

00544



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

5

FACULTAD DE QUIMICA  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

28

**FRECUENCIA DE Pneumocystis carinii EN NIÑOS  
INMUNOCOMPROMETIDOS HOSPITALIZADOS EN  
EL INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRIA**

**T E S I S**

**QUE PRESENTA:**

**Q.F.B. ALIRIA ROMANO OSUNA**

**PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALISTA EN**

**BIOQUIMICA CLINICA**



**MEXICO, D. F., JUNIO DE 1995**



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE GENERAL

<b>CAPITULO 1.</b>	<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO 2.</b>	<b>GENERALIDADES</b>	<b>3</b>
	2.1. Antecedentes	3
	2.2. Taxonomía	4
	2.3. Genética Molecular	4
	2.4. Morfología y composición celular	6
	2.5. Ciclo de vida	7
	2.6. Inmunofisiopatología	9
	2.7. Manifestaciones clínicas	12
	2.8. Epidemiología	14
	2.9. Diagnóstico	15
<b>CAPITULO 3.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>19</b>
	3.1. Objetivo general	19
	3.2. Objetivos específicos	19
	<b>MATERIAL Y METODOS</b>	<b>20</b>
	3.3. Criterios de inclusión	20
	3.4. Criterios de exclusión	20
	3.5. Muestras	23
	3.6. Procesamiento de muestras	23
	3.7. Tinciones	23
	3.7.1. Tinción de Azul de Toluidina-O modificada	24
	3.7.2. Tinción de Nitrato de Plata-Metenamina	26
	3.7.3. Tinción de Giemsa	29
<b>CAPITULO 4.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION</b>	<b>30</b>
<b>CAPITULO 5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>42</b>
<b>CAPITULO 6.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>45</b>

## INDICE DE FIGURAS

FIG. 1.	Frecuencia de <i>Pneumocystis carinii</i> en los niños estudiados.	33
FIG. 2.	Frecuencia por sexo.	34
FIG. 3.	Frecuencia por grupos de edad.	35
FIG. 4.	Servicios del I.N.P. de procedencia de los niños estudiados.	36
FIG. 5.	Padecimientos iniciales.	37
FIG. 6.	Métodos de obtención de muestra.	38
FIG. 7.	Quistes aislados de <i>P. carinii</i> teñidos con azul de toluidina-O.	39
FIG. 8.	<i>P. carinii</i> teñido con azul de toluidina-O, diferentes tamaños y formas.	39
FIG. 9.	<i>P. carinii</i> teñido con metenamina-plata.	40
FIG. 10.	<i>Candida</i> teñida con metenamina-plata.	40
FIG. 11.	Célula bronquial ciliada. Tinción de Giemsa.	41
FIG. 12.	Polimorfonucleares. Tinción de Giemsa.	41

**Este trabajo fue realizado bajo la asesoría del Dr.  
Rubén Álvarez Chacón en el Laboratorio de  
Parasitología del Instituto Nacional de Pediatría.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Rubén Álvarez Chacón por su invaluable apoyo en la realización de este trabajo y por brindarme la oportunidad de compartir su gran calidad humana.**

**A Carmelita y Silvia por su orientación e inestimables consejos de dos grandes amigas.**

**A todos los colaboradores del Laboratorio de Investigación de Parasitología del Hospital de Pediatría Centro Médico S. XXI por su cooperación y entusiasmo.**

**A mis maestros de la Especialidad en Bioquímica Clínica por haber entregado sus conocimientos sin límites.**

**A mis compañeros de la Especialidad en Bioquímica Clínica: Rosy, Laura, Gloria, Elsa, Lupita, Mónica, Marisela, Olga, Ricardo y Julio por haber compartido grandes momentos en esta etapa de mi vida.**

**A todas las personas que me brindaron su tiempo, ayuda y palabras de aliento para que esta tesis fuera llevada a cabo.**

## **DEDICATORIA**

### **A mis padres:**

**A quienes les debo la vida, el apoyo y la comprensión incondicional que me han dado la fortaleza necesaria para poder hoy llegar hasta aquí, ya que sin ellos a mi lado este logro mas no hubiera sido posible.**

## CAPITULO 1.

### INTRODUCCION

El número de pacientes con inmunidad celular alterada ha aumentado en forma notable en los últimos años, principalmente como el resultado de la epidemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Por lo tanto el número de complicaciones infecciosas secundarias en estos pacientes también ha aumentado significativamente.

Desde 1979, cuando se reconoció por primera vez el SIDA, el número de personas infectadas ha aumentado exponencialmente; más de 500,000 casos se reportaron a nivel mundial durante los 9 años subsecuentes (1).

La enfermedad hoy en día representa la pandemia más grave de los últimos 70 años y puede ser comparable a las eras de la poliomielitis, tuberculosis, sífilis y viruela (2). Se estima que por lo menos 8 millones de personas se encuentran infectadas mundialmente con el virus y que, para el año 2000, la enfermedad se desarrollará en 8 millones más (2).

De cierta manera, las infecciones en el hospedero inmunocomprometido se inician con la entrada de organismos microbianos a las superficies de la piel o mucosas. El tipo y grado de infección están influenciados por el número, virulencia y tropismo del agente infeccioso, así como también por la capacidad de la respuesta inmune del hospedero, tanto en el momento de la entrada como cuando se disemina.

Aunque las superficies de piel y mucosas del tracto alimenticio ofrecen grandes superficies de adherencia y colonización para los organismos oportunistas, los pulmones exhiben la superficie más grande del cuerpo expuesta a agentes ambientales (1). La superficie total pulmonar, está estimada en 200 metros cuadrados. Considerando la cantidad de hongos, virus y bacterias en el aire, entonces se puede comprender por que los pacientes con resistencia deteriorada, están expuestos a infecciones pulmonares graves.

El SIDA por sí mismo es fatal, y hasta el presente no existe tratamiento alguno. Aunque el lapso entre la infección inicial por el virus y las manifestaciones clínicas puede ser de 10-12 años o tal vez más largo, la edad promedio de sobrevivencia en la infancia es de 6 meses y para niños mayores es de 20 meses. La inmunodeficiencia es progresiva y la enfermedad pulmonar es la causa principal de muerte (1,3).



Actualmente, la neumonía por ***Pneumocystis carinii*** que anteriormente se consideraba poco frecuente en humanos, es la infección oportunista más común en los pacientes con SIDA, presentándose del 50 al 85% de los casos, proporcionando así una relación de morbilidad y mortalidad grande en estos individuos (4).

Para el diagnóstico es indispensable la identificación morfológica de ***P. carinii*** en material pulmonar y ha sido clave para garantizar una terapia adecuada y oportuna en pacientes críticamente enfermos (5).

## CAPITULO 2.

### GENERALIDADES

#### 2.1. ANTECEDENTES

*Pneumocystis carinii* fue descrito por primera vez por Chagas en 1909 y después por Carinii en 1910, en animales infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi* atribuyéndolo así a formas correspondientes al ciclo biológico de este flagelado (6). No fue sino hasta 1912, cuando Delanoé y Delanoé (7) lo estudiaron en cortes histológicos de pulmones procedentes de diferentes roedores y reportaron que, las formas observadas anteriormente por Chagas representaban una especie nueva y diferente y sugirieron nombrar a este organismo *Pneumocystis carinii*.

Según Dutz (7), las primeras epidemias se iniciaron en Europa central en 1940. La primera correlación entre *P. carinii* y neumonía intersticial, fue establecida en 1952 por Vaneck y Jiroveck (8) y un año después por estos mismos autores y Luke, lo identificaron en 16 casos de niños que habían fallecido con este padecimiento.

*P. carinii* fue reconocido por primera vez como patógeno humano causante de la neumonía celular plasmática, en niños desnutridos y en niños de orfanatorios europeos al final de la II Guerra Mundial (6). Se observaron casos esporádicos de neumonía por *Pneumocystis*, en niños que presentaban deficiencias inmunológicas y se reportaron grupos de casos de neumonía por *Pneumocystis* en aquellos individuos que recibían terapéutica inmunosupresora por enfermedades malignas y en receptores de órganos transplantados (9,10).

Durante los años subsecuentes, la enfermedad fue reportada en la mayoría de los países europeos así como también en Sur América, África, Nueva Guinea, Israel, Irán, Japón, Rusia, Congo y a partir de 1956 en el continente americano (7).

Con el descubrimiento de trimetoprim-sulfametoxazol como profiláctico a mediados de 1970, el problema de neumonía por *P. carinii* disminuyó considerablemente (6), sin embargo el interés por este patógeno se ha despertado nuevamente, debido a su elevada presencia en pacientes con SIDA (10). Aunque *P. carinii* es hoy en día un problema médico mayor, poco se sabe sobre el organismo y de su interacción normal y patológica con hospederos mamíferos (6).

## 2.2. TAXONOMIA

La taxonomía de ***P. carinii*** es controversial. La posición taxonómica de ***P. carinii*** dentro de los eucariotes no está bien esclarecida, y durante años las investigaciones han apoyado la idea de que ***P. carinii*** corresponde tanto a los protozoos como a los hongos (11).

***P. carinii*** ha sido refractario al cultivo y esto ha limitado la adaptación de técnicas bioquímicas y genéticas (12). Antes de 1988, los esfuerzos para clasificar a ***P. carinii*** dentro de los protozoos se basaban principalmente en la morfología, ultraestructura, requerimientos de crecimiento y en la sensibilidad o resistencia a los agentes quimioterapéuticos (12). Las infecciones por ***Pneumocystis carinii*** responden a las drogas antiprotozoarias incluyendo al trimetoprim sulfametoxazol y la pentamidina y no a las drogas antimicóticas (11).

Se ha demostrado que ***P. carinii*** comparte ciertas características con los hongos como son propiedades de tinción, un componente de la pared quística (B-1,3-glucano), el cual es el principal componente químico de la pared de los hongos y la quitina que es exclusivamente de los hongos. Esta se ha demostrado tanto en el quiste como en el trofozoito. Otra característica que ***P. carinii*** comparte con los hongos es el proceso meiótico de los ascomicetos (6).

Tres grupos de investigadores descubrieron que la secuencia de RNA ribosomal de ***P. carinii***, era más parecida a la de los hongos que a la de los protozoos. Durante los tres últimos años se han acumulado datos que apoyan la idea de que ***Pneumocystis*** es un hongo. Sin embargo, establecen claramente que este hongo no es el típico hongo comúnmente aislado y estudiado en el laboratorio clínico (13).

## 2.3. GENETICA MOLECULAR

La consecuencia de una clonación molecular de 3 genes de ***P. carinii*** para timidilato sintetasa, dihidrofolato reductasa y una ATPasa de translocación catiónica de tipo-P, originó la información que ha apoyado la idea de que ***P. carinii*** es un hongo (12).

Se encontró que ambos genes de ***P. carinii*** para timidilato sintetasa y dihidrofolato reductasa, codificaban cadenas polipeptídicas que eran más parecidas a las proteínas correspondientes a ***Saccharomyces cerevisiae*** que a las proteínas no micóticas. También se observó que la dihidrofolato reductasa de ***Pneumocystis carinii***, contiene 206 residuos en su secuencia de aminoácidos y al igual que la enzima de ***Saccharomyces cerevisiae***, es un poco mayor que las enzimas de mamíferos y bacterias. Ambos genes de ***P. carinii*** poseen pequeños intrones que característicamente se encuentran presentes en otros genes micóticos.

En ***Pneumocystis carinii***, los genes para la timidilato sintetasa y la dihidrofolato reductasa, no se encuentran ligados sino que residen en diferentes cromosomas. Esto se contrapone con la condición observada en los protozoos parásitos como en el caso de ***Leishmania*** y ***Plasmodium***, los cuales agrupan estas dos actividades enzimáticas en un sólo péptido codificado por un sólo gen. La conservación de esta proteína bifuncional en estos dos protozoos es asombrosa, ya que ***Leishmania*** y ***Plasmodium*** no son parientes cercanos. Mientras no exista evidencia de que los protozoos no puedan codificar timidilato sintetasa y dihidrofolato reductasa monofuncional, la presencia de estos genes monofuncionales en ***Pneumocystis carinii*** apoyan el argumento de que ***P. carinii*** es un hongo (12).

Las ATPasas catiónicas de tipo-P, son enzimas que sirven para bombear cationes a través de las membranas celulares. Los genes que codifican para este tipo de ATPasas se encuentran en varios eucariotes como también en procariotes específicos. Todas las ATPasas de tipo-P comparten ciertas características estructurales, pero las ATPasas micóticas bombeadoras de protones, parecen compartir un dominio no contemplado en otras ATPasas tipo-P. Un gen de ATPasa tipo-P, aislado de ***Pneumocystis carinii*** presentó en su contenido este dominio micótico bombeador de protones.

Si ***Pneumocystis carinii*** es un hongo, ¿qué se puede entonces decir sobre su situación dentro de ese reino? En estos momentos la información genética parece ser paradójica, porque los análisis de la secuencia del rRNA 16-s sugieren que ***Pneumocystis carinii*** no es un ascomiceto sino que es más parecido a los Rhizopoda, Mixomicota y Zigomicota (12).

La relación entre cepas de ***P. carinii*** tampoco son muy claras. Frenkel sugirió que las cepas provenientes de ratas deberían denominarse ***P. carinii*** y aquellas provenientes de humanos, ***P. jiroveci***. Recientemente, Hughes y Gigliotti han sugerido que a ***Pneumocystis carinii*** se le identificara con la especie del animal (p.ej. ***P. carinii Rattus*** siendo esta la especie de las ratas y ***P. carinii Humanus*** la especie de humanos) (6).

Se encontró que ambos genes de ***P. carinii*** para timidilato sintetasa y dihidrofolato reductasa, codificaban cadenas polipeptídicas que eran más parecidas a las proteínas correspondientes a ***Saccharomyces cerevisiae*** que a las proteínas no micóticas. También se observó que la dihidrofolato reductasa de ***Pneumocystis carinii***, contiene 206 residuos en su secuencia de aminoácidos y al igual que la enzima de ***Saccharomyces cerevisiae***, es un poco mayor que las enzimas de mamíferos y bacterias. Ambos genes de ***P. carinii*** poseen pequeños intrones que característicamente se encuentran presentes en otros genes micóticos.

En ***Pneumocystis carinii***, los genes para la timidilato sintetasa y la dihidrofolato reductasa, no se encuentran ligados sino que residen en diferentes cromosomas. Esto se contrapone con la condición observada en los protozoos parásitos como en el caso de ***Leishmania*** y ***Plasmodium***, los cuales agrupan estas dos actividades enzimáticas en un sólo péptido codificado por un sólo gen. La conservación de esta proteína bifuncional en estos dos protozoos es asombrosa, ya que ***Leishmania*** y ***Plasmodium*** no son parientes cercanos. Mientras no exista evidencia de que los protozoos no puedan codificar timidilato sintetasa y dihidrofolato reductasa monofuncional, la presencia de estos genes monofuncionales en ***Pneumocystis carinii*** apoyan el argumento de que ***P. carinii*** es un hongo (12).

Las ATPasas catiónicas de tipo-P, son enzimas que sirven para bombear cationes a través de las membranas celulares. Los genes que codifican para este tipo de ATPasas se encuentran en varios eucariotes como también en procaríotes específicos. Todas las ATPasas de tipo-P comparten ciertas características estructurales, pero las ATPasas micóticas bombeadoras de protones, parecen compartir un dominio no contemplado en otras ATPasas tipo-P. Un gen de ATPasa tipo-P, aislado de ***Pneumocystis carinii*** presentó en su contenido este dominio micótico bombeador de protones.

Si ***Pneumocystis carinii*** es un hongo, ¿qué se puede entonces decir sobre su situación dentro de ese reino? En estos momentos la información genética parece ser paradójica, porque los análisis de la secuencia del RNAr 16-s sugieren que ***Pneumocystis carinii*** no es un ascomiceto sino que es más parecido a los Rhizopoda, Mixomicota y Zigomicota (12).

La relación entre cepas de ***P. carinii*** tampoco son muy claras. Frenkel sugirió que las cepas provenientes de ratas deberían denominarse ***P. carinii*** y aquellas provenientes de humanos, ***P. jiroveci***. Recientemente, Hughes y Gigliotti han sugerido que a ***Pneumocystis carinii*** se le identificara con la especie del animal (p.ej. ***P. carinii Rattus*** siendo esta la especie de las ratas y ***P. carinii Humanus*** la especie de humanos) (6).

Investigaciones actuales sugieren que existen diferencias significativas tanto antigénicas como genéticas entre *Pneumocystis carinii* aislado de diferentes especies animales, y que es difícil que *P. carinii* de una especie animal cause enfermedad en otra especie. Además de la escasez de información sobre el efecto de *P. carinii* en diferentes especies animales, poco se conoce acerca de la variación de cepas que infectan una determinada especie animal. ¿Serán las cepas que infectan a personas en Suecia las mismas capaces de infectar a personas en México o Estados Unidos? Aunque actualmente existe información que sugiere que pueden encontrarse diferencias entre cepas, no es posible hacer una confirmación hasta que se desarrollen técnicas más refinadas (6).

A estas alturas aún no es posible resolver esta paradoja, pero cualquiera que sea su nicho apropiado dentro del reino micótico, la información de genética molecular sugiere que posiblemente existan numerosas variedades de *Pneumocystis* en la naturaleza (12).

#### 2.4. MORFOLOGIA Y COMPOSICION CELULAR

Se han descrito tres formas de desarrollo de este organismo: 1) forma C (quiste); 2) esporozoíto; 3) trofozoíto.

La forma C corresponde a los quistes con pared celular gruesa y compacta; su tamaño varía entre 4 y 6 micras de diámetro, adoptando una apariencia oval, en copa o en luna creciente. La pared del quiste es gruesa comparada con la del trofozoíto que es rala. El espesor varía de 0.05 a 0.36 micras y es posible distinguir tres capas (14).

El quiste se considera la unidad básica del diagnóstico. Se encuentra en acúmulos dentro de los alveolos conteniendo en su interior ocho o más cuerpos intraquísticos (esporozoítos). Dentro del quiste pueden observarse un par de estructuras de aproximadamente una micra de largo que adoptan una imagen opuesta de comas o paréntesis. No se conoce la relación de estos elementos con los cuerpos intraquísticos; tal parece que forman parte de las porciones internas del grosor de la pared. La apariencia típica de *P. carinii* de panal de abejas a nivel intraalveolar es producto de la colección de exudado inflamatorio y la interconexión en diferentes puntos de las formaciones quísticas para formar un arreglo hexagonal (15,16).

Los cuerpos intraquísticos o esporozoítos en número de ocho por quiste miden de 1.0 a 1.5 micras de diámetro y están incluidos dentro de una doble membrana. Cada unidad contiene retículo endoplásmico, ribosomas, núcleo, microtúbulos y mitocondrias. Se cree que los cuerpos liberados dan lugar a la forma de trofozoíto (7).

El trofozoito es la forma extraquistica. Su diámetro varía de 1 a 5 micras y está rodeado de una doble membrana. Contiene vacuolas, gránulos de glucógeno, ribosomas, mitocondrias, un núcleo con una membrana definida y con tendencia a localizarse en la periferia. Se encuentran en agrupaciones en el lumen alveolar. La movilidad no se ha observado directamente pero varios investigadores han reportado vesículas membranosas o extensiones tubulares que se originan de la membrana exterior (10).

La cubierta celular del quiste tiene una membrana plasmática con carbohidratos, proteínas y lípidos. La pared quística y el beta-1,3-glucano son susceptibles a la zimolasa, lo que sugiere la presencia de beta-1,3 glucanos en la pared quística (12). Se han utilizado lectinas fluorescentes para detectar azúcares en la superficie de los quistes. Se verificaron los estudios de lectinas ligantes, en organismos obtenidos directamente de pulmón de ratas, por medio de un análisis de cromatografía de gas del material liberado por los quistes por un tratamiento de zimolasa. Se encontró que la glucosa era el principal componente, mientras que la manosa y la galactosa estaban presentes en cantidades equivalentes y la N-acetilglucosamina en menor cantidad. A diferencia de los estudios elaborados en organismos obtenidos de humanos por medio de cromatografía líquida de alta resolución, que detectaron la presencia de manosa, glucosa, galactosa y glucosamina en concentraciones equimolares, los organismos procedentes de rata contenían mayores concentraciones de glucosa y manosa que de los otros azúcares.

El análisis lipídico de organismos enteros y del material celular de pared, identificó al palmitato como el ácido graso más abundante. Fue sorprendente la ausencia del ergosterol y la presencia de colesterol como el principal esteroide del organismo. La ausencia de ergosterol puede explicar la resistencia que presenta el parásito a la anfotericina B. Las proteínas son un principal componente de la superficie del organismo y su caracterización es actualmente el enfoque de investigación en varios laboratorios (12).

## 2.5. CICLO DE VIDA

Debido a que no existe un sistema de cultivo, el ciclo de vida permanece apoyado en una serie de conjeturas con la ayuda de la interpretación de imágenes obtenidas por técnicas microscópicas (17,18).

El ciclo de vida de *Pneumocystis carinii* fue descrito por primera vez por Carinii y Maciel en 1916. Ellos postularon que los ocho cuerpos intraquisticos escapaban del quiste, convirtiéndose cada uno en un nuevo quiste (11).

Vaneck, Jiroveck y Campbell descubrieron en 1952 por microscopía de luz y en 1972 por microscopía electrónica, respectivamente que, el trofozoíto se divide por fisión binaria. Hasta la fecha, la descripción original hecha por Carinii y Maciel con respecto al ciclo de vida del organismo presenta pocos cambios (11).

En 1970 Vavra y Kucera presentaron unas observaciones muy detalladas de **Pneumocystis carinii** por microscopía electrónica e hicieron énfasis en que **Pneumocystis** no tiene afinidades ultraestructurales de protozoos sino de hongos y que el proceso de formación de cuerpos intraquísticos en el quiste es similar a la formación de ascosporas dentro de un saco. Sus numerosas fotografías demostraron división, gemación y posible conjugación (19). Vossen y sus colegas propusieron anexos al ciclo de **P. carinii**, por el hallazgo de células hijas (19).

Recientemente, Matsumoto y Yoshida describieron un nuevo ciclo de vida para **P. carinii**, que incluye una forma sexual de multiplicación adicionada a la forma asexual de multiplicación ya conocida. Esta hipótesis se basó en el descubrimiento por microscopía electrónica de complejos sinaptonémicos en el estadio temprano de prequiste del organismo. Como es conocido, el complejo sinaptonémico es la estructura que conduce el alineamiento preciso de los cromosomas homólogos. Esta estructura solo es visible durante la profase de la primera división meiótica. Los complejos sinaptonémicos se han observado en eucariotes desde humanos hasta protistas, y han sido utilizados como indicadores de que existe meiosis (como evidencia de un ciclo sexual) (11).

En seguida se propone un ciclo de vida para **Pneumocystis carinii**, incorporando toda la información disponible hasta la fecha. Los quistes maduros se rompen para dejar en libertad los cuerpos intraquísticos que se transforman en trofozoitos haploides y que luego se transforman en trofozoitos diploides por copulación. Estos entran a la fase de formación quística del ciclo, donde aparecerá el complejo sinaptonémico en la profase del estadio temprano del prequiste.

En seguida, el núcleo diploide se divide sucesivamente por una primera y segunda meiosis para formar cuatro núcleos haploides. Luego se lleva a cabo una mitosis pos-meiótica para producir ocho núcleos. La formación de los ocho cuerpos intraquísticos se completa con la agrupación de cada uno de estos núcleos haploides dentro de su propia membrana plasmática.

Además del ciclo sexual de formación quística, la propagación se puede llevar a cabo por medio de fisión binaria o por endodigenia de ambos trofozoitos tanto haploides como diploides (11).



Aunque las técnicas empleadas por microscopía electrónica han proporcionado información importante sobre Pneumocystis carinii, aun queda mucho por descubrir y aprender (15).

## 2.6. INMUNOFISIOPATOLOGIA

Normalmente, el 70% de los linfocitos circulantes son células-T derivadas del timo, las cuales otorgan la inmunidad celular mediada, mientras que del 10% al 15% de los linfocitos circulantes son células-B derivadas, responsables de la inmunidad humoral. Del 15% al 20% restante son células asesinas (KC) y células asesinas naturales que juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de citotoxicidad celular.

Los linfocitos-T maduran a células cooperadoras, supresoras, inductoras y células citotóxicas, y las cooperadoras y supresoras regulan la diferenciación de linfocitos-B y la proliferación y citotoxicidad de linfocitos-T. Los linfocitos T cooperadores facilitan la maduración de linfocitos B y la síntesis de inmunoglobulinas específicas. Los linfocitos-T supresores inhiben esta diferenciación y también inhiben la función de linfocitos-T cooperadores. Como resultado de cantidades deficientes y de la función de linfocitos-T cooperadores en la infección por SIDA, la inmunidad celular mediada es defectuosa y la síntesis de inmunoglobulinas está alterada. Además, la citotoxicidad mediada por linfocitos T8 y células asesinas naturales está deteriorada, dando como resultado una citotoxicidad defectuosa contra células infectadas por virus (1).

Conforme maduran los precursores de células-T, van adquiriendo marcadores de superficie o antígenos de diferenciación, que caracterizan específicamente a estas células. Un subgrupo de células-T tienen el antígeno CD4 y está compuesto principalmente de células cooperadoras, y en menor grado, de células inductoras, supresoras y citotóxicas. Otro subgrupo de células-T tiene el antígeno CD8 y está compuesto principalmente de supresoras, aunque también puede tener inductoras. Normalmente el 60% de los linfocitos-T son células T4 y el 30% son células T8; por lo tanto el cociente T4 / T8 es de 2.0 en sangre periférica. En la infección por SIDA, como consecuencia de una reducción selectiva en el número de células T4, el cociente T4 / T8 se invierte a un valor menor de 1.0.

Una deficiencia en la quimiotaxis monocítica, citotoxicidad y secreción de interleucina-1 (IL-1) también se presenta en la infección por SIDA. Normalmente, la IL-1 induce la secreción de otra linfocina, interleucina-2 (IL-2), de los linfocitos T4. Esta interleucina es un factor de crecimiento que regula la proliferación cooperadora y supresora de linfocitos-T; la producción de interferón, y la activación de células naturales asesinas. Una deficiencia en la secreción de IL-2 en

el SIDA hasta ahora ha dado como resultado un número disminuido de células T4 y una reducción de células naturales asesinas. Esto predispone a infecciones por **Pneumocystis carinii**, **Citomegalovirus**, **Mycobacterias**, **Cryptococcus neoformans** y **Toxoplasma gondii**, para los cuales una resistencia adecuada por parte del huésped requiere de una función monocítica apropiada (1).

De cierta manera, las infecciones en el huésped inmunocomprometido se inician con la entrada de organismos microbianos a las superficies de la piel o mucosas. El tipo y grado de infección están influenciados por el número, virulencia y tropismo del organismo, como también por la capacidad de la respuesta inmune del huésped, tanto en la entrada como sistémicamente.

Las causas más frecuentes de neumonitis en el paciente inmunocomprometido se enlistan en la tabla siguiente.

TABLA 1.- CAUSAS DE NEUMONIA EN EL PACIENTE INMUNODEPRIMIDO (2)

**MENOS FRECUENTE:**

*Toxoplasma gondii*  
*Cryptosporidium*  
*Virus de Epstein-Baar*  
*Virus de Herpes-Simplex*  
*Virus sincitial respiratorio*  
*Adenovirus*  
*Legionella pneumophila*  
*Pseudomonas aeruginosa*  
*Escherichia coli*  
*Klebsiella pneumoniae*  
Especies de *Nocardia*  
*Cryptococcus neoformans*

**MAS FRECUENTE:**

*Pneumocystis carinii*  
*Citomegalovirus*  
*Virus de Varicela-Zoster*  
Especies de *Candida*  
Especies de *Aspergillus*

Aunque se han reportado casos de pacientes que han desarrollado neumonía por ***Pneumocystis carinii*** (NPC) con hipogammaglobulinemia, estos pacientes han sido niños menores de un año. Estos niños pueden tener función celular-T anormal debido a su corta edad. Además, esta inmadurez funcional de las células-T puede agravarse por desnutrición, la cual ha sido incluida en varios de los casos reportados de NPC infantil. Hasta aquí y como lo indica la literatura en inmunodeficiencias congénitas, la función linfocítica-T es evidentemente importante en la respuesta del huésped en la NPC.

En cuanto a terapia inmunosupresiva, los agentes más frecuentemente asociados con el desarrollo de NPC son la ciclosporina y los corticosteroides. La quimioterapia antineoplásica juega un papel menos importante en la predisposición de pacientes a neumonía por ***Pneumocystis***. Mientras que los corticosteroides tienen efectos múltiples en el sistema inmune, interfiriendo tanto con la función de células-T como con los neutrófilos, la ciclosporina es bastante selectiva con los linfocitos-T. Clínicamente, en realidad, la ciclosporina es un inmunosupresor mucho más potente de células-T que los corticosteroides, por ejemplo, se ha observado que, los receptores de trasplante renal que reciben terapia inmunosupresiva con ciclosporina A, son tres veces más propensos a desarrollar NPC que aquellos que reciben azatioprim y corticosteroides. Tal evidencia, consolida la idea tanto en los modelos animales como la literatura de inmunodeficiencia humana de que la respuesta de célula-T juega un papel clave en la defensa del huésped contra infección por ***P. carinii*** (2).

Las neoplasias malignas frecuentemente asociadas con NPC son leucemia linfocítica aguda de la niñez y leucemia humana asociada a virus linfotrópico de células-T. En ambos casos existe asociación directa con serias alteraciones en la función linfocítica-T.

De los síndromes de inmunodeficiencia de adultos, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida está relacionado con la incidencia más alta de NPC. Por lo menos el 80% de estos pacientes presentan uno o más episodios de NPC durante su enfermedad.

Si se examinan los sistemas inmunes de pacientes con SIDA que han presentado NPC, es evidente que dichos pacientes se encuentran en el curso tardío de la enfermedad porque generalmente tienen una cuenta celular de CD4 menor que 250 / mm<sup>3</sup>. En realidad, los pacientes infectados con SIDA no parecen ser comúnmente susceptibles a NPC hasta que su cuenta CD4 disminuye de 200-300 células / mm<sup>3</sup>. No hay otro marcador de función inmunológica, incluyendo niveles de inmunoglobulinas, actividad de células asesinas naturales (NK), o actividad citotóxica de células-T que hayan demostrado mantener esta misma relación reproducible en el desarrollo de neumonía por ***P. carinii***. El hecho de que los pacientes raramente desarrollen la enfermedad hasta que su cuenta periférica de CD4 descienda a menos de 200 cel / mm<sup>3</sup> es tan asombroso que muchos médicos utilizan la cuenta celular para auxiliarse en decidir el momento de administrar profilaxis

en NPC o para ayudarse en el diagnóstico diferencial de enfermedad pulmonar en el paciente infectado con SIDA (2).

Hasta ahora, el desarrollo de neumonía por *P. carinii* se relaciona más frecuentemente con defectos en la rama de células-T de la respuesta inmune. Estos defectos pueden ser resultado de la ausencia congénita de células-T (como en pacientes con enfermedad severa de inmunodeficiencia combinada); la manipulación farmacológica de células-T (como las asociadas con tratamiento con ciclosporina o corticosteroides); o la destrucción adquirida de células-T (como las asociadas con la enfermedad del virus de inmunodeficiencia humana).

El elemento más crítico del sistema inmune en la defensa del huésped en la NPC es la cuenta CD4 de células-T, y la deficiencia decisiva ocurre una vez que el número total de estas células desciende a menos de 200-250 / mm<sup>3</sup> (1).

## 2.7. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

No existe un cuadro clínico que sea característico de NPC. No obstante, este cuadro puede estar enmascarado por otra infección concomitante por otro patógeno oportunista, o bien, por una complicación del proceso de base, de tal manera que el reconocimiento de *P. carinii* requiere un alto índice de sospecha por el clínico.

La enfermedad no debe ser considerada como una etapa final de un proceso subyacente, ya que se presenta cuando hay cierto grado de respuesta y mejoría en la respuesta inmune celular y humoral; por ello debe tomarse como un posible riesgo cuando el proceso de base se ha controlado o curado y, sobre todo, que su diagnóstico requiera de un tratamiento potencial (10).

**1) Cuadro clínico de la neumonía intersticial de células plasmáticas.** Este cuadro clínico es lento e insidioso y nada específico como para hacer pensar en el inicio de neumonía; el paciente está inquieto, hiporéxico y ocasionalmente en el cuadro domina la presencia de diarrea. Una o dos semanas después se inicia cierto grado de dificultad respiratoria, observándose disnea, taquipnea, cianosis, tos productiva con escaso moco y curso afebril, estas manifestaciones duran de una a cuatro semanas; al final de ese lapso el paciente tiene un aumento importante de la disnea y taquipnea, tirios intercostales, aleteo nasal y febrícula. La exploración pulmonar es negativa, o bien, hay evidencia de algunos estertores finos de despegamiento; en cambio, la imagen radiológica muestra un infiltrado intersticial peribronquial y vascular parahiliar bilateral, algunas zonas hiperlúcidas

periféricas y otras de tipo microatelectásico, semejante a lo observado en la membrana hialina. Este cuadro es prioritario en pacientes entre 2 y 6 meses de edad y ocasionalmente se observa en adultos seniles. La evolución total del cuadro varía de 4 a 6 semanas y por lo menos el 50 por ciento de los pacientes fallecen.

**2) Neumonía hipóérgica hipoinmune.** Las características clínicas son muy variadas; es posible que sea tan lento e insidioso que dure semanas o meses con muy pocas manifestaciones. La mayoría de estos pacientes son objeto de manejo con fármacos inmunodepresores por algún padecimiento de base. Cuando los mecanismos inmunes tienen tendencia a normalizarse, es cuando se inicia el proceso infeccioso, bien sea con este patógeno o con otros asociados como piógenos, hongos o virus.

En general se atiende a este tipo de pacientes cuando bruscamente presentan tos no productiva, fiebre elevada, seguidos de taquipnea, coriza, disnea y finalmente cianosis progresiva. La imagen radiológica puede demostrar cambios en días, de ser un infiltrado reticular parahiliar, rápidamente progresa a la formación de nódulos coalescentes de diferente densidad bilateral. En ocasiones puede complicarse con neumatocele, atelectasia, neumotórax y derrames. En esas condiciones el pronóstico es malo para la vida. Estos pacientes tienen una evolución muy corta; sin tratamiento el 100 por ciento de ellos fallecen dentro de la primera semana de iniciada esta complicación. Esta condición ha sido observada en algunas decenas de pacientes con SIDA (7).

Actualmente se considera que una cifra de linfocitos CD4 menor de 200/mm<sup>3</sup>, es un indicador de susceptibilidad para NPC (4). Además de la cuenta linfocitaria de CD4, hay otras variables que tienen significancia pronóstica y son claramente diferentes entre los pacientes que sobreviven a un cuadro de NPC y los que fallecen por esta causa (20).

El estudio de Garay y Greene (20) incluyó 150 pacientes con SIDA y NPC e informó de un valor de LDH-L sérica para sobrevivientes de 394 +/- 45 versus 717 +/- 51 IU/ml en los que fallecieron; asimismo una diferencia alveolo-arterial de O<sub>2</sub> elevada (42 +/- 6 en sobrevivientes vs. 55 +/- 6 en los que fallecieron) tuvo diferencia estadísticamente significativa. Un dato clínico que alcanzó diferencia estadísticamente significativa fue la frecuencia respiratoria por minuto (18 +/- 3 para sobrevivientes vs. 27 +/- 4 en no sobrevivientes).

Aunque se han descrito hallazgos de **P. carinii** en tejidos extrapulmonares como hígado, bazo, ganglios linfáticos, conducto auditivo, tiroides, piel, etc. son infrecuentes otros signos y síntomas extrapulmonares (6).

## 2.8. EPIDEMIOLOGIA

La neumocistosis es una afección cosmopolita. Después de los primeros reportes del hallazgo del parásito en diferentes tipos de reservorios como cueros, ratas y ratones, posteriormente se le encontró en perros, cabras, ovejas, zorros, conejos y en el hombre (21).

El microorganismo se considera ubicuo y en países industrializados, se estima que desde los 4 años de edad hay contacto con el mismo, dada la alta frecuencia de anticuerpos específicos contra ***P. carinii*** en población general (22).

En países industrializados la neumonía por ***Pneumocystis carinii*** llega a afectar al 80% de pacientes con SIDA en algún momento de la enfermedad, e incluso es el cuadro clínico inicial en el 60% de los mismos (4).

Es poco lo que se conoce en nuestro país acerca de la epidemiología en general de esta enfermedad. En una serie de 131 casos de SIDA en México se informó que el 13% de estos pacientes tenían ***P. carinii*** en pulmón, sin especificarse en este estudio la metodología diagnóstica (23). En otro estudio de 177 autopsias en cuatro hospitales de la ciudad de México se encontró neumonía por ***P. carinii*** en el 24% de los casos (24). De acuerdo a datos del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos (INDRE) hasta el 31 de diciembre de 1991 notificaron 844 casos de neumonía por ***P. carinii*** en 6,914 pacientes con SIDA, lo que representa el 12.21% (25).

En un estudio prospectivo de pacientes con SIDA y evidencia de neumonía intersticial, realizado en el Hospital de Infectología del Centro Médico "La Raza" IMSS se encontró ***P. carinii*** en el 51% de 128 pacientes estudiados en un periodo de 18 meses (21).

Como se puede observar, las frecuencias de NPC publicadas en México son muy variables y esto pudiera deberse, entre otras posibles causas, a una metodología diagnóstica inadecuada.

## 2.9. DIAGNOSTICO

El diagnóstico inicial generalmente es clínico y debe sospecharse en cualquier paciente que se conozca portador de infección por SIDA o que manifieste otro tipo de inmunocompromiso y que desarrolle fiebre, síntomas respiratorios y/o infiltrados en una teleradiografía de tórax. La lista de causas infecciosas y no infecciosas que semejan la signo-sintomatología de neumonía por ***P. carinii*** (NPC), debe ser descartada al no encontrar ***P. carinii*** por los métodos que se detallarán más adelante.

Además de la teleradiografía de tórax, otras pruebas paraclínicas como las pruebas funcionales respiratorias, la gammagrafía pulmonar y la tomografía axial computarizada están alteradas, pero son inespecíficas para NPC (27).

El diagnóstico de la infección es difícil, ya que depende de la visualización del patógeno en especímenes clínicos. Para establecer el diagnóstico de certeza se requiere la identificación morfológica del microorganismo, para lo cual es necesario obtener muestras apropiadas de buena calidad y ser examinadas por personal capacitado (5).

Los organismos de ***Pneumocystis carinii*** se encuentran atrapados en una matriz proteínica dentro del lumen alveolar. Para poder llevar a cabo el diagnóstico, este material alveolar debe estar presente en la muestra por estudiar. Quizá el factor más crítico para obtener un diagnóstico preciso sea la técnica empleada para la colecta del espécimen (28).

En un tiempo, el diagnóstico de ***P. carinii*** exigía la biopsia pulmonar a cielo abierto. La biopsia pulmonar tiene limitaciones derivadas de la necesidad de anestesia general, en un individuo con insuficiencia respiratoria grave. La justificación sería la necesidad urgente de hacer un diagnóstico de precisión para instalar un tratamiento específico. En la actualidad no es un procedimiento generalizado, sin embargo, es altamente eficiente. De los fragmentos de tejido se realiza una impronta en un portaobjetos, se deja secar para mejor adherencia y se realizan las tinciones (29).

El incremento continuo en el número de pacientes que desarrollan NPC, combinado con la naturaleza compleja de su enfermedad subyacente, ha hecho que el laboratorio tome mayor importancia en la documentación rápida de un diagnóstico utilizando muestras obtenidas por técnicas menos invasivas. Los exámenes para la búsqueda de ***P. carinii*** con muestras obtenidas por lavado bronquioalveolar, aspiración transtraqueal y expectoración inducida son solicitadas con más frecuencia (29).

En el lavado bronquioalveolar, el broncoscopio es introducido en un pequeño bronquiolo y se hace penetrar con fuerza el fluido hacia el área pulmonar para ser posteriormente reaspirado. Esto ha aumentado la capacidad para obtener material del interior del alvéolo que contenga organismos de P. carinii. Con un buen lavado bronquioalveolar, más del 90% de los pacientes con neumonía por Pneumocystis carinii pueden ser diagnosticados, apoyándose en el análisis del líquido, en laboratorios capacitados. Para llevar a cabo un lavado bronquioalveolar óptimo, el líquido se debe obtener del área pulmonar que muestre el mayor infiltrado, más que de un sitio al azar. Esto es sumamente importante en aquellos pacientes que presentan lesiones localizadas (30).

La aspiración transtraqueal no es efectiva en el diagnóstico de neumonía por P. carinii, porque no es capaz de lavar el material y extraerlo del alvéolo (6). A partir de los estudios hechos por Bigby et. al. (31) en 1986, muchas instituciones prefieren la técnica de expectoración inducida con nebulizaciones de solución salina, por ser un procedimiento menos costoso y menos invasivo para la obtención de muestra logrando un éxito variado.

Para lograr una adecuada expectoración inducida, se deberá lavar minuciosamente la boca y orofaringe, para así disminuir la flora contaminante. Para que esta técnica tenga éxito se requiere de personal altamente motivado, ya que es indispensable lograr la cooperación del paciente para obtener una muestra útil. La inducción debe persistir de 30 a 45 minutos y debe estimular una tos intensa que proporcione material del alvéolo. Un problema que puede presentarse en el proceso, es que la inducción comúnmente se suspende en el momento en que se recolecta el primer material de expectoración, siendo lo ideal que esta se continúe hasta obtener sustancia suministrada de la profundidad de los pulmones. En centros donde haya adecuada experiencia con la técnica de expectoración inducida, un resultado negativo para P. carinii obliga a realizar broncoscopia con lavado bronquioalveolar (6).

## 2.9.1. MANEJO Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El espécimen deberá ser rápidamente transportado al laboratorio para ser analizado. Las muestras que se reciban por la tarde pueden ser refrigeradas (2-8 grados centígrados) hasta la mañana siguiente asegurando la viabilidad de P. carinii.

Las muestras líquidas como las obtenidas por lavado bronquioalveolar, se centrifugan a 1200 g por 5 minutos, preparando frotos a partir del sedimento. Si la muestra es muy espesa, será necesario llevar a cabo una mucolización con agentes mucolíticos como la esputolisina o el ditiotreitól (DTT). Las preparaciones no deberán hacerse muy concentradas ya que esto puede dificultar la observación microscópica de las placas (5).



## 2.9.2. TINCIONES ESPECIALES PARA P. carinii

Se han descrito varias tinciones para P. carinii, incluyendo las tinciones histoquímicas y las inmunoespecíficas. Las tinciones histoquímicas son de dos tipos: las de pared quística, que tiñen las paredes de los quistes pero no colorean el contenido interior del quiste y las de organismo, que tiñen trofozoitos y organismos intraquísticos pero no colorean las paredes quísticas (32).

Las tinciones de pared quística incluyen la tinción con metenamina de plata, azul de toluidina-O, violeta de cresilo y Gram-Weigert. El análisis microscópico detecta los quistes característicos de P. carinii que, frecuentemente se encuentran en grupos y poseen un área densa que asemeja a un punto o un paréntesis. Algunos quistes pueden mostrar dobleces en la pared, y otros adoptan forma de taza. Sin embargo cuando se encuentran pocos quistes, es difícil diferenciarlos de levaduras. Esto es un problema grave en los pacientes con SIDA y en otros pacientes inmunocomprometidos, ya que comúnmente presentan úlceras orales y pseudohifas de Candida sp. en el material de vía respiratoria por contaminación de la orofaringe (33).

Las tinciones de trofozoitos y organismos intraquísticos incluyen las tinciones de Giemsa y de Wright. A pesar de que las muestras de pacientes con SIDA generalmente muestran grandes masas de trofozoitos de P. carinii, los trofozoitos individuales difícilmente se diferencian de fragmentos celulares y otros residuos presentes en la preparación. Las tinciones rápidas modificadas de Giemsa proveen material listo para analizarse en menos de una hora, pero la tinción no es tan delicada como la elaborada con Giemsa. La tinción de Wright proporciona una coloración menos detallada que con Giemsa (34).

Una placa control de P. carinii, debe ser incluida cada vez que se elabore una tinción de pared quística, para asegurar que el colorante está funcionando correctamente. Sin embargo no se requiere al elaborar la tinción de Giemsa, ya que ésta puede ser controlada por la adecuada coloración de las células alveolares e inflamatorias (6).

El análisis de todas las preparaciones teñidas debe ser exhaustivo, ya que las muestras de algunos pacientes contienen una muy baja concentración de organismos de P. carinii. La persona encargada de llevar a cabo el examen debe familiarizarse con todas las células que se observan comúnmente en muestras obtenidas de pulmón. Los especímenes con numerosas células descamativas muy probablemente fueron contaminados con material obtenido a nivel apical. Además, estas muestras frecuentemente tienen agrupaciones de bacterias. Si se encuentran numerosas células epiteliales ciliadas y pocos macrófagos alveolares, el espécimen pudo ser el resultado de un lavado bronquial más que de un lavado bronquioalveolar (29).

Se han descrito varias tinciones inmunes específicas, incluyendo tinciones por inmunofluorescencia. Las tinciones inmunológicas pueden obtenerse de varios fabricantes y al utilizarse deben de incluirse controles positivos y negativos para asegurar una tinción adecuada. Con el mismo cuidado se deben llevar a cabo los pasos de la fijación de la muestra, tiempos de incubación, forma de almacenamiento de las preparaciones y la dilución de los reactivos (8).

La sensibilidad y especificidad del análisis morfológico dependerá de la calidad de las muestras, de la calidad del manejo de las mismas, del proceso de tinción y muy particularmente de la capacidad del personal encargado de examinar los especímenes (7).

### **2.9.3 DIAGNOSTICO NO MORFOLOGICO DE Pneumocystis carinii**

El diagnóstico de neumonía por Pneumocystis carinii en pacientes inmunosuprimidos por medio de la demostración de anticuerpos serológicos ha sido poco alentador. Se han descrito métodos inmunológicos para la detección de estos anticuerpos como la contraelectroforesis (CIEF), doble difusión (DD), ensayo inmunoenzimático (ELISA), entre otros, pero ninguno ha demostrado una sensibilidad y especificidad útil en el diagnóstico clínico de P. carinii (35).

En estos estudios se empleó Pneumocystis carinii proveniente de pulmón humano o de ratas infectadas inmunosuprimidas. Las diferencias que se observaron entre las cepas de Pneumocystis carinii infectando a ratas y aquellas infectando a humanos pueden influir en la reactividad de las pruebas serológicas (35).

Las pruebas serológicas no son de utilidad para el diagnóstico de Pneumocystis carinii debido a la baja sensibilidad y especificidad de las mismas y debido a que generalmente son negativas cuando está presente la enfermedad (5).

Parecen promisorios los métodos de biología molecular (Immunoblot, P.C.R.) para el diagnóstico de esta entidad, sin embargo por el momento no están al alcance de países en vías de desarrollo (37).

## CAPITULO 3.

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

***Pneumocystis carinii*** es un patógeno " problema ". Es un problema para el personal de laboratorio al realizar el diagnóstico, es un problema para el biólogo al intentar clasificarlo, pero más que nada presenta un gran problema para el paciente que lucha para sobrevivir de la infección. Es un patógeno oportunista y causa enfermedad en aquellos pacientes cuya inmunidad se encuentra alterada.

#### 3.1. OBJETIVO GENERAL

Investigar la frecuencia de ***Pneumocystis carinii*** como agente causal de neumonía en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias, inmunodeprimidos y/o desnutridos.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Elegir entre tres técnicas diferentes de tinción para búsqueda de ***Pneumocystis carinii***: Giemsa, azul de toluidina-O y metenammina-plata, la más apropiada para la obtención de resultados rápidos, accesibles y confiables en el laboratorio clínico.

## MATERIAL Y METODOS

### PACIENTES:

Se incluyeron 20 niños de ambos sexos, evaluándose las causas clínicas que producían el estado de inmunodepresión actual del paciente, para seleccionar la metodología adecuada de obtención de la muestra pulmonar. Unos de los padecimientos iniciales que presentaron estos niños fueron: leucemia aguda linfoblástica, SIDA, insuficiencia renal, tumoraciones y sepsis entre otros. La descripción de la población analizada para el diagnóstico de Pneumocystis carinii se puede apreciar detalladamente en la Tabla 2 , y la manera como se estudiaron estos pacientes esta indicado en el algoritmo que se presenta en el Esquema 1.

### 3.3. CRITERIOS DE INCLUSION

Pacientes de ambos sexos, desde neonatos hasta los 19 años de edad que se encontraban hospitalizados en el Instituto Nacional de Pediatría por presentar alguna de las siguientes causas: leucemias; infiltraciones linforreticulares malignas; ser receptores de órganos transplantados; aquellos con terapéutica inmunosupresora; con inmunodeficiencias congénitas; SIDA, y en aquellos con deficiencias proteicas nutricionales con grado de desnutrición primario, secundario y terciario, en los cuales radiológicamente existía evidencia de enfermedad alveolar difusa. Las muestras sólo se obtuvieron si existía una indicación médica de broncoscopia, aspirado bronquial, lavado bronquioalveolar o expectoración inducida.

### 3.4. CRITERIOS DE EXCLUSION

Se excluyeron a todos aquellos pacientes a los cuales se les realizó la toma de muestra en forma incorrecta, ya que si el producto obtenido era saliva, no era útil. También se eliminó del estudio a pacientes que estuvieron recibiendo medicamentos capaces de actuar sobre Pneumocystis carinii, como el trimetoprim-sulfametoxazol.

**TABLA 2 : Descripción de Pacientes Analizados Para Diagnóstico de**  
***Pneumocystis carinii***

NUM.DE PACIENTE	SEXO	EDAD	SERVICIO DE PROCEDENCIA	METODO DE OBTENCION DE MUESTRA	PADECIMIENTO INICIAL
1	M	15 años	Inmunología	Lavado bronquioalveolar	Síndrome antifosfolípido
2	M	10 meses	Infectología	Lavado bronquioalveolar	SIDA
3	F	16 años	Inmunología	Expectoración Inducida	Hipogammaglobulinemia
4	M	1 mes	Infectología	Aspirado bronquial	BNM del recién nacido
5	F	3 años	Neumología	Lavado bronquioalveolar	Asma bronquial
6	M	2 años	Oncología	Aspirado bronquial	Tumoración
7	F	14 años	Neumología	Lavado bronquioalveolar	Asma bronquial
8	F	3 años	Neumología	Lavado bronquioalveolar	Sepsis
9	M	6 años	Neurología	Lavado bronquioalveolar	Síndrome cerebeloso crónico
10	F	16 años	Hematología	Expectoración inducida	Leucemia aguda linfoblástica
11	M	11 años	Infectología	Expectoración Inducida	SIDA
12	M	1 año	Oncología	Aspirado Bronquial	Tumoración
13	F	14 años	Nefrología	Expectoración Inducida	Insuficiencia renal
14	M	7 años	Infectología	Expectoración Inducida	SIDA
15	F	8 años	Infectología	Expectoración Inducida	SIDA
16	F	2 años	Hematología	Aspirado Bronquial	Leucemia aguda linfoblástica
17	F	8 años	Infectología	Expectoración Inducida	SIDA
18	M	1 año	Nutrición	Lavado bronquioalveolar	Desnutrición
19	M	17 años	Inmunología	Expectoración Inducida	SIDA
20	M	9 años	Hematología	Aspirado bronquial	Leucemia aguda linfoblástica

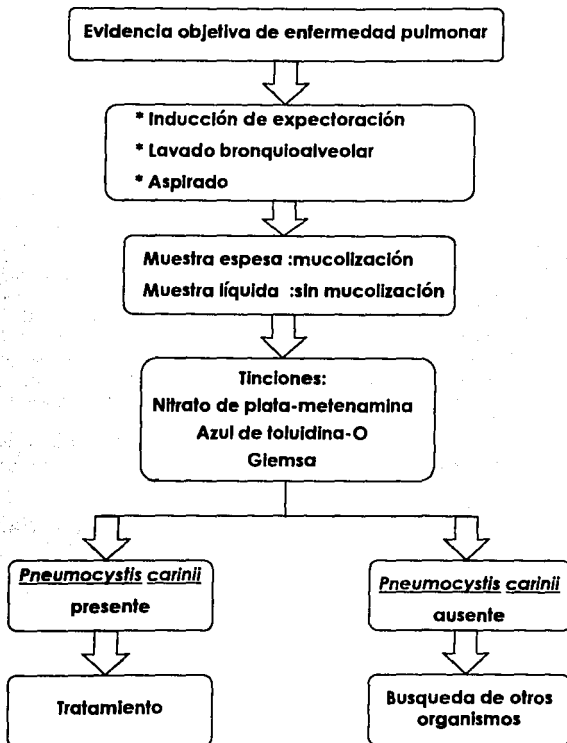
\* SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

\* BNM: Bronconeumonía

\* M: Masculino \* F: Femenino

## ESQUEMA 1

### ALGORITMO PARA EL ESTUDIO DE PACIENTES CON NEUMONIA POR *Pneumocystis carinii*



### 3.5. MUESTRAS

Se estudiaron 20 muestras de material pulmonar que comprendió de julio de 1993 a noviembre de 1994. Este material se obtuvo por medio de lavado bronquioalveolar, aspirado bronquial y expectoración inducida de niños hospitalizados o que acudieron a consulta en los servicios de Hematología, Oncología, Neumología, Inmunología, Infectología, Nefrología y Neurología del Instituto Nacional de Pediatría.

Las muestras fueron transportadas inmediatamente al laboratorio para ser procesadas, y aquellas que se tomaron durante la noche se conservaron en refrigeración (2-8 grados centígrados) hasta la mañana siguiente.

### 3.6. PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

#### PRETRATAMIENTO:

El material pulmonar demasiado espeso, se mucolizó, mezclándolo en un tubo cónico, con ditiotreitól 13mM (DTT), en una proporción 1:2. Después de homogeneizar por agitación se incubó a 37 grados centígrados hasta observar a simple vista la mucolización de la muestra (de 10 a 30 minutos). En seguida, se hizo un lavado añadiendo PBS (Phosphate buffered saline) con pH 7.2 a los tubos y centrifugándolos a 1500g durante 10 minutos. Por último se decantó el sobrenadante y se homogenizó el sedimento con una pipeta Pasteur para preparar los frotos, cuidando de que estos no fueran demasiado espesos para no dificultar la lectura en el microscopio.

Las muestras poco espesas no se les elaboró la mucolización y se trabajó directamente con el sedimento después de haberlas centrifugado como se indicó anteriormente.

### TECNICAS REALIZADAS EN EL ESTUDIO

#### 3.7. TINCIONES:

Las muestras se procesaron simultáneamente con tres tinciones diferentes: **Giemsa (5)**, **azul de toluidina-O modificada (38,14)** y **nitrito de metenamina-plata (22)**.

### 3.7.1. TINCION DE AZUL DE TOLUIDINA-O MODIFICADA (Chalvardjian y Grawe)

Debido a los problemas que se presentaban al hacer las lecturas de preparaciones teñidas con azul de toluidina-O, se investigó la posibilidad de modificar la tinción. La diferencia principal entre estas dos tinciones, (azul de toluidina-O y modificada) fue la sustitución del reactivo de sulfatación éter-ácido sulfúrico al reactivo de sulfatación ácido acético-ácido sulfúrico (38). Este cambio dio como resultado preparaciones más claras ya que el nuevo reactivo de sulfatación eliminó todo el material de fondo, que podía en determinado momento causar confusión durante la observación microscópica, pero sin eliminar a *Pneumocystis carinii* ni a ningún elemento micótico.

## REACTIVOS

### REACTIVO DE SULFATACION: ACIDO ACETICO-ACIDO SULFURICO

Se colocan 45 ml de ácido acético glacial en una caja de Koplín y esta en una tina con agua de la llave. Se agregan lentamente 15 ml de ácido sulfúrico concentrado con una pipeta serológica, teniendo precaución de no producir salpicaduras. A continuación se mezcla suavemente con una varilla de vidrio, hasta lograr una completa homogenización. La caja de Koplín se tapa y se almacena a temperatura ambiente. El reactivo así preparado es estable durante una semana. Antes de usarlo debe agitarse para que estén bien mezclados el ácido-acético y el ácido sulfúrico.

### SOLUCION DE AZUL DE TOLUIDINA-O

#### COMPOSICION:

Azul de toluidina-O	0.3 g
Agua destilada	60.0 ml
Acido clorhidrico concentrado	2.0 ml
Alcohol etilico absoluto	140.0 ml

Disolver el colorante en agua destilada, añadir el ácido y después el alcohol. Esta solución se almacena a temperatura ambiente y es estable durante un año.



## PROCEDIMIENTO DE TINCION:

- 1.- De las muestras ( mucolizadas o no ) hacer extensiones.
- 2.- Secar al aire las extensiones.
- 3.- Agitar con varilla de vidrio el reactivo de sulfatación.
- 4.- Colocar con pinzas las preparaciones en el reactivo de sulfatación durante 10 minutos.
- 5.- Después de 5 minutos, se agita nuevamente el reactivo con una varilla de vidrio.
- 6.- Se sacan las preparaciones y se lavan suavemente con agua fría de la llave.
- 7.- Se elimina el exceso de agua y se tiñe con la solución de azul de toluidina-O durante 3 a 4 minutos.
- 8.- Sumergir y sacar las láminas sucesivamente por aproximadamente 10 segundos en alcohol etílico al 95% .
- 9.- Sumergir y sacar las láminas sucesivamente por aproximadamente 10 segundos en alcohol etílico absoluto.
- 10.- Repetir el paso anterior pero con xilol.
- 11.- Secar los portaobjetos al aire y examinar al microscopio con el objetivo de 100x.

## INTERPRETACION:

Se observan formas quísticas de Pneumocystis carinii de color púrpura-lila aisladas o en ramilletes (clusters). Sus formas pueden ser ovales o redondas midiendo de 4-7 micras de diámetro.

La región interna del quiste se tiñe uniformemente observándose en ocasiones una porción central en forma de punto de color más oscuro.

Una característica importante de esta tinción es que se elimina la mayoría del material residual de fondo viéndose éste de color purpúreo-cristalino

Otros organismos que pueden teñirse con esta técnica son los hongos, los cuales son fáciles de diferenciar ya que a pesar de que toman más o menos la misma coloración quizá solo un poco más oscuros, sus formas y tamaños son más irregulares y grandes y por lo general se encuentran en grandes conglomeraciones. Puede presentarse confusión en los casos donde estas estructuras micóticas se encuentran aisladas donde solo se aprecie una a la vez y el tamaño y forma sea sugestiva de P. carinii. En estos casos se recomienda buscar más estructuras que nos ayuden a hacer la interpretación de P. carinii observando varios organismos como los descritos anteriormente.

### 3.7.2. TINCIÓN DE NITRATO DE PLATA-METENAMINA DE GOMORI

La tinción de Gomori (1946) fue designada como una prueba histoquímica para identificar glucógeno y mucina en la liberación de grupos aldehídos, por el tratamiento con ácido crómico y su detección por la reducción de un complejo alcalino formado por metenamina-nitrato de plata (28).

#### SOLUCIONES BASE

Solución de ácido crómico al	4%
Nitrato de plata al	5%
Metenamina al	3%
Borax al	5%
Bisulfito sódico al	1%
Tiosulfato sódico al	2%

#### NITRATO DE PLATA-METENAMINA (STOCK)

Nitrato de plata al 5%	5.0 ml*
Metenamina al 3%	100.0 ml*

**\* Se mezclan los componentes y se almacena en refrigeración**

#### NITRATO DE PLATA-METENAMINA (SOL. DE TRABAJO)

Solución stock de nitrato de plata-metenamina	25.0 ml
Agua destilada	25.0 ml
Borax al 5%	2.0 ml

**\* Esta solución se prepara en el momento. NO REUSAR**

### **BISULFITO SODICO AL 1%**

Bisulfito de sodio	1.0 gramo
Agua destilada	100.0 ml

### **CLORURO DE ORO AL 0.1%**

Solución de cloruro de oro al 1%	10.0 ml*
Agua destilada	90.0 ml*

\* Esta solución se puede reusar.

### **TIOSULFATO SODICO AL 2%**

Tiosulfato de sodio	2.0 g
Agua destilada	100.0 ml

### **SOLUCION VERDE BRILLANTE AL 0.2%**

Verde brillante	0.2 g
Acido acético glacial	0.2 ml
Agua destilada	100.0 ml

### **SOLUCION VERDE BRILLANTE (DE TRABAJO)**

Solución stock	10.0 ml
Agua destilada	40.0 ml

## PROCEDIMIENTO DE TINCION:

- 1.- Efectuar las extensiones a partir de aspirados bronquiales, lavados bronquioalveolares y expectoración.
- 2.- Colocar los frotos en alcohol al 96% para fijarlos.
- 3.- Pasar a ácido crómico al 4% durante una hora.
- 4.- Enjuagar con agua de la llave.
- 5.- Colocar en bisulfito sódico al 1% durante 1 minuto para eliminar residuos de ácido crómico.
- 6.- Lavar con agua de la llave de 5 a 10 minutos.
- 7.- Lavar con 3 ó 4 cambios de agua destilada.
- 8.- Colocar los portaobjetos en solución recién preparada de plata-metenamina en la estufa horno a 60 grados centígrados, hasta que adquieran un color marrón (aproximadamente una hora).
- 9.- Enjuagar con 6 cambios de agua destilada.
- 10.- Darle color grisáceo con solución de cloruro de oro (aproximadamente de 2 a 5 minutos).
- 11.- Eliminar plata no reducida colocando las laminillas en tiosulfato de sodio de 2-5 minutos.
- 12.- Enjuagar con agua destilada.
- 13.- Darle coloración de contraste con solución de trabajo verde brillante durante 30-60 segundos .
- 14.- Deshidratar con dos cambios en alcohol al 95% , también dos cambios en alcohol absoluto y aclarar con xilol.
- 15.- Montar con resina sintética y examinar al microscopio con el objetivo 100x.

## INTERPRETACION:

Se observan quistes de Pneumocystis carinii de tamaño uniforme de 4-7 micras de diámetro y de forma variada, adoptando estas apariencia oval, de copa, de luna creciente o pelota de futbol americano.

La tinción de plata-metenamina impregna la pared de las formas quísticas y las evidencia como estructuras negro-marrón sin dejar ver los cuerpos intraquísticos. Dentro del quiste se pueden apreciar un par de estructuras de aproximadamente una micra de largo que asemejan unas comas o paréntesis, como también pueden ser visibles unas áreas densas oscuras en forma de puntos, típicas de Pneumocystis carinii.

Aunque otras formas micóticas son capaces de teñirse con esta técnica, es poco probable que Pneumocystis carinii pudiera confundirse con ellas ya que estas estructuras micóticas presentan una coloración demasiado oscura, generalmente de color negro intenso pudiéndose observar en algunos casos organismos en gemación con su forma característica de levadura.

### 3.7.3. TINCION DE GIEMSA

#### REACTIVOS

Solución madre de Giemsa ( presentación comercial).  
Agua destilada

#### PREPARACION

Hacer dilución 1:20 de la solución madre con el agua destilada. Mezclar.

#### PROCEDIMIENTO DE TINCION:

- 1.- Realizar frotos a partir del material pulmonar.
- 2.- Fijar preparación a la flama.
- 3.- Cubrir el portaobjetos completamente con la solución preparada del colorante de Giemsa (dilución 1:20), por 20 minutos.
- 4.- Lavar al chorro del agua.
- 5.- Escurrir y secar al aire la preparación.
- 6.- Montar y observar al microscopio con objetivo 100X.

#### INTERPRETACION:

No se tiñe la pared quística, sólo se pueden observar los cuerpos intraquisticos (esporozoítos) por lo general en número de ocho, de 1-2 micras de diámetro, con núcleo de color rojo intenso, rodeados por un halo transparente.

Se pueden apreciar también los trofozoítos que son la forma extraquistica y miden de 1-5 micras de diámetro. Esta célula es pleomórfica con citoplasma morado pálido y con la presencia de un núcleo oscuro morado-rojizo. Son difíciles de observar ya que fácilmente se confunden con el material de fondo.

Se pueden diferenciar varios tipos de células como los macrófagos alveolares, células epiteliales y células ciliadas bronquiales de color rosa como también diferentes formas de bacterias teñidas de color azul. En esta tinción se manifiesta abundante material de fondo proteínico y residuo citoplasmático.

## CAPITULO 5.

### RESULTADOS Y DISCUSION

De los 20 pacientes estudiados, el 55% correspondió al sexo femenino y 45% al sexo masculino ( Fig. 2 ). El grupo de edad con mayor número de pacientes fue el de 12-18 años con un 35%, seguido por el de 6-11 años con un 30%, después el de 1 día - 2 años con un 25% y por último el grupo de 3-5 años con un 10% ( Fig. 3 ).

Del servicio de Infectología fue de donde se logró capturar la mayor cantidad de pacientes, los cuales fueron 6 y representaron un 30% de las muestras analizadas. Le siguieron los servicios de Inmunología, Hematología y Neumología con un 15% cada uno, después Oncología con un 10%, y por último, Nefrología, Nutrición y Neurología con un 5% respectivamente ( Fig. 4 ).

Respecto a los padecimientos iniciales, además de la neumonía manifestada por todos los individuos, llama la atención que la categoría conformada por los niños afectados por SIDA constituyó un 30% de los especímenes estudiados. Otra enfermedad de importancia fue la leucemia aguda linfoblástica presentándose en un 15% de los casos, le precedieron otro tipo de padecimientos como tumoraciones y asma con un 10% cada uno, hipogammaglobulinemia, desnutrición de III grado, sepsis, insuficiencia renal y síndrome antifosfolípido entre otros, cada uno con un 5% y representando un total del 35% de las muestras analizadas ( Fig. 5 ).

De las manifestaciones clínicas observadas, sobresalen las siguientes: fiebre en 18 niños, tos en 12 y dificultad respiratoria en 13; con menor frecuencia se manifestó taquicardia y astenia en 4 cada una.

En relación a una patología asociada reportada con frecuencia en pacientes con SIDA, la candidiasis oral (42,43,30,39), se encontró en este estudio que los datos concuerdan con las referencias citadas, ya que de 6 niños con SIDA, 4 presentaron candidiasis oral. Se confirmó un caso de sepsis por Candida en un paciente con tumoración, un caso de candidiasis renal en un individuo con insuficiencia renal y desnutrición de III grado y un aislamiento de Candida en secreción bronquial de un niño con leucemia aguda linfoblástica.

Al analizar estos resultados, consideramos importante señalar que Candida, uno de los oportunistas que también representa gran riesgo para los pacientes inmunocomprometidos, se encuentra ocupando un lugar significativo. Si comparamos estos datos con lo reportado en Estados Unidos y Haití, países del primer y tercer mundo respectivamente, observamos que nuestros hallazgos se asemejan en gran proporción.

En cuanto a la obtención del material pulmonar se pudieron recuperar 8 especímenes por expectoración inducida, 7 por lavado bronquioalveolar y 5 por aspirado transtraqueal, representando estos un 40%, 35% y 25% respectivamente ( Fig. 6 ).

La literatura reporta una sensibilidad mayor al 90% realizando un buen lavado bronquioalveolar (6,30) en el diagnóstico de P. carinii. La técnica de expectoración inducida cita sensibilidades que van del 56 % originalmente descrito por Bigby (31,4) hasta el 94.7 % que reporta Leigh, siendo posible lograr esta sensibilidad siempre y cuando se ponga cuidado especial en la manera de recuperar la muestra empleando nebulizaciones con solución salina hipertónica, estimulando así, la producción de material alveolar por un tiempo aproximado de 30-45 minutos. La aspiración es la técnica menos indicada por otras publicaciones para el diagnóstico de P. carinii, porque es difícil obtener material proveniente de los alveolos ( 6 ).

Al iniciar este estudio se pretendían conseguir todas las muestras sólo por medio de lavado bronquioalveolar, ya que es el método que indica mayor sensibilidad, pero debido a la delicada situación de muchos de los niños en los cuales una broncoscopia no era justificable, se optó por acudir a las otras metodologías alternativas, pudiendo efectuar lavado bronquioalveolar sólo en 7 de los casos. Fue difícil obtener las muestras, porque además de haber trabajado con pacientes de suma gravedad, se tenía la desventaja de laborar con una población pediátrica en donde fue complicado conseguir la cooperación indispensable para recuperar el material pulmonar por medio de expectoración inducida.

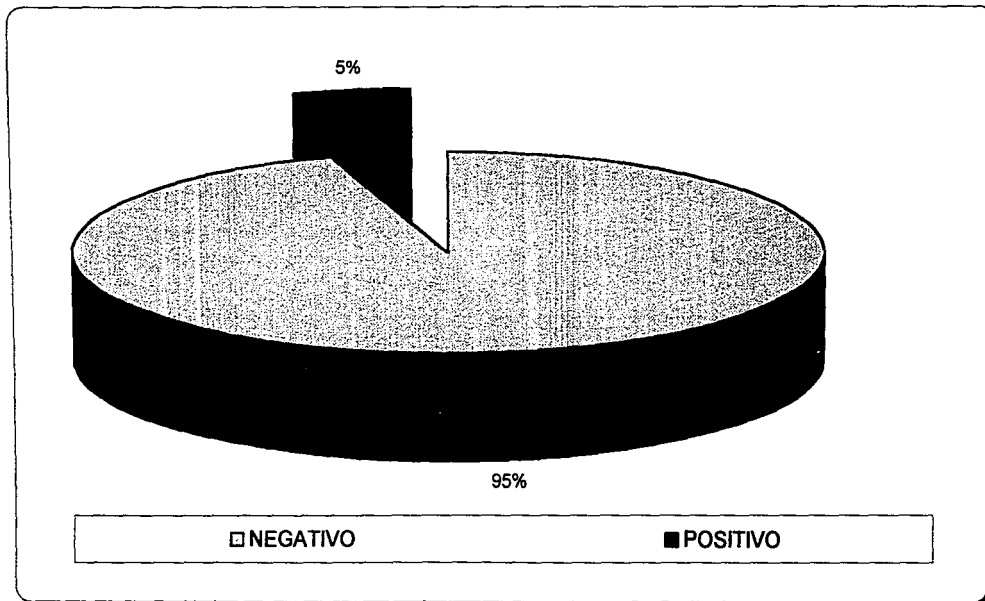
Se obtuvo en el presente estudio un caso confirmado de neumocistosis de los 20 pacientes analizados, el cual fue un niño de 10 meses, hospitalizado en el servicio de Infectología con diagnóstico de SIDA y cuya muestra fue obtenida por lavado bronquioalveolar ( Fig. 1 ).

Con respecto a otro tipo de organismos aislados de material pulmonar que se sometió a cultivo por el laboratorio de Bacteriología se reportó Haemophilus Influenzae en un caso, Streptococcus haemolyticus en otro, Pseudomona aeruginosa en 3 pacientes y Klebsiella pneumoniae y Enterobacter aerogenes en dos casos respectivamente.

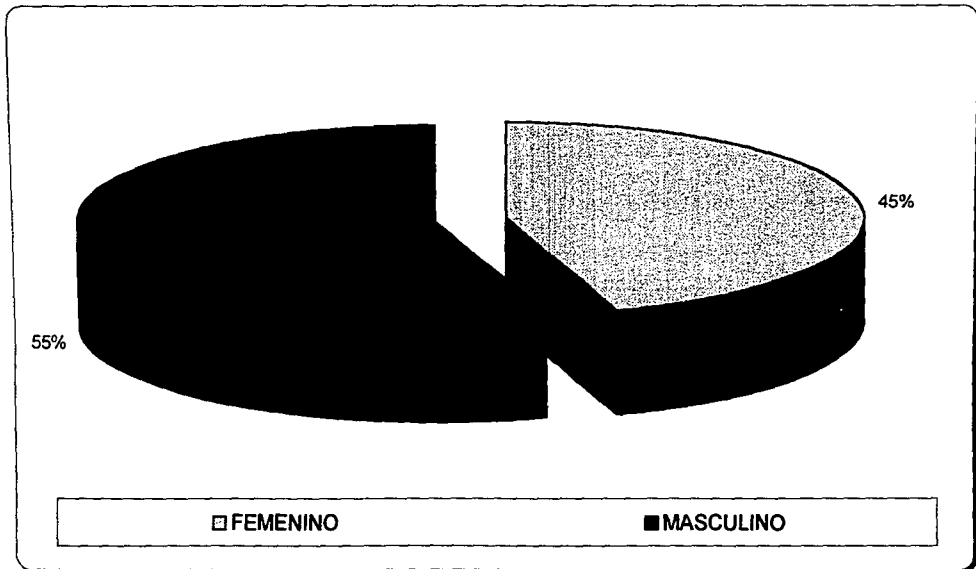
El hallazgo de estos microorganismos no excluye la probabilidad de una asociación con ***P. carinii*** en un mismo paciente ya que la lista de organismos según la bibliografía reportada, con los cuales ***P. carinii*** ha sido relacionado en el pulmón, incluye una amplia gama de bacterias como también de virus y hongos ( 1,2 ).



FIG. 1 FRECUENCIA DE P. carinii EN LOS NIÑOS ESTUDIADOS



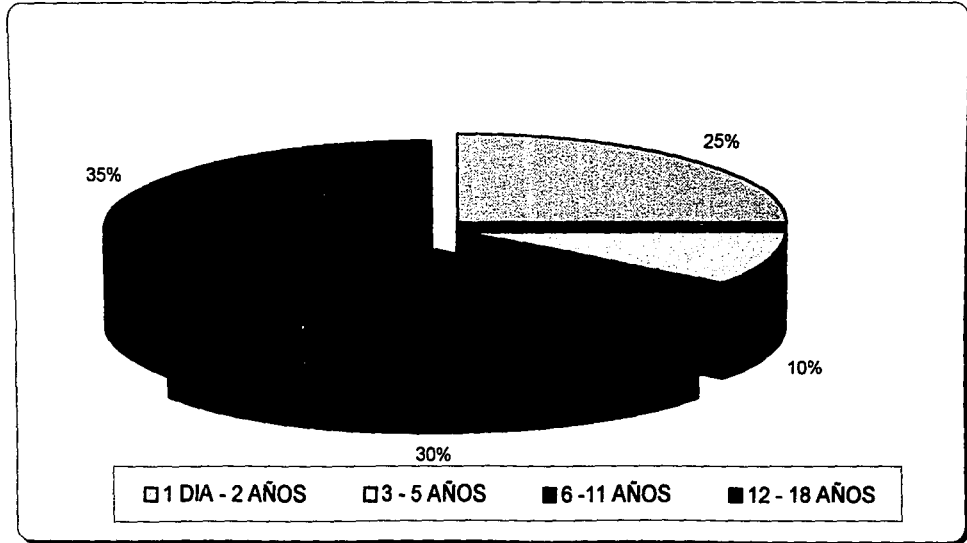
**FIG.2 FRECUENCIA POR SEXO EN LOS NIÑOS ESTUDIADOS**



**SEXO**

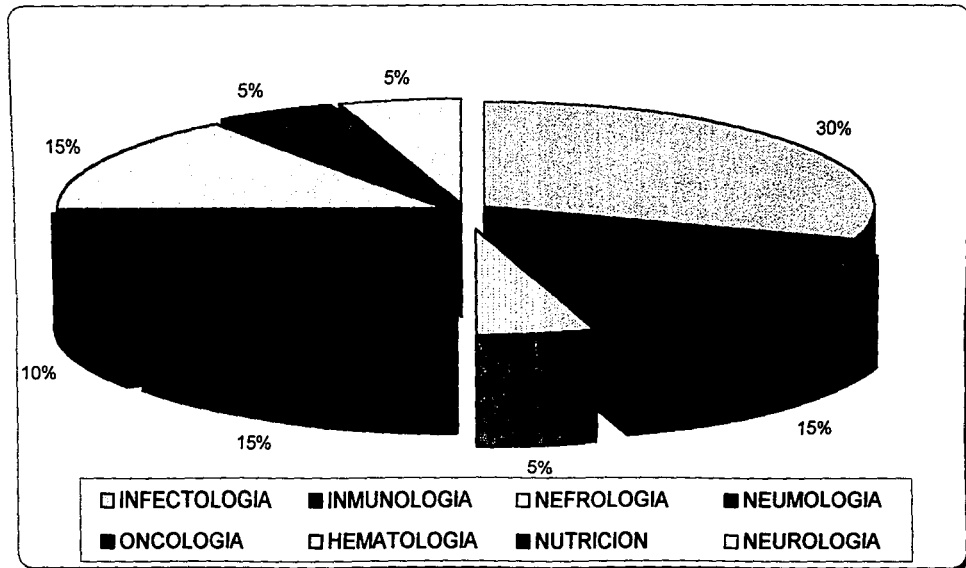
PARASITOLOGIA/INP

**FIG. 3 FRECUENCIA POR GRUPOS DE EDAD EN LOS NIÑOS ESTUDIADOS**



**EDAD**

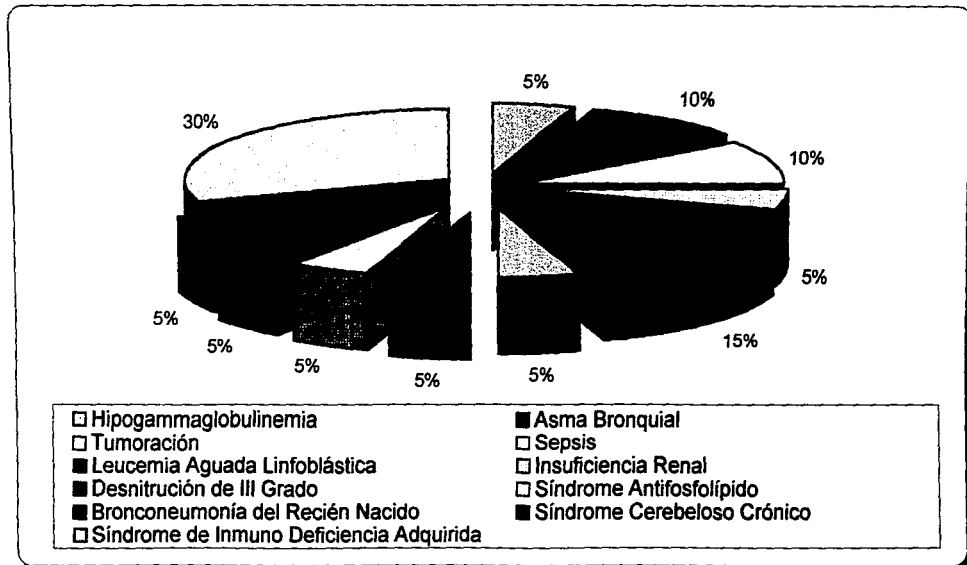
**FIG. 4 SERVICIOS DEL I.N.P. DE PROCEDENCIA DE LOS NIÑOS ESTUDIADOS**



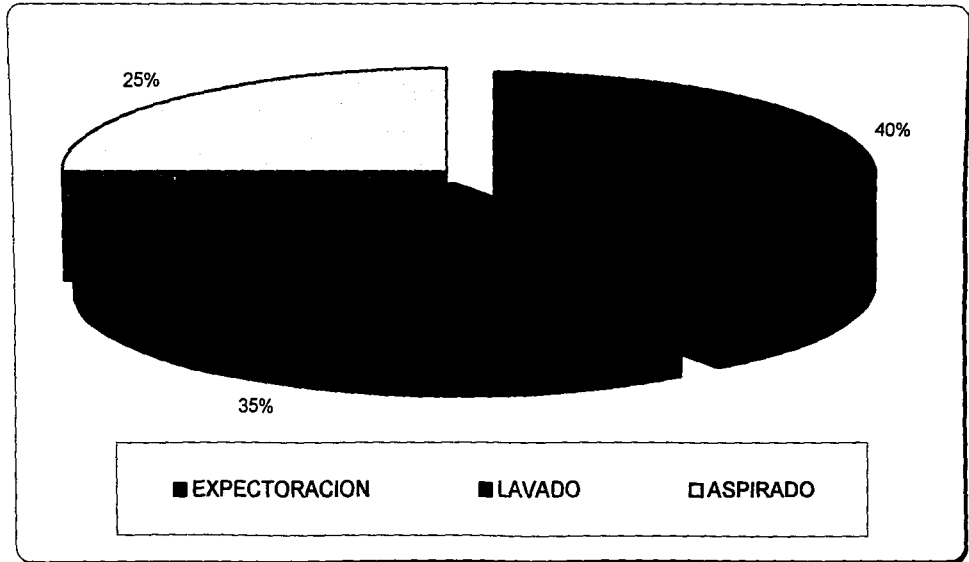
**SERVICIOS**

PARASITOLOGIA / INP

**FIG. 5 PADECIMIENTOS INICIALES DE LOS NIÑOS ESTUDIADOS**



**FIG. 6 METODOS DE OBTENCION DE MUESTRA**



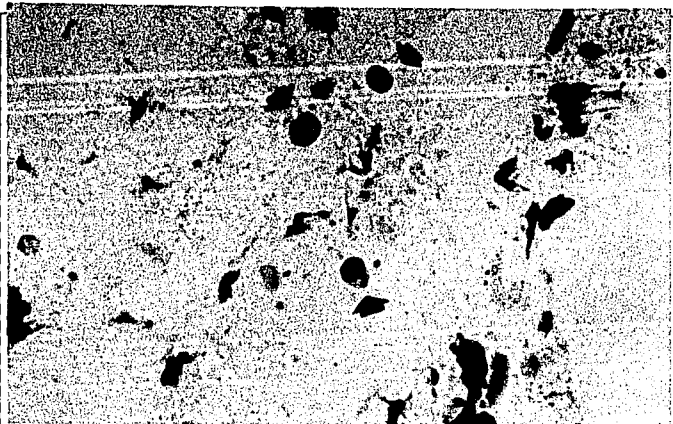


FIG. 7. Quistes aislados de *Pneumocystis carinii* del paciente 2 teñidos con azul de toluidina-O, sobresalen del campo ya que se observa poco material de fondo. Obsérvese su color lila característico. (X 1000)

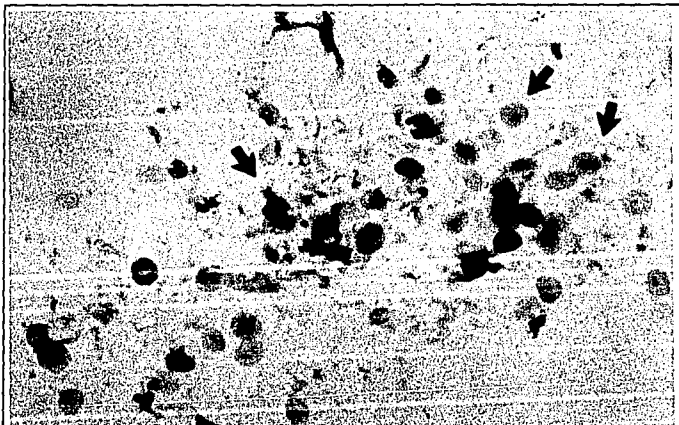


FIG. 8. Otro campo del mismo frote de material pulmonar teñido con azul de toluidina-O, donde se aprecian diferentes tamaños y formas de *Pneumocystis carinii* (X1000).

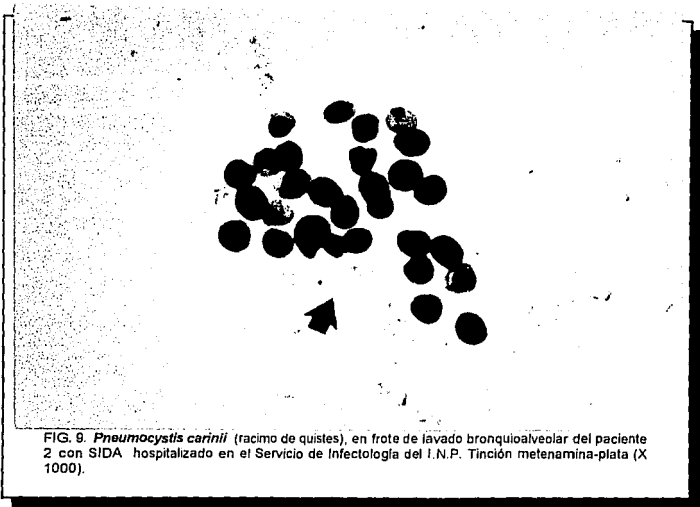


FIG. 9. *Pneumocystis carinii* (racimo de quistes), en frote de lavado bronquioalveolar del paciente 2 con SIDA hospitalizado en el Servicio de Infectología del I.N.P. Tinción metenamina-plata (X 1000).

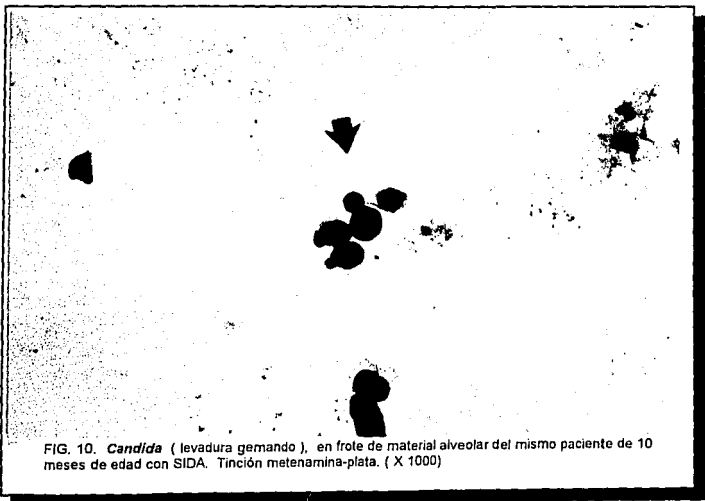
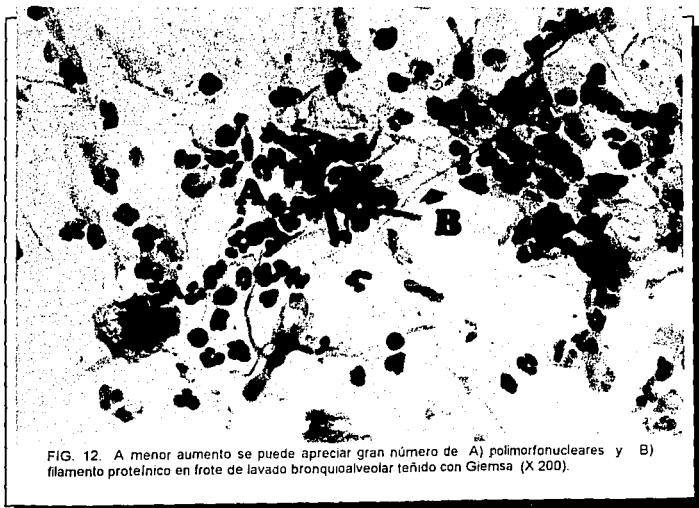
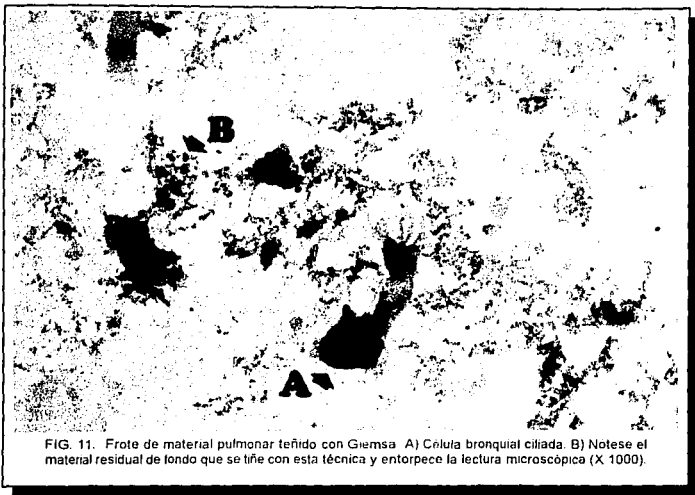


FIG. 10. *Candida* (levadura gemando), en frote de material alveolar del mismo paciente de 10 meses de edad con SIDA. Tinción metenamina-plata. ( X 1000)





## CAPITULO 6.

### CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio, se puede concluir que *Pneumocystis carinii* es un organismo patógeno capaz de producir neumonías fatales sobre todo en pacientes inmunodeprimidos, de difícil diagnóstico por su escaso conocimiento y por no realizarse sistemáticamente su investigación.

Se encontró en este trabajo que la frecuencia de *P. carinii* en pacientes con inmunodeficiencia atendidos en el Instituto Nacional de Pediatría es del 5 %, sin haber mostrado relación alguna en cuanto a riesgo de incidencia con edad, sexo, época de año o lugar de residencia.

Los hallazgos clínicos en un hospedero inmunocomprometido pueden sugerir alta probabilidad de neumonía por *Pneumocystis carinii*, pero sólo se puede establecer el diagnóstico por la demostración de los organismos. La broncoscopia es el método más confiable en la recuperación de los mismos, aunque una desventaja que presenta es que sólo se puede realizar en casos justificados debido a las complicaciones que puede desencadenar en pacientes inestables.

Se llevó a cabo el diagnóstico de *Pneumocystis carinii* en los pacientes por medio de la obtención de material pulmonar utilizando lavado bronquioalveolar, expectoración inducida y aspiración transtraqueal, no fue posible establecer un porcentaje de sensibilidad para la técnica de expectoración inducida en población infantil ya que no en todos los niños se logró realizar broncoscopia, que es el procedimiento a seguir para la obtención de muestras con el fin de identificar el microorganismo y que sería indispensable como prueba idónea al compararla con la técnica utilizada para el diagnóstico.

Poco se sabe sobre la epidemiología de neumonía por *Pneumocystis carinii* en nuestro país y las frecuencias de este padecimiento en México son muy variables, esto pudiera deberse entre otras posibles causas a una inadecuada metodología diagnóstica.

Es por esto que creemos importante recalcar el resultado de nuestra investigación en cuanto a diagnóstico en el laboratorio. De las técnicas empleadas en este estudio para el diagnóstico de *P. carinii* en población pediátrica, la tinción de azul de toluidina-O, fue el método más satisfactorio

para la identificación de la forma quística del organismo en material pulmonar. Los resultados de dicho ensayo están disponibles una hora después de la recepción de la muestra con lo cual el laboratorio es capaz de hacer un diagnóstico rápido y confiable comparado con las otras técnicas. Ver Tabla 3. que muestra las conclusiones de los resultados comparativos de las tinciones utilizadas en el diagnóstico de ***Pneumocystis carinii***.

Los reactivos utilizados no son tan costosos y difíciles de preparar como en el caso de la tinción de metenamina-plata, además de no requerir de tiempos prolongados para su ejecución que es el caso de la técnica ya mencionada, que aproximadamente se lleva a cabo en 3 horas.

En cuanto a tiempo se refiere la técnica de Giemsa se elabora en poco tiempo, aproximadamente 30 minutos, pero ésta presenta otras desventajas. La visualización microscópica con la tinción de azul de toluidina-O no se dificulta como sucede con la tinción de Giemsa, donde uno de los problemas es que necesita de gran experiencia para localizar los cuerpos intraquísticos o trofozoítos que son los que se tiñen y no los quistes, además de revelar abundante material de fondo indeseable.

Se concluye que el éxito logrado al utilizar este método, además de lo ya señalado anteriormente, es debido a la preparación de un reactivo de sulfatación compuesto por ácido sulfúrico y ácido acético, que elimina gran proporción del material residual de la muestra pulmonar perjudicial para el microscopista ya que es capaz de entorpecer la búsqueda de ***P. carinii***, evitando así, un diagnóstico de certeza.

La sensibilidad y especificidad del análisis morfológico de ***Pneumocystis carinii*** dependerá de la calidad de las muestras, de la calidad del manejo de las mismas, del proceso de tinción y muy particularmente de la capacidad del personal encargado de examinar los especímenes.

Consideramos que este trabajo es un estudio con las características fundamentales para estimular el interés de investigadores, en darle la debida importancia a este microorganismo lo cual redundará en un mejor conocimiento del mismo, ya que es trascendental su detección oportuna a fin de brindar métodos de diagnóstico y tratamiento adecuados a los niños afectados por ***Pneumocystis carinii***.

**TABLA 3 : Tinciones Utilizadas en el Diagnóstico de *Pneumocystis carinii*.**

Tinción	Estado Teñido de <i>Pneumocystis carinii</i>	Descripción de la Forma Teñido de <i>Pneumocystis carinii</i>	Ventajas	Desventajas
Nitrato de plata-metenamina	Pared Quística	Pared bien delimitada; quistes redondos, ovalados, en forma de taza, de balón de futbol americano o colapsados, de color negro marrón, de 4-6 micras de diámetro. Frecuentemente se observan estructuras intraquísticas en forma de comas o paréntesis y unas áreas densas en forma de punto.	*Estandar de oro. *Fácil de leer. *Sensibilidad alta. *Muy poca probabilidad de confusión con levaduras.	*Alto costo. *Preparación de gran número de reactivos. *Varios pasos al ejecutar la tinción con tiempos muy prolongados (3 hrs). *No se tiñen cuerpos intraquísticos, ni trofozoitos.
Azul de toluidina-O	Pared Quística	Quistes redondos, ovales o en forma de taza, de 4-6 micras de diámetro, con región interna teñida uniformemente de color púrpura-rosa y en ocasiones muestra una parte central en forma de punto de color más oscura.	*Costo accesible. *Preparación de poco reactivo *Poco tiempo para elaborar tinción (20 minutos). *Eliminación de la mayoría de material residual de fondo. *Fácil de leer.	*Se requiere de una campana de flujo para el manejo de sustancias químicas nocivas. *Si los quistes de <i>Pneumocystis carinii</i> se encuentran aislados, pueden confundirse con formas micóticas.
Giemsa	Cuerpos intraquísticos y trofozoitos	*Cuerpos intraquísticos por lo general en número de ocho con núcleo de color rojo intenso, de 1-2 micras de diámetro, rodeados por un halo transparente. *Trofozoito, forma extraquística, de 2-5 micras de diámetro con citoplasma morado pálido y núcleo morado-rojo.	*Bajo costo. *Preparación de poco reactivo. *Poco tiempo para elaborar tinción (30 minutos).	*Sensibilidad baja. *Requiere de gran experiencia para hacer lectura microscópica. *Difícil de leer. *Tiene gran cantidad de material de fondo (células bronquiales ciliadas, macrófagos alveolares, células epiteliales, bacterias, residuo citoplasmático, material proteínico).

## CAPITULO 7.

### BIBLIOGRAFIA

- 1.- Inselman L. Pediatric Human Immunodeficiency Virus Infection. Pediatric Respiratory Disease: Diagnosis and Treatment. Bettina C. Hilman. Louisiana State University. School of Medicine in Shreveport. Shreveport, Louisiana, W.B. Saunders Company, 1993. p.187-204.
- 2.- Hughes W.T. Pneumonia in the Immunosuppressed Host. Pediatric Respiratory Disease: Diagnosis and Treatment. Bettina C. Hilman, M.D. Louisiana State University. School of Medicine in Shreveport. Shreveport, Louisiana: W.B. Saunders Company, 1993. p. 296-30
- 3.- Caldwell M., Rogers M. Epidemiology of Pediatric HIV Infection. Pediat Clin North Am 1991; 38(1):1-17.
- 4.- Hopewell P.C. *Pneumocystis carinii* Pneumonia: Diagnosis. J Infect Dis 1988; 157(6):1115-1118.
- 5.- Walzer P.D. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. J Infect Dis 1988; 157(4):629-632.
- 6.- Smith J.W., Bartlett M.S. Laboratory Diagnosis of *Pneumocystis*. Clin Lab Med 1991; 11(4): 957-973.
- 7.- Burke B.A., Robert A. G. *Pneumocystis carinii* Infection. Medicine 1973; 52 (1): 166-178.
- 8.- Tay, Lara, Velasco, Gutiérrez. Parasitología Médica. México. Editorial Méndez Cervantes, 1990. p. 186-189.
- 9.- Lange M., Klein E.B. Epidemic *Pneumocystis* Pneumonia in Children before the AIDS Era. Lancet 1991; 338(23):1340-1341.
- 10.- Calderón E.J. Infección por *Pneumocystis carinii*. Infectología 1983; 11:545-548.
- 11.- Campbell W. Ultrastructure of *Pneumocystis* in Human Lung. Arch Path 1972; 93: 312-324.
- 12.- Stringer J.R., Edman J.C., Cushion M.T., Richards J.W. The Fungal Nature of *Pneumocystis*. J Med Vet Mycol 1992; 30, Supplement : 271-278.

- 13.- Edman, Kovacs J.C., Masur J.A., Santi H., Elwood D.V., Sogin H.J. Ribosomal RNA genes of *P. carinii*. *J Protozool* 1989; 36: 188-208.
- 14.- Savoia D., Caramello P. The Microscopic Identification of *Pneumocystis carinii*. Institute of Microbiology and Institute of Infectious Diseases, University of Turin, 10126, Italy. p.725-745.
- 15.- Soulez B., Dei-Cas E., Palluault F. Morphological Evaluation of *Pneumocystis carinii* after Extraction from Infected Lung. *J Parasitol* 1991; 77(3): 449-453.
- 16.- Yoneda K., Walzer. Mechanism of Pulmonary Alveolar Injury in Experimental *Pneumocystis carinii* Pneumonia in the Rat. *Br J Exp Path* 1981; 62:339-46.
- 17.- Yoshida Y. Ultrastructural Studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 1989; 36(1): 53-60.
- 18.- Pifer L. A Fifteen Year Perspective on the In-Vitro Culture of *Pneumocystis carinii*. Department of Pediatrics and Clinical Laboratory Sciences, Univ. of Tennessee, Memphis. Workshop on *Pneumocystis carinii*. p.235-325.
- 19.- Sanders-Laufer D., DeBrian W., Edelson P.J. *Pneumocystis carinii* Infections in HIV-Infected Children. *Pediat Clin North Am* 1991; 38(1):69-89.
- 20.- Garay S., Greene J. Prognostic Indicators in the Initial Presentation of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *Chest* 1989; 95(4):769-72.
- 21.- Pumarola A., Torres R., García J., Piedrola G. *Microbiología y Parasitología Médica*. Editorial Salvat, 1990: p. 758-761.
- 22.- Pifer L., Hughes W.T., Stagno S., Woods D. *Pneumocystis carinii* Infection: Evidence for High Prevalence in Normal and Immunosuppressed Children. *Pediat*. 1978; 61(1): 35-41.
- 23.- Cano C., Villarreal C., Gómez G., Estrada J.L. Reporte de 131 Casos de SIDA en el Hospital de Infectología, Centro Médico "La Raza", I.M.S.S. *Revista Médica Instituto Mexicano del Seguro Social México*. 1989; 27:2.
- 24.- Alejandro M., Salido R., Leon P., Cano C., Sepulveda J. The Clinical and Autopsy Spectrum of HIV Infection in a Consecutive Series of Autopsy AIDS Patients Seen in Mexico City. Track B: Clinical Science and Trials. Poster Session. Friday June 22. p. 186.
- 25.- Instituto Nacional de Diagnostico y Referencia Epidemiológicos. *Boletín Mensual de SIDA/ETS (México)* 1992; 6:2084-93.

- 26.- Casanova L.J., Angulo G., Ordaz I. Frecuencia de *Pneumocystis carinii* en 128 Pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida y Neumonía Intersticial. Diagnóstico Mediante Expectoraación Inducida. Rev Med I.M.S.S. (México) 1992; 30:191-194.
- 27.- Kovacs J.A., Hiemenz J.W., Macher A., Stover D. *Pneumocystis carinii* Pneumonia: A Comparison Between Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome and Patients with Other Immunodeficiencies. Ann Intern Med 1984; 100(5):663-670.
- 28.- Amin M.B., Mezger E., Zarbo R.J. Detection of *Pneumocystis carinii* Comparative Study of Monoclonal Antibody and Silver Staining. Am J Clin Pathol 1992; 98: 13-18.
- 29.- Walron M., Fishman J. *Pneumocystis carinii*: Advances in Diagnosis. Clin Microb Newsletter 1992; 14 (21) : 161-168.
- 30.- Ognibene F., Shelhamer J., Gill V., Macher A. The Diagnosis of *P. carinii* Pneumonia in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome Using Subsegmental Bronchoalveolar Lavage. Am Rev Resp Dis 1984; 129: 929-932.
- 31.- Bigby T., Margolsker D., Jeffrey L., Phillip F. The Usefulness of Induced Sputum in the Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia in Patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome. Am Rev Resp Dis 1986; 133: 515-518.
- 32.- Kim H.K., Hughes W.T. Comparison of Methods for Identification of *Pneumocystis carinii* in Pulmonary Aspirates. A.J.C.P. October 1973. Infectious Diseases Service, St. Jude Children's Research Hospital Memphis, Tennessee. p.462-466.
- 33.- Mc Clellan, Miller S.B., Parsons P.E. Pneumothorax with *Pneumocystis carinii* Pneumonia in AIDS. Chest 1991; 100:1224-- 28.
- 34.- Milder J.E., Walzer P.D., Donald C., Rutledge M.E. Comparison of Histological and Immunological Techniques for Detection of *Pneumocystis carinii* in Rat Bronchial Lavage Fluid. J Clin Microbiol 1980; 11(4): 409-417.
- 35.- Kovacs J.A., Swan J.C., Shelhamer J., Gill V. Prospective Evaluation of a Monoclonal Antibody in Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. Lancet July, 1986; 5:1-3
- 36.- Kovacs J.A., Valerie L., Masur H., Leoung G. Diagnosis of *Pneumocystis carinii*: Improved Detection in Sputum with use of Monoclonal Antibodies. N Engl J Med 1988; 318(10): 589-93.
- 37.- Lipshick G., Gill V., Lundgren J., Andrawis V. Improved Diagnosis of *P. carinii* Infection by Polymerase Chain Reaction on Induced Sputum. Lancet July, 1992; 340(25): 203-206.

- 38.- Gosey L.L., Howard R.M., Witebsky F.G., Ognibene F.P. Advantages of a Modified Toluidine Blue O Stain and Bronchoalveolar Lavage for the Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *J Clin Microbiol* 1985; 22 (5): 803-807.
- 39.- Shin M.S., Veal C.F., Jessup J.G. Apical *Pneumocystis carinii* Pneumonia in AIDS Patients Receiving Inhaled Pentamidine Prophylaxis. *Chest* 1991;100: 1462-64.
- 40.- Hughes W.T., Robert A., Kim H.K. Coburn T.P. *Pneumocystis carinii* Pneumonitis in children with malignancies. *J Pediat* 1973; 82 (3): 404 - 415.
- 41.- Walzer P.D., Schultz M.G., Western K.A. *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Primary immune deficiency diseases of Infancy and Childhood. *J Pediat* March, 1973; 82 (3): 416-422.
- 42.- Barenfenger J. Identification of Yeasts and other Fungi from Direct Microscopic Examination of Clinical Specimens. *Clin Microbiol Newsletter* 1990; 12 (2): 9-15.
- 43.- Gottlieb, Schoff, Schanker. *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men. *N Engl J Med* 1981; 305: 1426.