemophilus influenzae</i>	1 (2,4)
<i>Treponema pallidum</i>	1 (2,4)
Enfermedad de Castleman	1 (2,4)

Finalmente, la regresión logística multivariada demostró que sólo el tratamiento con sulfamidas al ingreso del paciente se asoció significativamente con fallecer con PcP ($p = 0,016$), como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 9. Características asociadas con la mortalidad en el análisis multivariado en los fallecidos con sida por PcP y sus controles en el IPK durante el periodo 1995-2008 (No. Casos =41, No. Controles =81).

Variable	Valor de p	OR	Intervalo 95%
Edad estraf			
Edad estraf(1)	0,909	0,893	0,129-6,180
Edad estraf(2)	0,971	0,965	0,142-6,556
Edad estraf(3)	0,518	1,985	0,248-15,877
Edad estraf(4)	0,103	0,092	0,005-1,625
Tratamiento con Sulfa al ingreso	0,014	0,299	0,114-0,787
Terapia	0,126	1,998	0,824-4,847

En este estudio no se encontró asociación estadísticamente significativa entre los genotipos obtenidos a partir de la secuenciación de los genes mt LSU rRNA, mt SSU rRNA y su combinación con las variables edad, género, tratamiento antirretroviral, tratamiento con sulfamidas al ingreso, debut clínico, periodo de fallecimiento y el número de linfocitos T CD₄⁺ (Tabla 10).

Tabla 10. Análisis estadístico de la relación de los genotipos de mt LSU rRNA, mt SSU rRNA y su combinación (mt LSU / mt SSU) con variables socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico en los fallecidos con sida por PcP en el IPK durante el periodo 1995-2008.

Variable	Valor de <i>p</i>		
	mt LSU	mt SSU	mt LSU / mt SSU
Edad	0,652	0,058	0,181
Género	0,138	0,242	0,068
Tratamiento antirretroviral	0,398	1,000	0,566
Tratamiento con sulfamidas al ingreso	0,802	0,242	0,840
Debut clínico	0,094	0,408	0,189
Período de fallecimiento	0,398	0,676	0,146
Número de linfocitos T CD ₄ ⁺	0,591	0,630	0,672

Discusión

V. DISCUSIÓN

V.1. Caracterización genotípica de muestras de *P. jirovecii* procedentes de pacientes cubanos fallecidos por sida, mediante el empleo de los genes mt LSU rRNA y mt SSU rRNA.

La mayoría de los estudios de caracterización genotípica de *P. jirovecii* se describen en muestras respiratorias tales como: lavados broncoalveolares, esputos espontáneos e inducidos y lavados orales de pacientes con sospecha de PcP.^{1,88} Escasos trabajos reportados en la literatura científica persiguen este propósito en tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (FFPE). En este tipo de material, el ADN se encuentra fragmentado y mínimas cantidades del material genético pueden encontrarse intactas con su correspondiente peso molecular. Además, las posibilidades reales de una PCR exitosa son limitadas y decrecen con el tiempo de conservación de los tejidos.⁸ De esa manera, es esperado que para el gen mt LSU se logró amplificar el 63,4 % de las muestras analizadas en la investigación, lo que coincide con lo reportado por otros autores que emplean este tipo de material para realizar estudios genéticos.⁸ Hasta nuestro conocimiento este es el primer estudio que caracteriza muestras de *P. jirovecii* procedente de FFPE.

El gen mt LSU rRNA es uno de los dos genes utilizados en esta investigación para caracterizar genéticamente las muestras analizadas, su empleo se justifica por ser considerado un locus altamente informativo, polimórfico y estable en el tiempo. Varios artículos publicados en la literatura científica han utilizado este gen en los estudios de epidemiología molecular.^{42,60,80} Hasta la fecha, se han descrito siete genotipos basados en el polimorfismo existente en las posiciones 81, 85 y 248 de un fragmento amplificado de este gen.⁴²

Con respecto a la posición 81, esta ha sido la menos empleada para estudios de polimorfismo genético, pues solo se han encontrado dos bases nitrogenadas en ese sitio (C y T), con la C como la base más frecuentemente descrita. Tsolaki y colaboradores⁸⁹ han sido los únicos investigadores que han reportado la existencia de la T en esa posición. En cuanto a la composición nucleotídica presente en las posiciones 85 y 248 se han descrito cinco posibles combinaciones del mt LSU rRNA. A, T y C son generalmente las bases nitrogenadas reportadas

en la 85, para la cual ningún estudio, hasta el momento, ha reportado la presencia de G. La posición 248 del gen es menos polimórfica, solo dos variantes han sido descritas C y T, con predominio de la C en los genotipos descritos, aunque la T se ha descrito en otros casos. De esa manera, se describe que 85C/248C corresponde al genotipo 1, 85A/248C al 2, 85T/248C es el genotipo 3, 85C/248T y 85A/248T son asignados a los genotipos 4 y 5, respectivamente. Los diferentes genotipos pueden combinarse en una misma muestra de un mismo paciente y es lo que se conoce como infección mixta.^{40,60,80}

En nuestra investigación, de las cinco posibles combinaciones que se han descrito para el gen mt LSU rRNA se identificaron 3 genotipos (1, 3 y el 2 solo en una infección mixta). Este estudio demostró una alta frecuencia (88,5 %) del genotipo 3, lo cual coincide con lo descrito por Miller y colaboradores en 14 pacientes VIH con PcP en Zimbabue, con una prevalencia de 57,0 %.⁹⁰ Sin embargo, los resultados descritos en nuestro trabajo discrepan de los obtenidos por otros autores en diferentes escenarios mundiales. En ciudades como Sevilla, Lisboa, Londres y Sydney, se describe un predominio del genotipo 1, que se corresponde con el genotipo generalmente más común reportado en Europa.⁹¹⁻⁹³ No se pudo comparar nuestros resultados con otros similares en América porque escasos trabajos han logrado realizar estudios de caracterización genética de *P. jirovecii* en esta región. Pudiera considerarse el genotipo 3 como el de mayor virulencia en las muestras de pacientes cubanos con sida, atendiendo a su elevada frecuencia (88,5 %) en el estudio. No obstante, se necesitan realizar otros estudios donde se involucren diferentes grupos poblaciones cubanos (pacientes con otras inmunodeficiencias no relacionadas al VIH, con neoplasias, diabetes y pacientes colonizados) para demostrarlo. Por otra parte, solo se encontró el genotipo 2 en una infección mixta de un fallecido de la serie estudiada. Esta variante genética se describió fundamentalmente en estudios desarrollados en la India y EE.UU. con similares frecuencias entre ellos (42,0 %).^{60,94}

Las diferencias de prevalencia de genotipos del mt LSU rRNA se deben propiamente a factores inherentes de cada área o región, donde predominan presumiblemente, entre otras, las características climáticas y geográficas que pueden influir directamente en la distribución, circulación y transmisión de diferentes genotipos de *P. jirovecii*.^{93,94} Es válido destacar, que regiones geográficas similares, con condiciones climáticas parecidas tienen tendencias al

predominio del mismo genotipo. Por otra parte, la ausencia de cambios en la frecuencia de detección de los diferentes genotipos identificados en este estudio durante 14 años de epidemia de sida en Cuba, demuestra la estabilidad de este locus genético en el tiempo y su importancia para realizar estudios de epidemiología molecular. Este gen participa directamente en las funciones metabólicas del patógeno, las cuales resultan esenciales para su supervivencia. Se describe en la literatura que mutaciones puntuales en las regiones codificadoras del genoma pueden tener impacto a nivel fenotípico, alterando propiamente la función del gen o la estructura de la proteína que codifica.⁸¹ Este aspecto pudiera explicar su estabilidad y conservación a lo largo de los años.

Un 3,8 % de infección mixta se constató en la presente investigación, similar valor a lo encontrado por Montes-Cano y colaboradores en España en el 2004.⁹⁵ Sin embargo, difiere ligeramente de los valores reportados por Gupta y otros, en la India y por Beard y sus colegas, en EE.UU. que describen 6,0 % y 10,2 % de infección mixta, respectivamente.^{60,94} Por otra parte, mayores discrepancias se han obtenido al evaluar otros métodos moleculares.⁶³ Hauser y colaboradores, con el empleo de cuatro diferentes regiones genómicas del material genético del hongo y luego con el uso de la técnica del SSCP encontraron cerca del 50 % de infecciones mixtas en sus muestras. Es válido mencionar, que esta técnica molecular es solo empleada por estos autores, experiencias en otros laboratorios no aparecen descritas en la literatura consultada.⁶³ Probablemente, la diferencia encontrada entre técnicas es debida a la utilización de los genes evaluados, lo que está relacionado estrechamente con la función de su variabilidad genética o de su tasa de evolución. Es conocido que los genes más variables pueden ser más sensibles en la detección de diferentes genotipos.⁹²

La presencia de genotipos múltiples en un mismo paciente puede responder a tres cuestiones fundamentales: a) coinfección de diferentes poblaciones de *P. jirovecii*, b) heterocigosidad de organismos diploides y c) genes multicopias con variación entre ellas. Investigaciones al respecto han aportado que justamente la causa fundamental pudiera ser la coinfección de diferentes microorganismos de *P. jirovecii*, lo cual indica que la infección por este hongo en los humanos no necesariamente tiene que tener reproducción clonal.^{94,95}

Otro de los genes implicados en este estudio para la caracterización genotípica de muestras de *P. jirovecii* es el gen mt SSU rRNA. Para este gen se logró amplificar el 39,0 % de las muestras analizadas, lo que contrasta con el valor obtenido para el gen mt LSU rRNA. Esto demuestra que a pesar de ser ambos genes multicopias y generar fragmento de amplificación similar (260 pb contra 308 pb), la PCR que emplea como diana el gen mt LSU rRNA es 1,63 veces más sensible que su homólogo mitocondrial. Varios autores coinciden con este resultado cuando han evaluado algunos genes diferentes en pacientes con PcP.^{40,42,60,80} Un estudio interesante desarrollado en Sudáfrica concluyó que entre los ensayos evaluados la PCR del gen mt LSU rRNA demostró la mayor sensibilidad en las muestras analizadas (78 % de sensibilidad y 100 % de especificidad).⁹⁶ De la misma manera, Lu y sus colegas demostraron similar resultado al comparar dianas moleculares como el ITS, 18S rRNA, 5S rRNA, TS, DHFR y mt LSU rRNA.

97

Sobre el gen mt SSU rRNA se han publicado pocos trabajos en la literatura científica y los mismos no reflejan el verdadero impacto del empleo de esta secuencia amplificada para la caracterización genotípica de muestras de *P. jirovecii*. Fundamentalmente, su uso se ha limitado a evaluar la diversidad genética del patógeno en cinco especies diferentes de mamíferos (rata, ratón, conejo, hurón y humano) y como marcador evolutivo de este género.⁸⁵ En 1998, Tsolaki y sus colegas⁸⁹ utilizando varias secuencias (entre ellas la del gen mt SSU rRNA) no encontraron diferencias sustanciales entre muestras de *P. jirovecii* de fallecidos antes de la epidemia VIH/sida con muestras de pacientes actuales. Este estudio permitió inferir que la diferencia en la prevalencia del patógeno antes y después de la epidemia VIH/sida no radica propiamente en sus variaciones genéticas.^{40,89} Varios autores consideran que el gen mt SSU rRNA posee menor poder de discriminación que el gen mt LSU rRNA, ya que solo dos posiciones analizadas (160 y 196) en una porción de 338 pb del gen presentan cierto grado de polimorfismo.^{40,80,85,89} Según Hunter y colaboradores, cuatro posibles combinaciones nucleotídicas se pueden obtener (en la 160 la A y C, mientras que en la 196 esta presenta la T y G), de las cuales, hasta la fecha únicamente dos genotipos han sido descrito en la literatura: genotipo 1 (160C/196T) y genotipo 2 (160A/196G).⁸⁵

En este estudio, se describe por primera vez a nivel mundial la existencia de una nueva variante del gen mt SSU rRNA (genotipo 3 (160A/196T)), encontrada mayoritariamente en las muestras analizadas (93,8 %). Recientemente, investigadores españoles y franceses demostraron que este nuevo genotipo está circulando también por las ciudades de Sevilla y Lille respectivamente, con la mayor frecuencia de las cuatro posibles combinaciones que existen. Los resultados de este trabajo permiten sugerir la necesidad de incorporar este gen en los análisis multilocus que se realicen y desarrollar otros estudios donde se investigue el posible rol de este gen como marcador geográfico. De la misma manera, otras investigaciones pudieran estar encaminadas a buscar posibles asociaciones de genotipos del gen mt SSU rRNA con la severidad de la enfermedad, así como con datos clínicos y epidemiológicos importantes y de interés para el paciente.

Al analizar ambos genes de manera simultánea (análisis multilocus) se encontraron hallazgos interesantes. La investigación demostró un predominio mantenido en el tiempo de la combinación 85T/248C//160A/196T (13/16 muestras secuenciadas por el gen mt SSU rRNA) en las muestras analizadas en el presente trabajo. Aunque el número de casos evaluados en este trabajo es relativamente pequeño, los resultados obtenidos permiten sugerir otras dos conclusiones importantes: a) una adaptación de ese genotipo (85T/248C//160A/196T) entre los fallecidos cubanos con sida por espacio de 14 años y b) activa transmisión de ese mismo genotipo entre los pacientes analizados con limitada diversidad genética intra-específica en las muestras analizadas. Por otra parte, la baja diversidad genética encontrada en las muestras estudiadas sugiere una posible hipótesis sobre la circulación estrecha de esta combinación de genotipos mitocondriales en una isla, totalmente diferente a la situación que ocurre en los continentes, donde una mezcla de genotipos generalmente se encuentra presente en los casos que se estudian.^{91,92,94} Esta información es de vital importancia, pues pudiera esclarecer aspectos importantes de la epidemiología de *P. jirovecii* a nivel mundial y permitiría el trazado de estrategias correctas para la toma de decisiones en el manejo de esta infección. La presencia de un genotipo multilocus particular (85T/248C//160A/196T) en exceso es frecuentemente considerado una fuerte evidencia de reproducción clonal, lo que indica que el genotipo multilocus es replicado como una unidad sin flujo genético atribuido a la reproducción sexual.⁹⁸ De la

misma manera, dichos resultados pudieran indicar que este genotipo de *P. jirovecii* se incrementa rápidamente en frecuencia para producir un clon epidémico en estos tipos de casos.⁹⁹

V.2. Identificación de la existencia de muestras de *P. jirovecii* con resistencia a las sulfamidas mediante el estudio del gen de la DHPS.

El tercer gen evaluado en este trabajo es el que codifica para la DHPS, enzima clave en el metabolismo del ácido fólico y con implicación en la resistencia a las sulfamidas. El CTX, combinación de TMP y SMX, constituye el fármaco de elección para la profilaxis y el tratamiento de la PcP. La mayor parte de su actividad anti-*Pneumocystis* radica en el SMX, cuya diana es justamente la DHPS. Se ha descrito la existencia de mutaciones puntuales en regiones conservadas de este gen en diferentes microorganismos, tales como *Streptococcus pyogenes*, *E. coli*, *Neisseria meningitidis* y *Plasmodium falciparum*.^{42,100}

De la misma manera, mutaciones puntuales se han identificado en *P. jirovecii*, las cuales resultan imposible de medir debido a la carencia de cultivo *in vitro* de este microorganismo. Lane y colaboradores en 1997, fueron los pioneros en reportar el polimorfismo de dicha secuencia en el patógeno. Fundamentalmente, dos posiciones (55 y 57) son las involucradas en la resistencia a las sulfamidas, donde todas las mutaciones reportadas son cambios no sinónimos que resultan en sustituciones aminoacídicas (principalmente cambio de 55Treonina (Thr) por Alanina y 57Prolina (Pro) por Serina). Resulta genotipo salvaje aquella muestra que presenta en la posición 55 el aminoácido Thr y Pro en la posición 57. Estas secuencias son reconocidas por dos enzimas de restricción *Acc 1* y *Hae III* cuyos cortes generan patrones característicos que pueden ser identificados en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. La interpretación del genotipo salvaje es la ausencia de resistencia en los microorganismos (*P. jirovecii*) de las muestras que se analicen.¹⁰⁰

En esta investigación, solo dos muestras de los 41 tejidos embebidos en parafina analizados resultaron positivas por la PCR que amplifica un fragmento de 370 pb para un 4,9 % . Con este mismo tipo de muestra y con el empleo de la PCR que amplifica un fragmento de 750 pb, Robberts y colaboradores no obtuvieron ninguna amplificación en 12 muestras obtenidas de

pacientes con sida de un hospital sudafricano.⁹⁶ Otros estudios que evalúen un número mayor de muestras respiratorias de pacientes con sospecha de PcP son necesarios realizar, para conocer el verdadero impacto de la presencia/ausencia de resistencia a las sulfamidas en muestras de *P. jirovecii* provenientes de pacientes cubanos.

V.3. Evaluación de la factibilidad de dos nuevos sistemas de reacción en cadena de la polimerasa para la caracterización de *P. jirovecii* en muestras embebidas en parafina.

En este estudio se evaluaron dos nuevos sistemas de PCR para lograr la caracterización de *P. jirovecii* en muestras conservadas en parafina. El primer sistema de PCR empleado es el fragmento de 186 pb del gen de la DHPS. Este protocolo ha sido descrito con anterioridad por Costa y colaboradores en el 2006 en muestras de lavados broncoalveolares de pacientes VIH con sospecha de neumocistosis.⁸⁶ Sin embargo, hasta este momento, no se ha evaluado la utilidad de dicho PCR en muestras FFPE.

En la presente investigación siete muestras adicionales (17,1 %) resultaron positivas al emplear el sistema de amplificación con cebadores que generan un fragmento de menor talla molecular (186 pb) del gen de la DHPS. Las diferencias encontradas entre los resultados de la amplificación de los genes mitocondriales y entre los genes de la DHPS se deben a varias razones: a) los genes mitocondriales poseen múltiples copias en el genoma del microorganismo, mientras que la DHPS es un gen unicopia, este aspecto limita considerablemente su amplificación en cualquier tipo de muestra, pues se necesita una cantidad apreciable del microorganismo para garantizar el resultado positivo de la PCR (63,4 % y 39,0 % mitocondriales mayor y menor contra 4,9 % y 17,1 % amplificaciones de la DHPS con diferentes tallas, 370 y 186 pb respectivamente). Secuencias repetitivas en el material genético de cualquier microorganismo garantizan una elevada sensibilidad para su detección, ya que existe una mayor probabilidad de lograr amplificar dicha diana en el patógeno que se analiza.^{91,96}

Por otra parte, como ya se ha explicado anteriormente, en los tejidos embebidos en parafina el ADN se encuentra fragmentado y pequeñas proporciones del ácido nucleico poseen alta talla molecular. No solo poseer la secuencia repetitiva en el genoma garantiza el éxito de la PCR,

además resulta importante que el tamaño de la secuencia a amplificar no exceda de los 300 pb. De esa manera, poder lograr la amplificación de determinados fragmentos de talla molecular superior a este valor (370 pb) resulta una tarea compleja cuando el material de partida son los tejidos FFPE. Estas conclusiones son difíciles de comparar con otros estudios en *P. jirovecii*, ya que pocos trabajos en parafina han sido publicados en la literatura y de estos muy pocos abordan esta temática.⁸ Sin embargo, en otros patógenos de importancia médica, tales como *Histoplasma capsulatum* y *M. tuberculosis*, estos argumentos aquí expuestos han sido claramente demostrados.^{101,102}

Las dos amplificaciones obtenidas por la PCR-370 pb, así como las siete logradas por la PCR-186 pb resultaron ser genotipo salvaje, lo cual indica la ausencia de mutaciones puntuales en este gen en la serie analizada. Este hallazgo, a pesar de contar con un número reducido de muestras, resulta de extraordinaria importancia para nuestro país. Es ante todo, el primer estudio en Cuba que aborda la situación de la resistencia a las sulfamidas en *P. jirovecii*. Además, sugiere que en nuestro entorno no existe hasta el momento ninguna resistencia a este fármaco a pesar de utilizarse como quimioprofilaxis en los pacientes fallecidos por sida con PcP (78,0 % al ingreso y 29,3 % previo al ingreso). Este aspecto debe estudiarse con mayor profundidad, mediante el análisis de otro tipo de material de partida (fundamentalmente lavados broncoalveolares y otras secreciones respiratorias) en los que se ha demostrado hasta un 75,0 % de amplificación de la DHPS.⁹⁶ Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por autores de países en vías de desarrollo como Brasil, India y China donde se describen bajas prevalencias de mutaciones puntuales en dicho gen y de quimioprofilaxis a las sulfamidas.^{63,103} Esto es totalmente diferente a lo que sucede en los países desarrollados donde elevadas tasas de resistencia han sido descritas por previas exposiciones a las sulfamidas.¹⁰³ Recientemente, Dini y colaboradores alertaron sobre el empleo del CTX en infecciones de otros patógenos oportunistas que afectan a pacientes VIH/sida, pues el uso frecuente de estos fármacos pudiera favorecer la aparición de microorganismos resistentes de *P. jirovecii* en el medio.¹⁰⁴

El otro nuevo sistema de la PCR evaluado en este estudio para lograr la caracterización de *P. jirovecii* en muestras FFPE es el que amplifica un fragmento de 136 pb del gen mt LSU rRNA. Este protocolo ha sido descrito con anterioridad por De la Horra y colaboradores en el año

2004.⁸⁷ Este grupo de autores en su trabajo solo se limitaron a la detección molecular de *P. jirovecii* en muestras de pacientes con neoplasias de pulmón. Por esta razón, nuestro estudio pretende evaluar la factibilidad de dicho protocolo para caracterizar *P. jirovecii* en muestras FFPE. En la investigación, la totalidad de las muestras analizadas (41) resultaron positivas al emplear este sistema de amplificación. Otras investigaciones han descrito que la PCR que emplea fragmentos más pequeños del gen mt LSU rRNA en sus protocolos poseen mayor sensibilidad para detectar el patógeno.^{39,86} De la Horra y sus colegas con el uso del fragmento de 136 pb de este propio gen lograron demostrar una posible asociación entre la infección por *P. jirovecii* y el carcinoma pulmonar de células pequeñas. En aquella investigación, los autores lograron concluir que la PCR que amplifica dicho fragmento es la más sensible para evaluar muestras conservadas de tejidos embebidos en parafina.⁸⁶ Similar resultado fue obtenido en el actual estudio donde el 100 % de las muestras analizadas resultaron positivas con la PCR-136 pb, mientras que previamente solo el 63,4 % de las muestras involucradas en la investigación se logró amplificar con la PCR-260 pb. En este caso, al igual que para las PCR que amplifican diferentes tallas del gen de la DHPS (370 pb y 186 pb) el tamaño del producto a amplificar pudiera limitar el éxito de la reacción.

Sin embargo, es válido mencionar que además de lo descrito anteriormente, otros factores deben tenerse en consideración para garantizar mayor eficiencia de las PCR en las muestras FFPE. Entre ellos se pueden citar: el tiempo de fijación de la muestra, la temperatura de fijación del tejido, el fijador empleado para lograr este objetivo, la temperatura y humedad del lugar donde se conservan los bloques, así como la cantidad y espesor de los cortes a emplear en la PCR.¹⁰¹ Por lo tanto, resulta de valor extraordinario tomar en cuenta todos estos requerimientos para realizar un buen diseño, con el objetivo de detectar con la mayor eficiencia posible patógenos de importancia médica en muestras FFPE.

A pesar de lograr el 100 % de la amplificación de las muestras analizadas, 6 de ellas (14,6 %) no pudieron secuenciarse. Este fenómeno ha sido observado por varios autores^{96,97} y estos sugieren que la cantidad del microorganismo presente en la muestra se encuentra próxima al umbral de detección de la técnica, influyendo en la intensidad de la banda esperada y el posible fracaso para secuenciar el producto. Con la secuenciación de los productos de la PCR-136 pb se

comprobó los resultados previamente obtenidos por la PCR-260 pb y en las restantes 9 muestras se identificó la T en la posición 85 del gen mt LSU rRNA. Desafortunadamente, debido al tamaño del fragmento amplificado (136 pb) no pudo corroborarse los resultados obtenidos en la posición 248 de dicho gen. Sin embargo, es conocido a través de los artículos publicados que la T es la base nucleotídica más frecuentemente encontrada en la posición 248 de dicho gen.^{8,40,60} Los resultados de esta investigación sugieren que se empleen iniciadores que generen fragmentos de baja talla molecular en las PCR para lograr amplificaciones exitosas, así como la utilización de regiones repetitivas en el genoma del microorganismo. Estos aspectos adquieren mayor importancia cuando las muestras que se analizan son FFPE.

Otros genes han mostrado variabilidad genética en muestras de pacientes VIH/sida con *P. jirovecii*, entre ellos se destacan los ITS nucleares del patógeno.⁴² A pesar de su gran polimorfismo y la amplia variedad de combinación que se establecen entre los mismos, sus resultados son difíciles de interpretar. Es importante destacar que hasta la fecha se ha podido comprobar la existencia de 27 genotipos del ITS1 y 35 del ITS2, lo que resultan 945 combinaciones posibles. Por otra parte, a diferencia de otros hongos, el ITS nuclear de *P. jirovecii* se presenta en una única copia en el genoma del microorganismo y son conocidas las tasas limitadas de éxito de la PCR cuando se amplifican este tipo de genes en los FFPE.^{40,80} Resultaría interesante desarrollar nuevas investigaciones que empleen este gen en tejidos embebidos en parafina, siempre que se utilicen los requisitos explicados anteriormente para el trabajo con dichas muestras.

V.4. Descripción de algunas variables socio-demográficas, de laboratorio y de manejo clínico de los pacientes cubanos fallecidos por sida con neumonía por *P. jirovecii* y sus posibles asociaciones con esta infección.

En la actualidad, se conoce poco sobre las características socio-demográficas y clínicas de los pacientes con PcP en Cuba. Desde la descripción del primer caso de neumoquistosis en el país en 1969³, solo otros cuatro artículos publicados abordan esta temática. En 1977, un colectivo de doctores del Hospital Infantil William Soler describió los primeros hallazgos clínico-epidemiológicos en siete niños fallecidos por este microorganismo.⁴ Quince años después,

Menéndez-Capote y Millán-Marcelo por métodos clínico-radiológicos determinaron la prevalencia de la infección por *P. jirovecii* en pacientes VIH/sida ingresados en el IPK.⁵ Otros detalles importantes y de interés fueron obtenidos en la investigación de 211 fallecidos con necropsias en el IPK entre los años 1986-1998.⁶ Finalmente, en el año 2010 se describe mediante métodos de tinción un caso de *P. jirovecii* en una mujer de 42 años con asma bronquial y alcoholismo crónico como factores de riesgo para esta enfermedad.⁷

Hasta este momento y según las búsquedas realizadas en la literatura científica esta es la serie de casos más amplia que estudia las características socio-demográficas y clínicas de fallecidos cubanos por sida con PcP en Cuba. La edad promedio de los casos fallecidos fue de 35 años. Estos resultados coinciden con los reportados por Le Minor y sus colegas en una cohorte amplia de pacientes VIH con microscopia negativa para tuberculosis. Dichos investigadores calcularon promedios de edades de 35 y 29 años en muestras de pacientes de Cambodia y Viet Nam, respectivamente.¹⁰⁵ Por otra parte, los hallazgos aquí descritos coinciden con los identificados por otros autores que estudian *P. jirovecii* en la población general. Cermeño y otros en el 2006, identificaron la PcP en 35,0 % de las muestras analizadas, con la media de edades de los infectados de 33,5 años.¹⁰⁶ En la literatura científica, se ha señalado que la edad promedio de los pacientes con neumocistosis es de 40 años.¹⁰⁷ Resulta de un valor extraordinario, conocer que los fallecidos por sida con insuficiencia respiratoria cuyas edades oscilan entre los 50 y 59 años de edad tienen 19,2 veces más probabilidad de fallecer por PcP que el resto de los que mueren por otras causas, lo cual pudiera constituir una alerta epidemiológica importante y orientar a los facultativos de nuestros servicios de salud sobre este aspecto. Recientemente, Hsiao-Wei y colaboradores identificaron la edad mayor de 40 años como un factor asociado a la mortalidad en un estudio desarrollado en Taiwán en pacientes VIH entre los años 1997-2009.¹⁰⁸

Básicamente, la población infectada con VIH en Cuba corresponde al género masculino (proporción 4:1 con respecto al femenino), en su mayoría hombres que tienen sexo con otros hombres.¹⁰⁹ De esta manera, no resulta sorprendente que el 80,5 % de los fallecidos en este estudio correspondan a ese sexo. Una proporción de 3/1 de hombre/ mujer con VIH fue descrito por Shih en un estudio desarrollado en Taiwán entre los años 2004-2008.¹¹⁰ De forma similar, investigadores franceses obtuvieron una proporción de 10:3 en pacientes VIH con PcP.¹¹¹

Pocos estudios abordan la temática de la influencia del color de la piel en la infección por *P. jirovecii* y en la mayoría de estos es difícil realizar comparaciones debido al acceso limitado a los servicios de las poblaciones hispanas, descendientes de africanos y aborígenes, entre otras, continuamente marginadas y segregadas en otras sociedades.⁸⁸ La incidencia de la PcP parece ser menor en individuos de color de la piel negra que en blancos. Un reporte en los EE.UU., encontró diferencias significativas entre la ocurrencia de *P. jirovecii* entre estos dos grupos poblacionales (riesgo relativo 0,37), incluso a pesar del menor empleo de quimioprofilaxis recomendada en los pacientes de color de la piel negra.¹¹² Coincidentemente, Mohamed y sus colegas describieron frecuencias diferentes de incidencia de la PcP entre individuos blancos y negros (58,8 % y 27,3 %, respectivamente), explicadas fundamentalmente por diferencias genéticas entre estos dos grupos.¹¹³ Otras investigaciones deben ser realizadas para demostrar estos resultados y poder tomarlos en consideración. En la actual investigación los OR calculados no brindaron diferencias para dicha variable. Por otra parte, en nuestro país la proporción de pacientes infectados con VIH según el color de la piel presenta un amplio predominio del color de la piel blanca (84,4 %), seguida de la negra (8,6 %) y luego la mestiza (6,7 %). Sin embargo, existen cambios en la distribución de personas según el color de la piel en la población cubana (blanca 65,1 %, mestiza (24,9 %) y negra (10,1 %)).¹⁰⁹ Este aspecto pudiera ser de importancia relevante para tomar futuras decisiones en los servicios de salud sobre esta temática.

Los estudios que relacionan la profesión/ocupación de los pacientes con el desarrollo de la infección por *P. jirovecii* son cada vez más necesarios, fundamentalmente para brindar detalles adicionales sobre esta enfermedad. En la investigación predominaron los trabajadores por cuenta propia y los obreros. Se podría especular sobre una posible relación entre la transmisión aérea de esta infección y el hacinamiento de los obreros en sus empresas y los continuos intercambios que pudieran tener los trabajadores por cuenta propia con el resto de los individuos de la comunidad. Sin embargo, este aspecto no pudo demostrarse en la presente investigación. Un artículo publicado en el año 2000 por Navin y otros, analizaron 288 pacientes admitidos en un hospital de Atlanta por espacio de 20 meses. Ellos evaluaron 79 variables como factores de riesgo potenciales para desarrollar neumonía adquirida de la comunidad. Una de las conclusiones de este trabajo fue que los pacientes que trabajaban en la agricultura, así como aquellos que tenían

una profesión relacionada con los suelos o disfrutaban de campismo y excursiones frecuentemente tenían casi 5 veces más probabilidades de desarrollar una infección por *P. jirovecii* que los otros pacientes VIH sin neumonía (controles del estudio). Estos resultados involucran al suelo como una posible fuente de infección del microorganismo.¹¹⁴ Se conoce que *P. jirovecii* es un microorganismo ubicuo en la naturaleza y varias investigaciones han demostrado ADN del microorganismo en diversos nichos ecológicos entre los cuales se destaca este recurso, no obstante nunca se ha demostrado la presencia del hongo en su totalidad en este tipo de ambiente.^{40,80} Los resultados obtenidos en este estudio relacionaron fundamentalmente a los fallecidos cuya profesión fue la de técnico con un OR de 3,03 con respecto a los controles, sin diferencias significativas y con un número reducido de casos.

En la mayoría de los estudios descritos hasta el momento en la literatura científica, la mayor cantidad de personas con VIH/sida se concentran en las áreas urbanas, justamente en la capital del país.^{6,105,106,108,115} Este mismo fenómeno es descrito en el presente trabajo, donde el 68,3 % de los fallecidos residían en Ciudad de La Habana (antes de la división política administrativa del 2011) en el momento de su muerte. Es válido destacar, que los pacientes fallecidos que vivían en la capital tuvieron 5, 3 veces más probabilidades de morir con PcP que los controles, lo que pudiera reflejar una posible alerta epidemiológica, aunque no existieron diferencias estadísticas significativas. Dos estudios interesantes desarrollados en EE.UU. relacionan zonas residenciales de ese país como factor de riesgo de enfermar por *P. jirovecii*.^{116,117}

Porcentajes variables de mortalidad por *P. jirovecii* han sido descritos en la literatura.^{88,118,119} Mientras que en los países desarrollados este patógeno ocupa un rol importante en la mortalidad de los pacientes con VIH/sida¹, en los países en vías de desarrollo los estudios le atribuyen un papel más relevante a la tuberculosis.⁸⁸ No obstante, altas frecuencias de mortalidad por *P. jirovecii* han sido identificadas en pacientes VIH/sida de África, India, Asia y América.^{82,88,120} Se deben tener presente los problemas que existen con el diagnóstico, quimioprofilaxis, disponibilidad de la TARGA y atención a los pacientes en estos países, lo que repercute directamente en la mortalidad por la PcP.⁸⁸ Los resultados obtenidos en esta investigación no coinciden con los reportados previamente por Arteaga y sus colegas en 1998 en

el periodo de 1986-1998, los cuales obtuvieron un 32,0 % de mortalidad por *P. jirovecii* en 211 autopsias de pacientes VIH/sida.⁶ Al parecer el impacto del uso de la TARGA y las sulfamidas como quimioprofilaxis en el periodo que se desarrolló el actual trabajo, han incidido en la disminución de la mortalidad entre estos pacientes. Por lo que no es casual que la mayoría de los casos analizados en la serie hayan fallecido antes del periodo de la aplicación de la TARGA (70,1 %).

La TARGA en Cuba no comenzó hasta mayo del 2001. Es por ello que desde los primeros años de la epidemia algunos pacientes, a través de donaciones y gestiones personales, recibían algún esquema terapéutico que no siempre era el más adecuado ni era recibido con la regularidad requerida. Esto conllevó a la aparición de enfermedades oportunistas y el aumento de la mortalidad y letalidad por sida.¹⁰⁹ En la serie analizada, la mayoría de los pacientes que no recibieron TARGA debutaron con sida clínico y su diagnóstico fue realizado en condiciones de deterioro inmunológico importante (menos de 100 células/mm³), debido a lo avanzada que se encontraba su enfermedad. Estos resultados coinciden con otros descritos en la literatura que describen en detalles el beneficio de la TARGA en este tipo de pacientes.^{105,108}

El 78,0 % de los pacientes fallecidos en esta serie recibieron sulfamidas al último ingreso. Esto contrasta con el menor porcentaje referido para los controles con 58,0 % y OR de 0,39 y diferencias significativas ($p = 0,029$). Este aspecto explica el buen desempeño del personal médico del IPK, que tiene presente en todo momento la posibilidad de la infección por este microorganismo y prescriben oportunamente el fármaco correcto. Las sulfamidas, son un efectivo agente profiláctico tanto para las neumonías adquiridas en la comunidad, como para las infecciones por *P. jirovecii*, para las cuales son consideradas el fármaco de elección.^{104,115} Además, esta investigación demostró que el tratamiento con sulfamidas al ingreso del paciente con VIH/sida es un factor asociado a la mortalidad por *P. jirovecii* ($p = 0,014$ en el modelo de regresión logística). Sin embargo, se necesita realizar otros tipo de estudio para evaluar la influencia de otras variables que contribuyan a la mortalidad por *P. jirovecii* en estos pacientes.

Más del 60 % de los pacientes con sida pudieran tener una enfermedad respiratoria en la progresión de su enfermedad.¹ Un medidor importante a tener en consideración es el número de

linfocitos T CD4⁺, el cual es un indicador del nivel de inmunodepresión celular del paciente. En este trabajo, la media determinada (Tabla 6) demuestra que los pacientes que fallecen estaban severamente inmunodeprimidos con riesgo importante de adquirir cualquier infección oportunista, ya que el 40,6 % tenía niveles celulares por debajo de las 50 células/mm³. Por esa razón, no resulta extraño que la mayoría de los fallecidos (92,7 %) tuvieran, además de la PcP, otra enfermedad concomitante.

En individuos inmunodeprimidos la coexistencia de infección pulmonar puede llegar hasta el 40,0 % de los casos en una serie. Organismos como citomegalovirus, *Cryptococcus* spp., *Aspergillus* spp., *Herpes simplex*, *Candida* spp. y *Mycobacterium avium* han sido identificados en muestras pulmonares de pacientes con PcP. En raras ocasiones la dualidad PcP y *M. tuberculosis* ha sido reportada.¹¹⁸ En el presente estudio, las coinfecciones más frecuentemente encontradas fueron la candidosis y la citomegalovirus, lo cual concuerda con otros reportes en la literatura.^{43,74} Worodria y colaboradores describen 4,0 % de sujetos seropositivos al VIH con PcP y Sarcoma de Kaposi, valor ligeramente menor al encontrado en esta serie.¹¹⁹ De la misma manera, estos autores identificaron 6,0 % de infección mixta de PcP y tuberculosis pulmonar, inferior al 12,2 % reportado en el presente trabajo. Por otra parte, Wong y otros describieron 15,2 % de infección mixta de PcP con *Cryptococcus* spp., similar al valor encontrado en esta serie (Tabla 6).¹²⁰

Sin embargo, una inusual coinfección de *P. jirovecii* y *Microsporidium* spp. es descrita en este trabajo, siendo la serie más amplia descrita en la literatura hasta esta fecha y podría considerarse como el segundo reporte a nivel mundial documentado de infección mixta de estos dos patógenos en un mismo paciente. Probablemente, el diagnóstico mejorado de la microsporidiosis y la intensa inmunodepresión de los pacientes facilitaron esa rara asociación.

Además, otro aspecto importante es que solo para el 17,1 % de los casos fallecidos, la PcP fue la enfermedad definitoria de sida, lo cual sugiere un manejo correcto (diagnóstico, tratamiento y cuidado especializado) del equipo médico a cargo del paciente. Sin embargo, el estudio brindó un detalle interesante, existió casi siete veces más probabilidad de fallecer por PcP cuando la criptococosis fue la enfermedad que define sida que por otra enfermedad analizada.

Esto pudiera ser una alerta importante y un dato de interés para el personal médico involucrado en la atención a los pacientes VIH/sida.

El diagnóstico temprano de la infección por VIH permite un mejor pronóstico de la enfermedad para el paciente. Por esta razón, los pacientes que se diagnosticaron por búsqueda activa en los primeros años de la serie tuvieron mayor años de vida que los diagnosticados en los últimos años (Tabla 9). Una posible explicación al respecto es que la búsqueda activa realizada por las autoridades y personal médico cubano en los primeros años de la epidemia de sida fue muy efectiva, sin embargo estos resultados contrastan con el diagnóstico tardío de la infección que se realiza en estos momentos en el país.

La leucoplasia pilosa en la lengua (LPL) es un elemento interesante que se describe en este trabajo. Se reporta en la literatura que hasta un 90,0 % de los pacientes VIH/sida pueden presentar en el transcurso de su enfermedad una manifestación oral.¹²¹ Algunos estudios han identificado asociación entre la LPL y la candidosis oral.¹²² De manera análoga, autores tailandeses encontraron que los pacientes que poseían LPL tenían 2,2 veces más probabilidad de desarrollar PcP que sus respectivos controles.¹²³ En la actual investigación, se describió que un poco más de la mitad de los pacientes fallecidos por *P. jirovecii* tuvieron LPL. No obstante, estos datos no resultaron significativos para el estudio ($p = 0,848$).

Se han descrito variaciones en el número de casos de pacientes VIH/sida con PcP en diferentes meses del año en varios países.⁹³ Asociaciones interesantes, entre temperatura, humedad, cantidad de precipitaciones y los casos de PcP se plantean en la literatura.^{124,125} El clima cubano es del tipo cálido tropical, con estación lluviosa en el verano. Según el Instituto de Meteorología de Cuba en la temporada de noviembre a abril, las variaciones del clima se hacen más notables con cambios verdaderamente bruscos. En cambio en los meses de mayo a octubre se presentan pocas variaciones en el estado del tiempo.¹²⁶ En el presente estudio, el 14,6 % de las defunciones de los pacientes ocurrieron en el mes de abril. Al estratificar los datos obtenidos por temporadas (según el clima en Cuba), se observó que 27 de los 41 fallecidos analizados en la serie se incluían en el periodo de noviembre-abril, casi el doble de las muertes ocurridas en el periodo restante con un OR de 1,4 pero sin diferencias significativas ($p = 0,403$). La temporada

de noviembre-abril coincide con los meses en los cuales se registran las temperaturas más bajas en el país. La transmisión de infecciones respiratorias de manera general se favorece en los periodos de baja temperatura, pues existe una disminución importante de la función del aparato muco-ciliar de los individuos. De esta manera, los resultados de esta investigación brindan datos que sugieren que en Cuba la mortalidad por *P. jirovecii* en pacientes VIH/sida pudiera ocurrir en el periodo que abarcan la temporada de noviembre-abril. Sin embargo estudios de estacionalidad deben ser desarrollados para demostrar esta hipótesis.

En las búsquedas realizadas en la literatura científica existe poca información sobre la asociación de características clínicas, socio-demográficas y de laboratorio con los genotipos identificados en los genes mitocondriales. Un estudio desarrollado en Australia en 53 pacientes VIH y siete no VIH no encontraron asociación entre estos aspectos.⁹² Similar resultado fue obtenido en este trabajo entre 41 fallecidos por sida con *P. jirovecii*. La homogeneidad existente entre los datos para ambos genes analizados y el carácter retrospectivo del estudio pueden influir directamente en estos resultados. Otras investigaciones prospectivas que involucren diferentes grupos poblacionales pudieran brindar asociaciones interesantes entre estas variables.

V.5. Consideraciones generales

La PcP es considerada una de las enfermedades oportunistas más frecuentes que pueden afectar a los pacientes VIH/sida. A pesar del uso de la TARGA y la quimioprofilaxis recomendada, este patógeno causa una importante morbi-mortalidad a nivel mundial, fundamentalmente en aquellas personas que desconocen su infección por el VIH, así como las que tienen mala adherencia al tratamiento antirretroviral.¹ En los países en vías de desarrollo la dificultad de acceder a los servicios de salud y los problemas técnicos-operacionales para su diagnóstico han incidido en el aumento de los casos de PcP en esas regiones geográficas.⁸⁸

El principal obstáculo para el conocimiento amplio del microorganismo en todas sus aristas ha sido la ausencia de un medio de cultivo apropiado para obtener grandes cantidades del patógeno. Como una alternativa para su estudio se han utilizado las técnicas moleculares, las

cuales han aportado un importante caudal de información y han sido un baluarte esencial para el diagnóstico, conocimiento de la resistencia a las sulfamidas y caracterización del patógeno.⁴²

Varios autores, en el afán de realizar la caracterización molecular de este microorganismo han empleado un número importante y diferente de muestras clínicas provenientes de vías respiratorias de pacientes con sospecha de PcP.^{40,80,96} Sin embargo, hasta este momento no se ha evaluado el impacto y la utilidad de las muestras FFPE para conseguir este propósito. En la presente investigación dos genes mitocondriales (mt LSU y mt SSU rRNA) se lograron amplificar, lo que demuestra la factibilidad de este tipo de muestra para realizar largos estudios de epidemiología molecular. Por otra parte, el estudio permitió describir un nuevo genotipo del gen mt SSU rRNA, cuyo impacto debería analizarse en otras poblaciones y regiones donde se haya caracterizado previamente el microorganismo mediante el gen mt LSU rRNA. También, los datos que aporta la actual investigación sugieren la limitada circulación del patógeno en los pacientes de las muestras analizadas. Estos resultados conllevarían al trazado de nuevas estrategias para el manejo de los pacientes con PcP.

Es válido resaltar que la investigación ofrece datos que indican que no existen mutaciones puntuales vinculadas a la resistencia a sulfamidas en el gen de la DHPS de las muestras de FFPE en los fallecidos cubanos por sida con *P. jirovecii* en la serie analizada. Este aspecto es de gran interés para los facultativos, pues cuentan con hallazgos concretos sobre el principal fármaco de elección para tratar la neumocistosis. No obstante, otros estudios que involucren mayor número de individuos, distintos grupos poblaciones y diferentes tipos de muestras deben ser desarrolladas para demostrar la veracidad de esta investigación.

Finalmente, en este estudio no se logró determinar ninguna asociación entre los genotipos obtenidos y las características clínicas, epidemiológicas y socio-demográficas analizadas a lo largo de la serie. Futuros trabajos encaminados a investigar este aspecto abrirían nuevas líneas de investigación y podrían brindar soluciones a la problemática planteada. Sin embargo, el estudio permitió describir algunos elementos importantes de la infección por *P. jirovecii* en los fallecidos cubanos por sida con esta enfermedad en el periodo de 1995-2008. Estos datos permiten brindar un perfil adecuado sobre las características clínicas, socio-demográficas y epidemiológicas para

que los facultativos puedan enfrentar la PcP, enfermedad que continúa ocasionando un impacto negativo a nivel mundial con serios problemas para su diagnóstico.

Los resultados de esta investigación no solo representan un valor extraordinario para el conocimiento de la PcP en Cuba, sino a nivel mundial. Por lo tanto, el estudio actual brinda informaciones novedosas que pueden ser utilizadas en un mejor manejo de la neumocistosis en los servicios de salud.

Conclusiones

VI. CONCLUSIONES

1. La caracterización genética de *P. jirovecii* en muestras de tejido pulmonar embebido en parafinado de fallecidos cubanos demostró un predominio mantenido en el tiempo del genotipo 3 (85T/248C) y la existencia de un nuevo genotipo del mt SSU rRNA a nivel mundial, el cual circula en elevada frecuencia en el país.
2. El análisis multilocus de las muestras investigadas sugiere una circulación limitada de *P. jirovecii* en la serie analizada, con la existencia de un genotipo clonal con estructura epidémica.
3. No existieron mutaciones vinculadas a la resistencia a sulfamidas en las muestras de *P. jirovecii* procedente de los fallecidos analizados en esta serie.
4. Las muestras conservadas en parafina durante 14 años de estudio son útiles para realizar estudios de epidemiología molecular en *P. jirovecii*, mientras se empleen iniciadores que generen fragmentos de baja talla molecular y se utilicen regiones repetitivas en el genoma del microorganismo.
5. Los pacientes cubanos que fallecen por sida con PcP en el periodo de noviembre-abril son en su mayoría masculinos, de color de la piel blanca, con edad promedio de 35 años, residente en su mayoría en la capital del país y están intensamente inmunodeprimidos.

Recomendaciones

VII. RECOMENDACIONES

1. Caracterizar genéticamente las muestras embebidas en parafina de *P. jirovecii* empleando como diana molecular la secuencia del espaciador interno de transcripción del ARN ribosómico (ITS1 e ITS2).
2. Realizar la caracterización molecular de *P. jirovecii* en diferentes muestras clínicas (lavados orales, lavados broncoalveolares, esputo, etc) en pacientes VIH/sida, así como en otros con diferentes inmunodeficiencias y en pacientes colonizados.

Referencias Bibliográficas

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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.
2. Dei-Cas E. *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Med Mycol* 2000;38(suppl 1):23-32.
3. Rodríguez Vigil E. Neumonía intersticial por *Pneumocystis carinii*. *Rev Cub Ped* 1969;41:317.
4. Razón Behar R, Cubero Menéndez O, Vásquez Ríos B, Chao Barreiro A, Gala Valiente M, Cubeñas Chala YD. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Rev Cub Med Trop* 1977;29(3):103-14.
5. Menéndez-Capote R, Millán-Marcelo JC. Infecciones y otros procesos oportunistas en un grupo de pacientes cubanos en el estadio IV de VIH. *Rev Cub Med Trop* 1992;44(1):17-9.
6. Arteaga Hernández E, Capó de Paz V, Pérez Fernández-Terán ML. Micosis oportunistas invasivas en el sida. Un estudio de 211 autopsias. *Rev Iberoam Micol* 1998;15(1):33-5.
7. Hernández Puentes YZ, Paula Piñera BM, Salinas Olivares M, Vila González W, Casa de Valle Castro M. Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. *Rev Cub Med Mil* 2010;39(2). Disponible en: www.scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572010000200013&script=sci_arttext
8. Chabé M, Vargas SL, Eyzaguirre I, Alioaut EM, Follet-Dumoulin A, Creusy C, et al. Molecular typing of *Pneumocystis jirovecii* found in formalin-fixed paraffin-embedded lung tissue sections from sudden infant death victims. *Microbiology* 2004;150(Pt 5):1167-72.
9. Chagas C. Nova tripanozomiazaea humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909;1:159-218.
10. Carini A. Formas de eschizogonia do trypanosoma lewisi. *Bol Soc Med Cir Sao Paulo* 1910;18:204.
11. 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.

12. Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrero V, Respaldiza-Salas N, de la Horra-Padilla C, et al. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist* 2002;153(3):303-10.
13. Porter A. The occurrence of *Pneumocystis carinii* in mice in England. *Parasitology* 1915;8:255.
14. Ammich O. Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumonie des ersten Kindesalters. *Virchows Arch Pathol Anat* 1938;302:539-54.
15. Benecke E. Eigenartige Bronchiolenerkrankung im ersten Lebensjahr. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1938;31:402-6.
16. Rubin E, Zak FG. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the adult. *N Engl J Med* 1960;262:1315-7.
17. Walzer PD, Perl DP, Krogstead DJ, Rawson P, Schultz MG. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. *Ann Intern Med* 1974;80(1):83-93.
18. Vavra J, Kucera K. *Pneumocystis carinii* delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J Protozool* 1970;17(3):463-83.
19. Frenkel JK. *Pneumocystis jiroveci* n.sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976;43:13-30.
20. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 1988;334(6182):519-22.
21. Stringer SL, Stringer JR, Blas MA. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosome RNA implies a clear relationship with fungi. *Exp Parasitol* 1989;68(4):450-61.
22. 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.
23. Pneumocystis Workshop. Revised nomenclature for *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 1994;41(5):121S-2S.
24. Redhead SA, Cushion M, Frenkel JK, Stringer JR. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: Nomenclature and Typifications. *J Eukaryot Microbiol* 2006;53(1):2-11.
25. Kovacs JA, Masur H. Evolving health effects of *Pneumocystis*: one hundred years of progress in diagnosis and treatment. *JAMA* 2009;301(24):2578-85.

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;104(3):419-26.
27. Matsumoto Y, Yoshida Y. Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. J Protozool 1984;31(3):420-8.
28. Bartlett MS, Verbanac PA, Smith JW. Cultivation of *Pneumocystis carinii* with WI-38 cells. J Clin Microbiol 1979;10(6):796-9.
29. Cushion MT, Ebbets D. Growth and metabolism of *Pneumocystis carinii* in axenic culture. J Clin Microbiol 1990;28(6):1385-94.
30. Mirovsky P, Fishman JA. An improved method for the prolonged maintenance of *Pneumocystis carinii* *in vitro*. J Infect Dis 1993;167(6):1470-3.
31. 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.
32. 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.
33. Wakefield AE, Stringer JR, Tamburrini E, Dei-Cas E. Genetics, metabolism and host specificity of *Pneumocystis carinii*. Med Mycol. 1998;36 (Suppl 1):183-93.
34. Kaneshiro ES. Lipid metabolism of *Pneumocystis*: toward the definition of new molecular targets. FEMS Immunol Med Microbiol 1998;22(1-2):135-43.
35. 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.
36. Kottom TJ, Köhler JR, Thomas CF Jr, Fink GR, Limper AH. Lung epithelial cells and extracellular matrix components induce expression of *Pneumocystis carinii* STE20, a gene complementing the mating and pseudohyphal growth defects of STE20 mutant yeast. Infect Immun 2003;71(11):6463-7.
37. 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.

38. 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):423.
39. Wakefield AE. Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. FEMS Immunol Med Mic.1998;22(1-2):5-13.
40. Wakefield AE. *Pneumocystis carinii*. Br Med Bull 2002;61:175-88.
41. Stringer JR, Cushion MT. The genome of *Pneumocystis carinii*. FEMS Immunol Med Microbiol 1998;22(1-2):15-26.
42. Helweg-Larsen J. *Pneumocystis jiroveci*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. Dan Med Bull 2004;51(3):251-73.
43. Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. Emerg Infect Dis 2004;10(10):1713-20.
44. Russian DA, Levine SJ. *Pneumocystis carinii pneumonia* in patients without HIV infection. Am J Med Sci 2001;321(1):56-65.
45. Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. Clin Infect Dis 2002;34(8):1098-107.
46. Cisneros JM, Muñoz P, Torre-Cisneros J, Gurgui M, Rodriguez-Hernandez MJ, Aquado JM, et al. Pneumonia after heart transplantation: a multiinstitutional study. Clin Infect Dis 1998;27(2):324-31.
47. Calderón EJ, Varela JM, Medrano FJ, Nieto V, González-Becerra C, Respaldiza N, et al. Epidemiology of *Pneumocystis carinii pneumonia* in southern Spain. Clin Microbiol Infect 2004;10(7):673-6.
48. Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano MA, et al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. Clin Microbiol Infect 2004;10(11):1029-31.
49. 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(6):855-61.
50. 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(2):376-81.

51. Jacobs JL, Libby DM, Winters RA, Gelmont DM, Fried ED, Hartman BJ, et al. A cluster of *Pneumocystis carinii pneumonia* in adults without predisposing illnesses. *N Engl J Med* 1991;324(4):246-50.
52. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *J Infect Dis* 2008;197(1):10-7.
53. Wissmann G, Morilla R, Friaiza V, Calderón E, Varela JM. Human reservoirs of *Pneumocystis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2010;28(1):38-43.
54. Calderón EJ, Friaiza V, Dapena FJ, de La Horra C. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis. *Med Mycol* 2010;48(O1):S17-S21.
55. Bartlett MS, Lee CH. Airborne spread of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis* 2010;50(3):266.
56. Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clin Infect Dis* 2010;50(3):347-53.
57. 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.
58. Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M, Virmaux M, Dei-Cas E, Hauser PM, et al. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite* 2008;15(3):359-65.
59. Keely SP, Stringer JR. Multi-locus genotype switching in *Pneumocystis carinii* sp. f. hominis: evidence for reinfection. *J Eukaryot Microbiol* 1996;43(5):50S.
60. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 2000;6(3):265-72.
61. 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(4):1192-8.
62. de Boer MG, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, 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(9):1143-9.

63. Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, Bille J, et al. 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.
64. Vargas SL, Hughes WT, Wakefield AE, Oz HS. Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. J Infect Dis 1995;172(2):506-10.
65. Ng VL, Yajko DM, Hadley WK. Extrapulmonary pneumocystosis. Clin Microbiol Rev 1997;10(3):401-18.
66. Cushion MT, Collins MS. Susceptibility of *Pneumocystis* to echinocandins in suspension and biofilm cultures. Antimicrob Agents Chemother 2011;55(10):4513-8.
67. 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.
68. 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.
69. 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.
70. Rivero L, de la Horra C, Montes-Cano MA, Rodríguez-Herrera A, Respaldiza N, Friaiza V, et al. *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. Emerg Infect Dis 2008;14(7):1116-8.
71. 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.
72. Montes-Cano MA, Chabe M, Fontillon-Alberdi M, de la Horra C, Respaldiza N, Medrano FJ, et al. Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. Emerg Infect Dis 2009;15(1):125-7.
73. 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(12):825.

74. Thomas CF Jr, Limper AH. *Pneumocystis pneumonia*. N Engl J Med 2004;350(24):2487-98.
75. 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.
76. Huang L. Clinical presentation and diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected patients. In: Walzer P, editor. *Pneumocystis pneumonia*. 3^a ed. Marcel and Dekker; 2005. p. 349-406.
77. Rodríguez 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.
78. Phair J, Muñoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A. The risk of *Pneumocystis carinii pneumonia* among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. N Engl J Med 1990;322(3):161-5.
79. Kovacs JA, Hiemenz JW, Macher AM, Stover D, Murray HW, Shelhamer J, et al. *Pneumocystis carinii pneumonia*: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. Ann Intern Med 1984;100(5):663-71.
80. Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. FEMS Immunol Med Microbiol 2005;45(3):405-10.
81. 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(7):878-84.
82. Kovacs JA, Gill VJ, Meshnick S, Masur H. New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii pneumonia*. JAMA 2001;286(19):2450-60.
83. Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, Huang L, Schuegger R, Sing A, et al. Restriction Fragment Length Polymorphism Typing Demonstrates Substantial Diversity among *Pneumocystis jirovecii* Isolates. J Infect Dis 2009;200(10):1616-22.

84. 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. *Diag Microbiol Infect Dis* 2006;54(3):69-75.
85. Hunter JA, Wakefield AE. Genetic divergence at the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene among isolates of *Pneumocystis carinii* from five mammalian host species. *J Eukaryot Microbiol* 1996;43(5):24S-25S.
86. Costa MC, Esteves F, Antunes F, Matos O. Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in immunocompromised patients: preliminary results. *J Eukaryot Microbiol* 2006;53 (Suppl 1):S104-5
87. De la Horra C, Varela JM, Fernández-Alonso J, Medrano FJ, Respaldiza N, Montes-Cano MA, et al. Association between human-*Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. *Eur J Clin Invest* 2004;34(3):229-35.
88. Fisk DT, Meshnick S, Kazanjian PH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2003;36(1):70-8.
89. Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol* 1998;36(1):90-3.
90. 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):3979-81.
91. Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, Costa MC, Calderón EJ, Antunes F, et al. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(4):356-62.
92. 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.
93. Miller RF, Evans HE, Copas AJ, Cassell JA. Climate and genotypes of *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(4):445-8.
94. Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Agarwal SK, Samantaray JC, Kumar L, et al. Genotypic variation of *Pneumocystis jirovecii* isolates in India based on sequence

- diversity at mitochondrial large subunit rRNA. *Int J Med Microbiol* 2011;301(3):267-72.
95. Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, et al. *Pneumocystis jiroveci* genotypes in the Spanish population. *Clin Infect Dis* 2004;39(1):123-8.
96. Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jiroveci*: evaluation of 9 assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;58(4):385-92.
97. Lu JJ, Chen CH, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Comparison of six different PCR methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* 1995;33(10):2785-8.
98. Tibayrenc M, Kjellberg F, Ayala FJ. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87(20):8185.
99. Smith JM, Smith NH, O'Rourke M, Spratt BG. How clonal are bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(10):4384-8.
100. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 1997;175(2):482-5.
101. de Armas Y, Capó V, González E, Mederos LM, Díaz R. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. *Rev Esp Patol* 2006;39(3):171-4.
102. Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling G, Robertson VJ, Knobloch J, et al. Evaluation of two nested PCR assays for detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human tissue. *J Clin Microbiol* 2002;40(5):1644-7.
103. Matos O, Esteves F. Epidemiology and clinical relevance of *Pneumocystis jirovecii* Frenkel, 1976 dihydropteroate synthase gene mutations. *Parasite* 2010;17(3):219-32.
104. Dini L, du Plessis M, Frean J, Fernandez V. High prevalence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from patients with *Pneumocystis pneumonia* in South Africa. *J Clin Microbiol* 2010;48(6):2016-21.

105. Le Minor O, Germani Y, Chartier L, Lan NH, Lan NT, Duc NH, et al. Predictors of pneumocystosis or tuberculosis in HIV-infected Asian patients with AFB smear-negative sputum pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008;48(5):620-7.
106. Cermeño JR, Hernández de Cuesta I, Alcalá F, Áppice M. *Pneumocystis jiroveci* en centros hospitalarios del Estado Bolívar, Venezuela. *Rev Biomed* 2006;17:169-174.
107. Powers C. Diagnosis of infectious diseases: a citopathologist's perspective. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(2):341-65.
108. Hsiao-Wei W, Cheng-Chih L, Chen-Feng K, Chang-Pan L, Chun-Ming L. Mortality predictors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients at presentation: Experience in tertiary care hospital of northern Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect* 2011;44(4):274-81.
109. Aragonés C, Sánchez L, Campos JR, Pérez J. Antiretroviral therapy adherence in persons with HIV/AIDS in Cuba. *MEDICC Rev* 2011;13(2):17-23.
110. Su YS, Lu JJ, Perng CL, Chang FY. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Microbiol Immunol Infect* 2008;41(6):478-82.
111. 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(Pt 5):1173-8.
112. Stansell JD, Osmond DH, Charlebois E, LaVange L, Wallace JM, Alexander BV, et al. Predictors of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;155(1):60-6.
113. Mahomed AG, Murray J, Klempman S, Richards G, Feldman C, Levy NT, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV infected patients from South Africa. *East Afr Med J* 1999;76(2):80-4.
114. 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(1):158-64.

115. Tellez I, Barragán M, Franco-Paredes C, Petraro P, Nelson K, Del Rio C. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in patients with AIDS in the inner city: a persistent and deadly opportunistic infection. *Am J Med Sci* 2008;335(3):192-7.
116. Dohn MN, White ML, Vigdorth EM, Buncher CR, Hertzberg VS, Baughman RP, et al. Geographic clustering of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(5):1617-21.
117. Morris AM, Swanson M, Huan H, Huang L. Geographic distribution of human immunodeficiency virus-associated *Pneumocystis carinii* Pneumonia in San Francisco. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(5):1622-6.
118. Orlovic D, Kularatne R, Ferraz V, Smego RA Jr. Dual pulmonary infection with *Mycobacterium tuberculosis* and *Pneumocystis carinii* in patients infected with human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 2001;32(2):289-94.
119. 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.
120. Wong ML, Back P, Candy G, Nelson G, Murray J. Cryptococcal pneumonia in African miners at autopsy. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007;11(5):528-33.
121. McCarthy GM. Host factors associated with HIV-related oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73(2):181-6.
122. Nittayananta W, Chungpanich S. Oral lesions in a group of Thai people with AIDS. *Oral Dis* 1997; 3(Suppl 1):S41-S45.
123. Nittayananta W, Chanowanna N, Winn T, Silpapojakul K, Rodklai A, Jaruratanasirikul S, et al. Co-existence between oral lesions and opportunistic systemic diseases among HIV-infected subjects in Thailand. *J Oral Pathol Med* 2002;31(3):163-8.
124. Varela JM, Regordán C, Medrano FJ, Respaldiza N, de La Horra C, Montes-Cano MA, et al. Climatic factors and *Pneumocystis jiroveci* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(8):770-2.
125. 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.

126. Ortíz PL, Pérez A, Rivero A, León A, Díaz M, González M, et al. Assessment of Human Health Vulnerability to Climate Variability and Change in Cuba. *MEDICC Rev* 2008;10(2):31-48.

Anexos

ANEXO 1
PUBLICACIONES DEL TEMA

- **de Armas Y**, Friaza V, Capó V, Durand-Joly I, Govín A, De La Horra C, Dei-Cas E, Calderón EJ. Low genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* among Cuban population based on two-locus mitochondrial typing. **Medical Mycology** 2012;50(4):417-20.
- **de Armas Y**, Capó V, Govín A, López LX, Friaza V, Durand-Joly I, de la Horra C, Dei-Cas E, Calderón E. Genetic characterization of *Pneumocystis jirovecii* in patients dying by AIDS, IPK, 1995-2008. **Biotecnología Aplicada**. 2012;29(3) (Aceptada)
- **de Armas Y**, Wissmann G, Müller AL, Pederiva MA, Brum MC, Brackmann RL, Capó de Paz V, Calderón EJ. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in developing countries. **Parasite**. 2011;18(3):219-28.
- **de Armas Y**, Capó Y, Govín A, Campano E, Friaza V, de la Horra C, Calderón E. Caracterización genética de *Pneumocystis jirovecii* en fallecidos cubanos por sida. **Patología** 2009;47(4):339-41.
- **de Armas Y**, Capó V, López X. Detección molecular de *Pneumocystis jirovecii* en tejido parafinado de fallecidos por VIH/sida. **Revista Cubana de Medicina Tropical** 2008;60(3).
- **de Armas Y**, Capó V, Gonzalez E, Mederos L, Díaz R. Extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina por Chelex-100. **Revista Española de Patología** 2006;39(3):171-4.

ANEXO 2
PUBLICACIONES RELACIONADAS CON EL TEMA

1. Rodriguez Y, **de Armas Y**, Capó V, Wissmann G, Goldani LZ, De Waard JH. Sudden death related to tuberculous coronary arteritis. **Int J Cardiol**. DOI:10.1016/j.ijcard.2011.08.002
2. Salazar D, Reyes T, Bandera F, Rodriguez F, Reyes A, Medina V, Waard JH, **de Armas Y**. Primera detección molecular en Cuba de *Rhodococcus equi* en paciente VIH/sida. **Rev Cub Med Trop** 2011;63(3)
3. Calderón EJ, **de Armas Y**, Capó V. *Pneumocystis jirovecii*: cien años de historia. **Rev Cub Med Trop** 2011;63(2)
4. **de Armas Y**, Capó V, López LX, Mederos L, Díaz R. Comparación de tres métodos de extracción de ADN de tejidos embebidos en parafina. **Biotechnología Aplicada** 2011;28(1):44-8.
5. **de Armas Y**, Capó V, González I, Mederos L, Díaz R, de Waard JH, Rodríguez A, García Y, Cabanas R. Concomitant *Mycobacterium avium* infection and Hodgkin's disease in a lymph node from an HIV-negative child. **Pathol Oncol Res** 2011;17(1):139-40.
6. **de Armas Y**, Capó V, Mederos L, Díaz R. Simultaneous isolates of *Mycobacterium gastri* and *Mycobacterium tuberculosis* in a patient with HIV infection. **Infect Dis Clin Pract** 2009;17(5):344-5.

ANEXO 3
EVENTOS CIENTÍFICOS:

Eventos Internacionales

1. XXV Congreso de la Sociedad Andaluza de Medicina Interna (SADEMI) 2009.
2. X Congreso Virtual de Anatomía Patológica 2009.
3. XXX Congreso de la Sociedad Española de Medicina Interna (SEMI) 2009.
4. XXVII Congreso de la Sociedad Latinoamericana de Patología (SLAP) 2009.
5. Foro de Investigadores de Sevilla 2009.
6. II Congreso de la División Cubana de la International Academy of Pathology 2011.
7. I Reunión de la Red Iberoamericana para el estudio de la Pneumocystosis. 2012

Eventos nacionales

1. Evento de los Centros Provinciales de Higiene y Epidemiología (CPHE). Ciudad de la Habana 2008.
2. XIV Exposición Forjadores del Futuro (Premios Nacional BTJ) 2009.
3. Ponencia Destacada a nivel provincial en el XVI Forum Provincial de Ciencia y Técnica 2009.
4. Ponencia Destacada a nivel provincial en el XVI Forum Provincial de Ciencia y Técnica 2009.
5. VII Evento Científico de Nacional GPSIDA 2011.

ANEXO 4 CONSENTIMIENTO INFORMADO

Información a los familiares.

Protocolo de Investigación: “Caracterización genética de muestras de *Pneumocystis jirovecii* detectadas en fragmentos de pulmón de cubanos fallecidos por sida de 1995 a 2008”.

El Ministerio de Salud Pública (MINSAP) y el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"(IPK), se proponen realizar una investigación acerca de las causas de muerte por epidemias que ocurran en el país, incluida la epidemia de VIH-sida.

Este consentimiento informado tiene 2 partes:

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

Parte I: Hoja informativa

Introducción

En el IPK ingresan pacientes con infecciones epidémicas poco usuales en nuestro medio, algunas veces traídas de otros países, y pacientes con VIH-sida. Por lo tanto, los agentes infecciosos que pueden producir la muerte a los pacientes que acuden a nuestro centro son poco usuales y no son suficientemente conocidas sus características y su biología. Por otra parte, muchos tumores asociados al VIH-sida tienen estrecha relación a infecciones virales y se ha visto que el comportamiento y la evolución de los mismos son más agresivos en estos pacientes.

Por este medio, le estamos brindando información para que con su decisión de autorizar la autopsia o necropsia de su familiar nos permita contar con la posibilidad de realizar esta investigación.

Este documento puede contener palabras que usted no comprenda. Por favor, tome su tiempo para realizar las preguntas que necesite relacionadas con el estudio antes de decidir participar.

A nosotros nos gustaría invitarlo a colaborar en este estudio, pero solo si usted comprende todo sobre el mismo.

Propósito y descripción de la investigación

El propósito de la investigación es conocer más sobre estos agentes infecciosos, sobre su epidemiología y biología para diseñar métodos de diagnóstico temprano más certeros, para establecer acciones preventivas con el fin de evitar la propagación de la enfermedad, así como, conocer la sensibilidad a los antibióticos para instaurar un mejor tratamiento. Esta investigación será útil para conocer aspectos clínicos y epidemiológicos, y permitirá diseñar estrategias apropiadas para el control de estas infecciones en la población cubana. Se utilizarán fragmentos de los órganos y (o) fluidos que se colectarán durante la autopsia para estudios investigativos microscópicos, microbiológicos y de biología molecular. Se tomarán fotografías de los hallazgos a simple vista y microscópicos para ilustrar los resultados. Siempre se protegerá la identidad del paciente.

M.Sc Yaxsier de Armas Rodríguez

Participación voluntaria

La decisión del familiar de autorizar la realización de la autopsia es enteramente voluntaria. Es su elección decidir autorizar o no.

Procedimientos

A cada familiar se le entregará esta información y la planilla de consentimiento informado para su firma. Una vez autorizada la necropsia completa esta se realizará en el propio IPK en el horario comprendido entre 8 de la mañana a 10 de la noche del día del fallecimiento. Si ocurriera el fallecimiento después de las 10 de la noche es necesario esperar a las 8 de la mañana para su realización.

Riesgos e incomodidades

El presente estudio no ocasiona riesgos para usted pero puede sentirse incómodo al tomar la decisión. No deseamos que esto ocurra. Piense, sin embargo que está tomando una decisión que permitirá ayudar a otros pacientes en el futuro.

Beneficios

Los beneficios serán para otros pacientes que presenten la misma infección que presentó su familiar. Para los próximos pacientes contaremos con más información y redundará en beneficios para él.

Incentivos

Usted no recibirá ninguna remuneración financiera por formar parte de la investigación.

Confidencialidad

La investigación será hecha en el IPK. Nosotros no compartiremos los resultados fuera del equipo de investigación. La información de tipo personal individual que nosotros colectemos de este proyecto e investigación será conservada en privado y nadie tendrá acceso a ella excepto los investigadores.

Resultados compartidos

El conocimiento que nosotros obtengamos de esta investigación será compartido con usted si así lo desea. Después de reuniones entre los investigadores los resultados serán divulgados para que otras personas interesadas puedan aprender de la investigación siempre preservando la identidad del paciente.

Derechos a no participar o retirarse

Usted puede determinar que no desea autorizar la autopsia a su familiar. Esto no lo afectará a usted de ninguna forma.

A quien contactar

Si usted desea hacer alguna pregunta puede hacerla ahora o después. Si usted quisiera hacerla más tarde usted puede contactar a la Dra. Virginia Capó del IPK, Teléfono: 202 0420 al 40.

Parte II: Consentimiento Informado

Yo confirmo que he sido informado (a) sobre el objetivo del estudio, que he recibido la información necesaria sobre la misma así como la importancia de los resultados de la investigación para la adopción de medidas que conduzcan a un mejor control de las enfermedades infecciosas, y una copia del consentimiento informado, el cual he leído y he comprendido el propósito de este estudio. Yo he tenido la oportunidad de realizar preguntas y he recibido respuestas satisfactorias para mí. Yo he consentido voluntariamente en autorizar el estudio y he comprendido que tengo el derecho de decidir no autorizar la autopsia de mi familiar, sin que esto tenga ninguna implicación para mí.

Nombre de la persona entrevistada Firma Fecha (día/mes/año)

Nombre del familiar allegado Firma Fecha (día/mes/año)

Nombre de la madre, padre, tutor
(En caso de menores) Firma Fecha (día/mes/año)

Testigo

He sido testigo de la lectura del consentimiento informado al participante y el individuo ha tenido la oportunidad de realizar preguntas. Yo confirmo que el individuo ha tenido la posibilidad de brindar su consentimiento libremente.

Nombre del testigo Firma Fecha (día/mes/año)