

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

**UMAE HOSPITAL DE CARDIOLOGÍA CMN SIGLO XXI**

**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

**“Comparación de cuatro métodos para la identificación de *Pneumocystis jirovecii* en lavados bronquioalveolares de pacientes con neumonía del Hospital Infantil de México Federico Gómez”.**

**TESIS QUE PRESENTA:**

**DR. SURID VIRGEN DÍAZ**

**QUE PARA OBTENER EL DIPLOMA**

**EN LA ESPECIALIDAD EN**

**PATOLOGÍA CLÍNICA**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. ROSAMARÍA BERNAL REDONDO**

**Jefe de Laboratorio de Parasitología y Micología Médica**

**Departamento de Laboratorio Clínico**

**Hospital Infantil de México “Federico Gómez”**

**MÉXICO D.F.**

**AGOSTO DEL 2010.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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.

**“Comparación de cuatro métodos para la identificación de *Pneumocystis jirovecii* en lavados bronquioalveolares de pacientes con neumonía del Hospital Infantil de México Federico Gómez”.**

**Dr. Surid Virgen Díaz.**

**Vo. Bo.**

**Dr. Jesús Salvador Valencia Sánchez**

---

**Director de Educación e Investigación en Salud  
UMAE Hospital de Cardiología CMN Siglo XXI IMSS**

**Vo. Bo.**

**Dra. Noemí Patricia Castillo Torres**

---

**Titular del Curso de Especialización en  
Patología Clínica  
UMAE Hospital de Cardiología CMN Siglo XXI IMSS**

**Vo.Bo.**

**Dra. Rosamaría Bernal Redondo**

---

**Directora de Tesis  
Jefe de Laboratorio de Parasitología y Micología  
Hospital Infantil de México “Federico Gómez”**

***A Yvonne, mi esposa, por su amor y apoyo incondicional,***

***Gracias por darme el regalo más maravilloso de la vida:***

***Nuestro hijo Miguel.***

## **AGRADECIMIENTOS:**

- A mi familia por su apoyo incondicional.
- A la Dra. Rosamaría Bernal por todo su entusiasmo para la enseñanza de los residentes, y especialmente por su invaluable apoyo en la realización de mi tesis, dándose el tiempo necesario para mi orientación y para la resolución de los problemas que se presentaron durante la realización de la misma.
- Al personal del laboratorio de micología del HIMFG, Cele y Marce, por su valioso apoyo en la recolección de muestras y montaje de las técnicas.
- A la Dra. Rocio Peña por su amable aportación del bloque de pulmón que fue usado como control positivo para el ensayo molecular.
- A mi maestro, Dr. Enrique Piña, por su apoyo incondicional, con reactivos e infraestructura, cuyo único propósito es favorecer el desarrollo académico de los estudiantes.
- A la Dra. Magdalena Vilchis, por su orientación y apoyo para el montaje de las técnicas de biología molecular empleadas en esta tesis.
- A la Dra. Noemí Patricia Castillo, por buscar y proporcionar la formación más adecuada de todos los residentes.
- A todos los profesores que participaron durante mi formación de residente, especialmente al Dr. Juan Collazo, por sus valiosas enseñanzas en el aspecto humano y médico.
- A mis compañeros de generación por compartir parte de su tiempo y conocimiento.

## INDICE

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN .....	2
2.1. ASPECTOS HISTÓRICOS .....	2
2.2. TAXONOMIA.....	3
2.3. BIOLOGÍA E INMUNOPATOGENIA DE <i>P. jirovecii</i> .....	5
2.3.3. RESPUESTA INMUNE A LA NEUMONÍA POR <i>P. jirovecii</i> (PcP).....	9
2.4. EPIDEMIOLOGÍA.....	10
2.5. GRUPOS DE RIESGO PARA NEUMONÍA POR <i>P. jirovecii</i> .....	15
2.6. PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA NEUMONÍA POR <i>P. jirovecii</i> .....	21
2.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE <i>P. jirovecii</i> .....	23
2.7.1. Muestras .....	23
2.7.2. Métodos de identificación .....	24
2.7.2.1. Tinciones tradicionales .....	25
2.7.2.2. Inmunofluorescencia .....	28
2.7.2.3. Identificación molecular .....	28
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	30
4.- JUSTIFICACIÓN .....	31

5. OBJETIVO .....	32
6. MATERIAL Y MÉTODOS .....	33
6.1. Diseño del estudio .....	33
6.2. Muestras clínicas .....	33
6.3. Preparación de las muestras .....	33
6.3.1. Tinción de blanco de calcoflúor .....	34
6.3.2. Inmunofluorescencia directa .....	34
6.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	34
6.3.3.1. PCR Convencional .....	36
6.3.3.2. PCR Anidada .....	37
7. PRUEBAS ESTADÍSTICAS .....	38
8. RESULTADOS .....	39
9. DISCUSIÓN .....	42
10. REFERENCIAS .....	46

## 1. RESUMEN.

*Pneumocystis jirovecii* es una de las principales causas de neumonía en pacientes inmunosuprimidos. Existen numerosos métodos para la identificación del hongo, pero de acuerdo al Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América, la prueba estándar de oro para el diagnóstico de neumocystosis es la PCR anidada. En este estudio comparamos a la tinción de blanco de calcoflúor, la inmunofluorescencia directa y la PCR convencional contra la prueba estándar de oro para la identificación de *P. jirovecii* en lavados bronquioalveolares (LBA) de pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de neumonía en el HIMFG. Analizamos 63 LBA enviados al laboratorio de micología médica del HIMFG para búsqueda de estructuras micóticas, de los cuales 13 resultaron positivos para *P. jirovecii* por PCR anidada (20.6%). De los 13 resultados positivos 10 muestras pertenecen a pacientes masculinos y 3 a pacientes femeninas. La sensibilidad y especificidad de los métodos evaluados fueron: tinción de blanco de calcoflúor: 69.23 y 98.0%; inmunofluorescencia directa: 84.6 y 98.0%; PCR convencional: 92.3 y 100%. En este estudio se presentó un resultado falso positivo (2%) tanto con la tinción de blanco de calcoflúor y la inmunofluorescencia directa. Se presentaron 4 resultados falsos negativos con la tinción de blanco de calcoflúor (23 %); 2 con la inmunofluorescencia directa (15.38 %) y 1 para la PCR convencional (7.69 %). En conclusión la tinción de blanco de calcoflúor no es un método adecuado para la identificación de *P. jirovecii* en LBA de pacientes pediátricos con neumonía, la inmunofluorescencia directa y la PCR convencional mostraron ser mejores métodos para la identificación de *P. jirovecii*, aunque la PCR convencional mostró tener mejor eficiencia para la identificación del hongo en este tipo de pacientes.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

Los miembros del género micótico conocido como *Pneumocystis* fueron identificados por primera vez en 1909 por Carlos Chagas al observar al hongo en pulmones de cerdos de Guinea infectados experimentalmente con *Trypanosoma cruzi*. El Dr. Chagas pensó que se trataba de una nueva forma de vida del *T. cruzi*. En 1910, Antonio Carini identificó organismos que morfológicamente eran muy similares a los de *Trypanosoma luwisi*, y creyó que se trataba de un nuevo tipo de *Trypanosoma*. En 1912, Delanoë y Delanoë, revisando los datos de Carini y observando los quistes en pulmones de ratas parisinas en el Instituto Pasteur de París, concluyó que se trataba de un organismo diferente al *Trypanosoma*, y lo denominó *Pneumocystis carinii* en alusión al tropismo que tiene el organismo por el tejido pulmonar y en honor a Antonio Carini (1).

Poco antes de la Segunda Guerra Mundial, médicos alemanes describieron una forma epidémica de neumonitis de células plasmáticas de etiología desconocida que afectó a niños desnutridos (2). La primera relación entre una infección por *Pneumocystis* fue sugerida en 1942 cuando Van der Meer y Brug observaron *Pneumocystis* en cortes de pulmón de un niño fallecido por neumonitis de células plasmáticas (3). Esta observación fue ignorada por una década, hasta que en 1951 y 1952, los patólogos checos Vanela y Jiroveci reportaron la asociación de *Pneumocystis* en el pulmón de un niño prematuro y desnutrido con neumonitis intersticial de células plasmáticas (4). Hacia finales de la década de los ochenta, la prematurez y la desnutrición fueron causas importantes de neumonía por *Pneumocystis* (PcP: *Pneumocystis pneumonia*). Alrededor de 3346 casos de PCP fueron reportados alrededor del mundo, 2281 (68%) ocurrieron en niños con

desnutrición o prematuridad (5). En 1955, Weller observó que la administración de dexametasona por tiempo prolongado en ratas provocó la infección por *Pneumocystis*. En la década de los sesenta, *Pneumocystis* comenzó a ser reconocido como un patógeno oportunista en niños inmunodeprimidos con leucemia aguda o con inmunodeficiencias primarias con alteración en la función de los linfocitos T (7,8). En 1981, la PCP fue la primera infección reportada en hombres homosexuales de los Estados Unidos que presentaron el cuadro de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (9, 10). Con la extensión de la epidemia del SIDA ocurrió un ascenso dramático en la incidencia de PCP. Durante los años ochenta, la PCP fue la enfermedad que definió al SIDA en más de la mitad de los adolescentes y adultos infectados por el virus de inmunodeficiencia humana en Estados Unidos (11). La introducción de la terapia profiláctica anti-*Pneumocystis* en 1989 y la terapia antirretroviral combinada en 1996 provocaron un descenso substancial en la incidencia de la PCP en individuos infectados por el VIH (12, 13). Sin embargo, la *Pneumocystosis* permanece como una de las principales causas de infección oportunista, de morbilidad y mortalidad en personas infectadas por el VIH que no reciben o son resistentes a la terapia antirretroviral altamente activa (HAART) y aquellos cuyo diagnóstico de infección por VIH no ha sido realizado (14). La PCP también es de importancia clínica en personas inmunodeprimidas VIH negativas, como aquellos pacientes que reciben tratamiento inmunosupresor o quimioterapia antineoplásica.

## 2.2 TAXONOMIA

*Pneumocystis* es considerado como una entidad taxonómica única (designado como *P. carinii*). Investigaciones recientes demuestran que el género *Pneumocystis* es un grupo complejo de numerosas especies. Basados en el criterio morfológico y la respuesta

de la infección al tratamiento con pentamidina se clasificó a este organismo como un protozoario. En 1988, Edman y Stringer demostraron que las secuencias de mRNA de *P. carinii* están más relacionadas con secuencias de hongos que con aquellas de protozoarios (15, 16). Los análisis filogenéticos recientes ubican a *Pneumocystis* en el reino Fungi. Actualmente las especies de *Pneumocystis* están clasificadas dentro del Phylum Ascomycota, en una única clase, orden y familia (*Pneumocystidomycetes*, *Pneumocystidales* y *Pneumocystidae*, respectivamente) (17). Sin embargo, *Pneumocystis* es un hongo microscópico atípico: a) es incapaz de crecer en medio de cultivo micótico; b) responde a agentes antiparasitarios como la pentamidina y cotrimoxazol; c) su membrana plasmática contiene colesterol en lugar de ergosterol, lo cual explica la ineficacia de la anfotericina B para el tratamiento de la PcP.

En 1976, Frenkel notó diferencias fenotípicas entre los organismos de *Pneumocystis* de diversos mamíferos y propuso nombrar al organismo que infecta al humano como una especie diferente (18). Lo nombró *Pneumocystis jirovecii*, en honor al patólogo Jiroveci, quien reportó al organismo en humanos. El nombre no fue aceptado al inicio. La primera evidencia de diferencias moleculares entre los organismos de *Pneumocystis* en humanos y animales de laboratorio provino del análisis del tamaño de las proteínas (19). Sin embargo, la variabilidad inter-especie en el tamaño de las proteínas dificultó la diferenciación de las especies, posiblemente por la modificación proteica mediada por el huésped, presencia de microorganismos muertos o contaminación con patógenos diferentes.

Los análisis del ADN proporcionaron la evidencia de la divergencia genética entre las especies de *Pneumocystis* (20). Las secuencias de mRNA de la subunidad 18S de

*Pneumocystis* obtenido del humano y el obtenido de la rata difieren en 5%. Muchos otros genes o fragmentos de éstos han sido analizados (21-28). En todos los casos, la secuencia de los genes difiere entre especies. Más aún, experimentos en ratas, ratones y primates han demostrado la especificidad de especie de *Pneumocystis* para su hospedero (29-31).

En el año 2001, en el Taller Internacional sobre Parásitos Oportunistas, el grupo de expertos discutieron la nomenclatura de *Pneumocystis* y propusieron renombrar al microorganismo *P. carini* como una especie dentro del género *Pneumocystis*, y abrieron las guías de creación de nuevos nombres para especies (32). *Pneumocystis jirovecii* fue elegido para designar a la especie que infecta a los humanos y *Pneumocystis carinii* para una de las dos especies que infectan a las ratas. Los análisis de ADN demuestran la existencia de polimorfismo en aislados de *P. jirovecii*, sugiriendo la existencia de múltiples cepas (20). El nombre correcto y válido de acuerdo al Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICBU) es *Pneumocystis jirovecii* para la especie que infecta al hombre. Sin embargo, actualmente la nomenclatura y taxonomía de este organismo continúa en controversia (33-35).

## **2.3 BIOLOGÍA E INMUNOPATÓGENIA DE *Pneumocystis jirovecii*.**

### **2.3.1 CICLO BIOLÓGICO**

Se han realizado muchos intentos por cultivar a *Pneumocystis jirovecii* con una gran variedad de técnicas, sin embargo no se han obtenido resultados satisfactorios. Los estudios del ciclo biológico de *P. jirovecii* están basados principalmente en el estudio de las formas observadas en pulmones infectados, a través de la microscopía de luz y electrónica (36). Existen dos formas morfológicas conocidas en el ciclo biológico del

hongo: el trofozoíto y el quiste. El trofozoíto es pequeño, de 1 a 4  $\mu\text{m}$ , y predomina sobre la forma quística durante la infección en una relación aproximada de 10 a 1. El quiste maduro mide de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de diámetro. Existen reportados tres estadios intermedios de la forma quística: prequiste temprano, intermedio y tardío. Se ha propuesto la hipótesis de que la forma de trofozoíto puede conjugarse y desarrollarse dentro de quistes en maduración con ocho núcleos intraquísticos y que al alcanzar la madurez el quiste se rompe y libera a los trofozoítos (fig. 1). Este modelo es compatible con el ciclo biológico de los demás hongos *Ascomycetos*. Sin embargo, cómo el estadio de enquistamiento es un paso obligado para la replicación de los trofozoíto permanece en controversia (37).

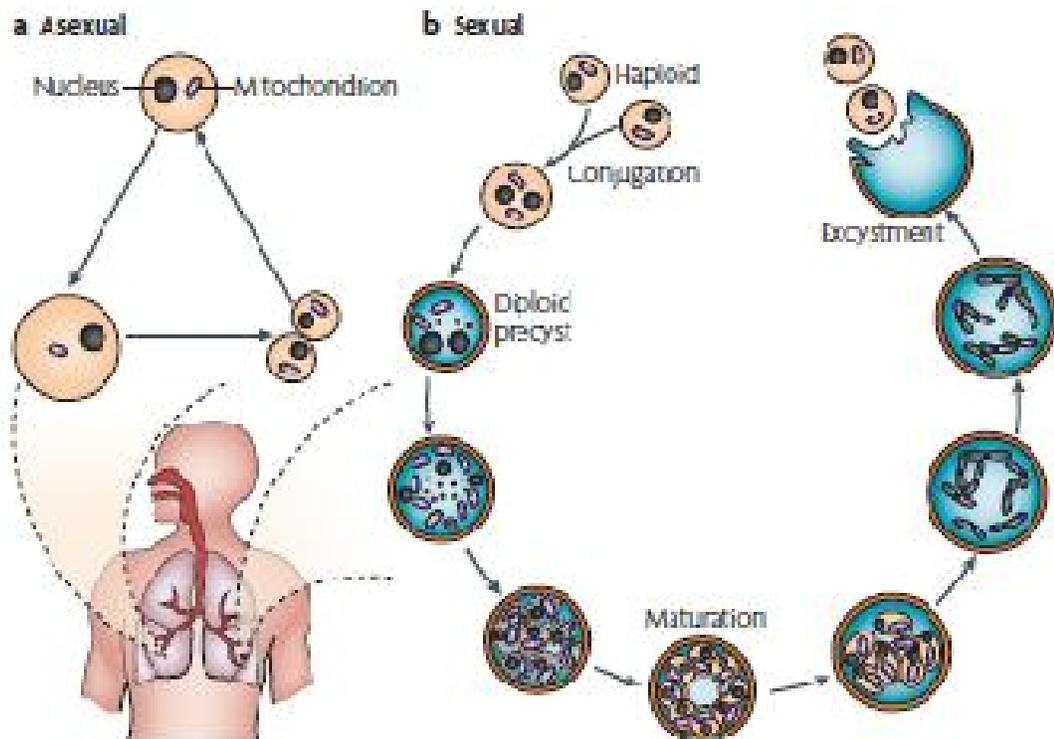


Fig. 1. Ciclo biológico de *P. jirovecii*. Tomado de Nature Reviews Microbiology 2007; 5:298-308.

### 2.3.2 INTERACCIÓN DE *P. jirovecii* CON LAS CÉLULAS DEL HOSPEDERO

En un hospedero infectado, *Pneumocystis* existe casi siempre en los alveolos pulmonares. Los trofozoitos se unen a las membranas plasmáticas de las células del epitelio alveolar, a través de interdigitación de sus membranas celulares. El análisis ultraestructural muestra que la adherencia es por aposición estrecha de las superficies celulares sin fusión de las membranas o cambios en las partículas intra-membranosas (38, 39). Estudios realizados con células epiteliales muestran que la adherencia de *Pneumocystis* no altera a la célula epitelial alveolar ni su función de barrera (36). *Pneumocystis* mantiene vida extracelular dentro de los alveolos pulmonares, probablemente obteniendo nutrientes esenciales del fluido alveolar o de otras células (39). La unión de *Pneumocystis* a la célula epitelial alveolar es facilitada por la fibronectina y la vitronectina, presentes en el fluido alveolar. Estas proteínas cubren a la superficie del hongo y posteriormente median su unión, probablemente a través de integrinas, así como de receptores epiteliales fijadores de manosa (37). La interacción de *Pneumocystis* con la célula epitelial alveolar y macrófagos alveolares desencadena una respuesta celular tanto en el hongo como en las células del hospedero. Está demostrado que la unión del hongo a la célula epitelial alveolar aumenta la proliferación, a través de la activación de vías de señalización mediadas por cinasas (37). La adherencia del hongo también inhibe el crecimiento de las células epiteliales pulmonares a través de vías de regulación dependientes de ciclina (39-41).

Los macrófagos alveolares son fagocitos residentes que median la eliminación del hongo del pulmón. Los macrófagos alveolares cultivados de roedores pueden fijar y captar al hongo, a través de la interacción de sus receptores de manosa con la

glicoproteína mayor de superficie (Mgs) de *Pneumocystis*, así como a través de la interacción de los receptores de dictina-1 del macrófago y el  $\beta$ -glucano del hongo. Las IgG pueden facilitar esta interacción célula-hongo a través de la opsonización del hongo (36). Una vez internalizado es incorporado en fagolisosomas y degradado (36). El papel esencial de los macrófagos en el control de la PcP ha sido demostrado en modelos animales. La eliminación del hongo está alterada importantemente en animales depletados de macrófagos (42). El bloqueo de la apoptosis de los macrófagos inducida por *Pneumocystis* aumenta la resistencia del huésped a la infección y prolonga la supervivencia del modelo animal (43). La fagocitosis, el estallido respiratorio y la activación de los macrófagos alveolares está alterada en los individuos infectados por el VIH y pueden contribuir a la patogenia de la infección (44, 45).

El control inmunológico de *Pneumocystis* también involucra la producción de quimiocinas y citocinas inflamatorias producidas por los macrófagos alveolares y las células epiteliales (36). La evidencia muestra que las moléculas de  $\beta$ -glucano de la pared celular de *Pneumocystis* son componentes importantes de que conducen al inicio de la respuesta inflamatoria en la PcP. Los macrófagos expresan gran cantidad de receptores a  $\beta$ -glucano, incluyendo a la dictina-1, al TLR-2 y a CD11b/CD18 (CR3), cuya unión inicia una cascada de señalización que resulta en la activación de NF- $\kappa$ B y la subsecuente estimulación de la expresión de genes de la respuesta inflamatoria, como el del TNF y la IL-8 (36). Los receptores de dictina-1 y de CR3 están ausentes en las células epiteliales y los que participan es dichas células son receptores para lactoseramida y otros más, que incluyen a los TLRs, y que inician la señalización inflamatoria en respuesta a los  $\beta$ -glucanos (36).

### 2.3.3. RESPUESTA INMUNE A LA NEUMONIA POR *Pneumocystis jirovecii* (PcP).

Los patrones de reconocimiento estimulan la liberación de quimiocinas y citocinas inflamatorias, las cuales promueven el reclutamiento y activación de neutrófilos y linfocitos. Los linfocitos CD4+ son esenciales para el control de la infección por *P. jirovecii*. La depleción de los linfocitos CD4+ en ratones aumenta la susceptibilidad a la infección y la cual se resuelve cuando dichos ratones son repoblados con linfocitos CD4+ esplénicos (37, 46). La reconstitución de los linfocitos CD4+ en ratones con inmunodeficiencia combinada severa elimina la infección por *Pneumocystis* (37, 47-49). Los linfocitos CD4+ coordinan la respuesta inflamatoria del hospedero al reclutar y activar a células efectoras adicionales como los monocitos y los macrófagos, las cuales son responsables de la eliminación del hongo. En contraste a los linfocitos CD4+, los linfocitos CD8+ tienen un papel más controversial en la defensa contra *Pneumocystis*. La reconstitución de los linfocitos CD8+ en ratones con inmunodeficiencia combinada severa no protege contra la infección, y los ratones silvestres depletados de linfocitos CD8+ son resistentes (47-49). Sin embargo, los linfocitos CD8+ pueden proporcionar un efecto benéfico, particularmente en la deficiencia crónica de los linfocitos CD4+. Por ejemplo en ratones depletados de linfocitos CD4+ y CD8+ desarrollan una infección más severa que aquella que desarrollan los ratones depletados únicamente de linfocitos CD4+ (47, 50).

La respuesta inflamatoria puede ir en detrimento del hospedero, como lo muestra el modelo de ratones con inmunodeficiencia combinada severa infectados con *Pneumocystis* que tienen preservada la función pulmonar hasta que la enfermedad alcanza un estadio tardío (36), y que son reconstituidos con células esplénicas intactas y desarrollan una respuesta inflamatoria intensa mediada por linfocitos T CD4+ y CD8+, ocasionando

alteraciones en el intercambio gaseoso y de la función pulmonar (51). Tanto los linfocitos CD4+ y CD8+ pueden ocasionar una respuesta inflamatoria deletérea en el hospedero. La reconstitución de linfocitos CD4+ en ratones con inmunodeficiencia combinada severa puede resultar en una respuesta inflamatoria exagerada que conduce a la muerte del hospedero (48). Otras investigaciones demuestran que la hipoxia y el daño pulmonar en ratones dependen de la presencia de linfocitos CD8+ en el pulmón (51, 52).

Además de los linfocitos T, los neutrófilos también participan en la inflamación pulmonar durante la PcP. El reclutamiento de neutrófilos está estrechamente relacionado con la lesión pulmonar en humanos (53). La IL-8 está relacionada con la infiltración de neutrófilos y alteración del intercambio gaseoso durante la PcP severa en humanos (54, 55). Los niveles de IL-8 en lavados bronquioalveolares puede ser predictor de la falla pulmonar y la muerte por PcP (55). Los neutrófilos reclutados liberan proteasas y especies reactivas del oxígeno (ERO), que lesionan directamente a las células epiteliales y a las células del endotelio capilar. Sin embargo, en ratones depletados de linfocitos CD4+, *Pneumocystis* induce una lesión pulmonar similar en ratones con función fagocítica normal o alterada, sugiriendo que la inflamación mediada por los linfocitos CD8+ puede ser la responsable directa de la lesión pulmonar, más que la inflamación mediada por los neutrófilos durante la PcP en modelos de ratón (56).

#### **2.4. EPIDEMIOLOGÍA.**

Existen reportes en los cuales se ha logrado aislar ADN de *P. jirovecii* en el aire alrededor de arboles de manzana y en la superficie de agua estancada; sin embargo, no se ha identificado con certeza el nicho ecológico del hongo (57-60). Por otro lado, estudios de seroprevalencia de anticuerpos anti-*Pneumocystis* en niños

inmunocompetentes demuestran el contacto con el hongo a edades tempranas. En un estudio español realizado en 3 zonas rurales muestra una seroprevalencia del 73% en niños entre los 6 y 13 años de edad (61). También se ha observado un incremento de la seroprevalencia relacionado con la edad: 52% en niños de 6 años, 66% en niños de 10 años y de 80% en niños de 13 años. Los estudios seroepidemiológicos internacionales muestran que *Pneumocystis* tiene distribución mundial, pero la prevalencia de anticuerpos sí varía de acuerdo a la región geográfica. Más aún, en un estudio dirigido en un área urbana de Chile la seroprevalencia de anticuerpos anti-*Pneumocystis* alcanzó el 85% a los 20 meses de edad (62). La infección primaria probablemente es asintomática, pero se ha realizado un análisis detallado para determinar la existencia de algún cuadro clínico relacionado a la infección. En un estudio reciente se sugiere que la infección por *P. jirovecii* se puede manifestar inicialmente como una infección de vías respiratorias altas en niños menores de nueve meses, predominantemente entre los 1.5 a 4 meses (63).

Por décadas se tuvo la teoría de la reactivación de la infección latente por *P. jirovecii* adquirida en la infancia. Sin embargo, la evidencia epidemiológica y experimental va en contra de esta teoría. El agrupamiento geográfico de casos de PcP en áreas urbanas ha sido observado (64, 65) y los genotipos encontrados en pacientes son similares a los que se encuentran en el ambiente donde habita el propio paciente, pero diferentes a los genotipos presentes en el lugar de nacimiento o infancia del paciente (66, 67). Alguna evidencia experimental muestra argumentos contra la reactivación de la infección latente. Ratones adultos sanos inoculados con *Pneumocystis* eliminan la infección de los pulmones en tres semanas, mientras que el proceso es un poco más largo en neonatos (68).

Actualmente, estudios en humanos y animales inferiores apoyan el modelo de la transmisión aérea de *P. jirovecii*. Estudios en modelos animales demuestran que *Pneumocystis* es transmisible y la vía de transmisión es la aérea, pues la exposición de animales colonizados con el hongo conduce a la colonización en animales sanos y el desarrollo de la enfermedad clínica en animales inmunocomprometidos (69-71). Más aun, se ha demostrado la presencia de ADN de *Pneumocystis* en filtros de las jaulas de ratas Wistar infectadas con el hongo (72) y la transmisión de *Pneumocystis* sin contacto físico desde ratas infectadas a las ratas libres del hongo (73).

Existen numerosos reportes de brotes de PcP, la mayoría de los cuales han sucedido en pacientes receptores de trasplante renal (74-79). Los análisis moleculares de *P. jirovecii* de algunos de estos estudios demuestra la adquisición nosocomial de la infección (80-82). A pesar de que los modelos animales y humanos muestran evidencias a favor de la transmisión aérea, se desconoce el papel del contacto persona a persona como vía de transmisión del hongo.

El papel de la colonización en humanos debe de tomar mayor importancia en la transmisión de *Pneumocystis*. Se ha demostrado un ciclo permanente de colonización-eliminación en los humanos, incluso con mayor frecuencia que en los modelos animales (71, 82). Muchos reportes indican que el ADN de *Pneumocystis* es detectado en el tracto respiratorio sin aparición de manifestaciones clínicas; esta situación se ha denominado como colonización o estado de portador. La prevalencia de colonización por *Pneumocystis* es baja, variando los reportes del 0 al 20% según el estudio (84, 85). Sin embargo, se puede explicar esta variación por la utilización de diferentes métodos de detección y de diferentes tipos de muestras; además de la variabilidad geográfica y

ocupacional de las poblaciones estudiadas. Algunos grupos de pacientes están en mayor riesgo de colonización: en los individuos infectados por el VIH es más común la colonización que en otros grupos. La colonización por *Pneumocystis* ha sido demostrada en pacientes con diagnóstico clínico y de laboratorio diferentes a la PcP (86,88); y en pacientes que fallecieron de causas diferentes (89). Usando diferentes tipos de muestras respiratorias la prevalencia de la colonización varía del 31 al 68%, incluyendo a pacientes que recibieron profilaxis anti-*Pneumocystis* y pacientes con cuentas de linfocitos CD4+ menores a 200 células/ $\mu$ L.

La colonización por *P. jirovecii* también tiene mayor prevalencia en pacientes con enfermedades pulmonares crónicas (90-92). El padecimiento pulmonar crónico con mayor prevalencia de colonización es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) (37 al 55%) (93-95). El tabaquismo incrementa la posibilidad de colonización por el hongo (96). En individuos infectados con el VIH, el tabaquismo incrementó el riesgo de colonización (89), y desarrollo de PCP (97, 98).

La colonización por *P. jirovecii* también ocurre en otro tipo de condiciones médicas. Por ejemplo, de 86 pacientes con diabetes mellitus, mieloma múltiple, leucemia linfocítica crónica o sarcoidosis, 13 (16%) estuvieron colonizados por *P. jirovecii*, utilizando como método de detección la PCR anidada (99). El tratamiento con corticoesteroides puede favorecer la colonización. En un estudio de 93 sujetos sometidos a broncoscopia con toma de LBA y analizados por PCR para detección de *P. jirovecii*, 8 (44%) de 18 que recibían más de 20 mg de prednisona resultaron colonizados, comparado con 9 (12%) de los 75 que no recibieron ninguna dosis de prednisona (100). El embarazo también puede ser un factor de riesgo para la colonización según lo refiere un estudio, y en el cual

reportan que el 16% de los embarazos que cursan el tercer trimestre resultaron colonizados, sugiriendo que la inmunodepresión fisiológica asociada al embarazo favorece la colonización por el hongo (101).

La alta seroprevalencia de anticuerpos anti-*Pneumocystis* en niños sugiere que la colonización por *P. jirovecii* ocurre con mayor frecuencia en la infancia; además de que los niños pueden ser los reservorios del hongo. La colonización ha sido demostrada, por la PCR anidada y en tiempo real, en el 15% de aspirados nasofaríngeos de niños mayores de 2 años de edad hospitalizados por bronquiolitis o en otras infecciones respiratorias agudas y sin evidencia de PcP (62, 63, 102, 103). Estructuras de *P. jirovecii* se han identificado en el 32% de las autopsias de niños de entre 5 días y un año de edad que fallecieron por el síndrome de muerte súbita infantil u otras causas (incluyendo situaciones médicas y lesiones), utilizando inmunohistoquímica o tinción de Gomori (104). La observación de colonización en neonatos humanos sugiere la transmisión vertical como una vía alterna para la transmisión de *P. jirovecii*. Un estudio reciente apoya esta hipótesis ya que demuestra la presencia de ADN del hongo en 11 pulmones y 8 placentas de 20 fetos abortados de madres inmunocompetentes (105).

La consideración de la posible transmisión nosocomial de *P. jirovecii* proviene de estudios de colonización en trabajadores de la salud, pues se ha encontrado una mayor frecuencia en aquellos trabajadores de la salud que están en contacto estrecho con pacientes con diagnóstico de PcP que en aquellos que no tienen contacto con este tipo de pacientes (106, 107). En contraste, estudios previos no encontraron colonización en lavados orofaríngeos de trabajadores de la salud expuestos a pacientes con PcP (108). Es más, se demostró que las cepas de *P. jirovecii* fueron diferentes genotípicamente entre

los pacientes y los trabajadores que estuvieron en contacto con ellos (106), por lo cual se considera que se deben de realizar más estudios para aclarar el impacto de los portadores asintomáticos en la dinámica de trasmisión de *P. jirovecii*.

## **2.5. GRUPOS DE RIESGO PARA NEUMONIA POR *P. jirovecii*.**

Existen varios grupos de poblaciones que son susceptibles a la colonización por *P. jirovecii* con consecuencias clínicas importantes. Los individuos colonizados pueden desarrollar PcP (109, 110). Estos grupos pueden servir como reservorios para mantener la trasmisión del hongo a otros pacientes.

### **2.5.1. Infección por VIH**

Durante la infección por el VIH, los niveles de linfocitos CD4<sup>+</sup> circulantes y el control de la replicación viral son predictivos del riesgo de pneumocystosis. La PcP se desarrolla principalmente en pacientes con cuantas de linfocitos CD4<sup>+</sup> menores a 200 cél/μL o 15% de las células T; además de aquellos pacientes cuya replicación viral no está controlada (114-116). Sin embargo, aproximadamente del 10 al 15% de los casos de PcP ocurre en individuos con cuentas de linfocitos CD4<sup>+</sup> mayores a 200 cél/ μL (117). Llama la atención que los infantes infectados por el VIH tienden a desarrollar la neumonía con cuentas de linfocitos CD4<sup>+</sup> alrededor de 200 cel/μL. Estos datos sugieren que la depleción de linfocitos CD4<sup>+</sup> no es totalmente responsable de la susceptibilidad a la pneumocystosis. Actualmente se considera que los individuos infectados con el VIH que desarrollan PcP se explica por no estar diagnosticados de la infección por el VIH o porque no tienen acceso al tratamiento contra el VIH (118). Considerando estas últimas premisas la

pneumocystosis continua siendo la infección oportunista más frecuente en países subdesarrollados (119).

### **2.5.2. Inmunocomprometidos VIH negativos.**

A partir de la utilización de la profilaxis anti-*pneumocystis* y la HAART en pacientes infectados por el VIH, la mayoría de los casos de PcP se presentan en pacientes inmunocomprometidos VIH negativos en pacientes industrializados (120, 121) y cuya incidencia continua incrementándose en dichos pacientes (122, 123). Los individuos que se incluyen en este grupo son aquellos con inmunodeficiencias primarias; inmunodeficiencias secundarias debidas a enfermedades hematológicas malignas y tumores sólidos; receptores de trasplante de órgano sólido o de médula osea; y pacientes con trastornos de la colágena y vasculatura (principalmente en la granulomatosis de Wegener). No existe ningún indicador biológico cuantitativo que correlacione claramente con el riesgo para desarrollar PcP en estos grupos de pacientes, a diferencia del caso de la infección por VIH. Más aún, la PcP que desarrollan este tipo de pacientes es con cuentas de linfocitos CD4+ normales (124). Los factores de riesgo más importantes son la terapia con corticoesteroides por periodos prolongados y la terapia citotóxica (122, 125).

#### **2.5.2.1. Inmunodeficiencias primarias**

Los niños con inmunodeficiencias primarias presentan mayor riesgo de desarrollar PcP. En este grupo la neumonía se presenta antes del primer año de edad, y con frecuencia desenmascara al trastorno inmunológico. En la mayoría de los casos se ha reportado una alteración en la función de los linfocitos T (8, 126-131). La inmunodeficiencia combinada severa y el síndrome hiper IgM ligado al X presentan mayor riesgo (8, 126-134). La susceptibilidad esta mediada celularmente (135) y la terapia con

inmunoglobulina no previene la infección (133, 136). En el caso de la deficiencia para linfocitos B, la neumonía es rara y ocurre en niños de pocos meses de edad. La PcP es extremadamente rara en las inmunodeficiencias primarias de células fagocíticas como en el caso de la enfermedad granulomatosa crónica (137-139).

### **2.5.2.2. Enfermedad hematológica maligna.**

Las leucemias y los linfomas son condiciones especialmente inmunosupresivas subyacentes al momento de hacer el diagnóstico PcP en pacientes VIH negativos (123, 124, 139, 140). Históricamente los pacientes con leucemia linfoblástica aguda son los que presentaban mayor riesgo de desarrollar la PcP. Se ha observado una mayor tasa de PcP en pacientes con leucemia linfoblástica aguda que en el mieloblástica aguda, resultado de las altas dosis de cortico-esteroides utilizadas en el tratamiento de las primeras. Sin embargo, con el uso rutinario de la profilaxis anti-*pneumocystis* la incidencia ha descendido del 21% al 0.17% según algunos reportes (128). Por tal motivo, la tasa de incidencia actual de PcP es mayor en otras enfermedades hematológicas malignas: 0.34% en pacientes con linfoma y de 0.32% en pacientes con leucemia diferente a la linfoblástica (123, 125).

Algunos esquemas de tratamiento aplicados a pacientes con enfermedad hematológica maligna incrementan la inmunosupresión y por lo tanto incrementan el riesgo de PcP. La mayoría de los pacientes reciben cortico-esteroides al momento del diagnóstico (124, 125, 139-141). Los análogos de las purinas, utilizados con frecuencia en el tratamiento de las enfermedades linfoides crónicas malignas ocasionan inmunosupresión a expensas de células T, y conlleva a la predisposición a infecciones oportunistas, entre ellas a la PcP (142-144). Otros agentes citotóxicos relacionados al

incremento en el riesgo de PcP son la citarabina, la vincristina, la ciclofosfamida y el metrotexate (123, 124, 145, 146). Las terapias con anticuerpos monoclonales desarrolladas en años recientes para el tratamiento de enfermedades malignas linfoides pueden causar depleción linfocitaria ocasionando inmunodeficiencia celular predisponiendo a la PcP (147-150). El rituximab incrementa el riesgo de PcP en pacientes que reciben CHOP-14 y CHEOP-14 (151-152).

### **2.5.2.3. Tumores sólidos.**

La PcP está incrementándose en los pacientes con tumores sólidos. Se considera que el uso de corticoesteroides es el factor predisponente más común. Se ha observado que la mitad de los pacientes con tumores sólidos que desarrollan la neumonía por *P. jirovecii* presentan un tumor cerebral primario o una metástasis, pero que estuvieron recibiendo dosis altas de corticoesteroides (153, 154). La PcP se ha reportado ocasionalmente en pacientes con cáncer que han sido tratados únicamente con quimioterapia (125, 155). Es de llamar la atención que la mayoría de los casos de PcP en pacientes con lesiones neoplasias cerebrales presentaron el tumor primario en el pulmón o en la glándula mamaria (125, 140). Una hipótesis sugiere que el tabaquismo y la radiación directa sobre los pulmones de estos pacientes incrementa el riesgo colonización por *P. jirovecii* y el desarrollo de PcP subsecuentemente.

### **2.5.2.4. Enfermedades inflamatorias y de la colágena.**

Estudios retrospectivos de casos de PcP en pacientes con enfermedades inflamatorias y de la colágena muestran que la mayoría de los pacientes recibieron corticoesteroides además de un segundo agente inmunosupresor (156). La incidencia más elevada de PcP en este tipo de pacientes se presenta en aquellos con

granulomatosis de Wegener: la incidencia fue del 6% en una serie de 180 pacientes que recibieron corticoesteroides y una terapia inmunosupresora adicional (157). Todos los pacientes presentaron linfopenia, y la PcP se presentó durante la terapia con corticoesteroides en el 90% de los pacientes.

Los pacientes con lupus eritematoso sistémico la PcP ha sido observada antes de la terapia inmunosupresora y puede estar asociada a cuentas linfocitarias de  $0.4 \times 10^9$  cél/L (5). Los pacientes con dermatomiositis o polimiositis con compromiso pulmonar y terapia con corticoesteroides a dosis altas tienen un alto riesgo de PcP (158-160). Incluso existen reportes de PcP fulminante en pacientes con dermatomiositis tratados con altas dosis de corticoesteroides y que previo a la terapia presentaban linfopenia (161). Los pacientes con colitis ulcerativa tratados con corticoesteroides incluso sin ciclofosfamida también presentan riesgo de desarrollar PcP (162, 163). El infliximab también incrementa el riesgo de PcP (164), así como la artritis reumatoide (165).

#### **2.5.2.5. Trasplante de órgano sólido.**

Los receptores de trasplante renal tienen una incidencia de PcP del 10 al 11% (5, 166) en ausencia de profilaxis. La mayoría de las PcP se presentan de 3 a 6 meses después del trasplante. Los factores de riesgo relacionados para desarrollar la neumonía incluyen el tratamiento previo de episodios de rechazo y los fármacos utilizados para mantener la inmunosupresión (ciclosporina, tacrolimus, sirolimus y micofenolato), aunque existen algunos reportes en los cuales no se ha confirmado (77, 78, 167-173). Sin embargo, la terapia inmunosupresora cambia constantemente y este factor puede modificar el riesgo de la infección (174, 175). El incremento en el uso de alemtuzumab y rituximab para el manejo del rechazo puede ocasionar un incremento de la incidencia de las

infecciones oportunistas en los receptores de trasplante de órgano sólido. Además de los factores antes mencionados, se han reportados brotes de PcP en receptores de trasplante renal, lo cual sugiere que la presencia del hongo en el ambiente del receptor puede incrementar el riesgo de neumonía (75).

Los receptores de trasplante cardiaco desarrollan la PcP con una incidencia del 5 al 41% (5). En receptores de hígado, el 10% desarrolla PcP (5, 123). La PcP es más frecuente en receptores de pulmón o de trasplante cardiopulmonar sin profilaxis que en otros órganos, con tasa que varían del 16 al 43% (5, 123).

#### **2.5.2.6. Trasplante de médula ósea o células madre hematopoyéticas.**

El trasplante de médula ósea alogénico y de células madre hematopoyéticas conlleva a inmunosupresión severa, la cual se extiende en el periodo postrasplante por meses o periodos más prolongados si existe enfermedad de hospedero contra injerto que requiere terapia inmunosupresora. El riesgo de desarrollar PcP se incrementa con el uso de injertos depletados de linfocitos T (125, 176). Antes del uso de la profilaxis con trimetropin/sulfametoxazol, el 9 al 16% desarrollaban PcP en el caso de receptores de médula ósea (5). La mayoría de los receptores que desarrollan PcP no están recibiendo la profilaxis adecuada anti-*pneumocystis* (177, 178).

#### **2.5.2.7. Otros trastornos.**

Además de las condiciones mencionadas anteriormente, la pneumocystosis es un hongo oportunista en pacientes con linfopenia idiopática de CD4+ (179). Se han reportado algunos casos de PcP en el síndrome de Good (180). También se han reportado casos en pacientes que no presentan factores predisponentes (180); la mayoría de ellos eran

ancianos y con manifestaciones pulmonares atípicas, como infiltrado focal y derrame pleural. Se ha reconocido la existencia de infecciones pero que no se habían identificado (182), y la presencia de inmunodeficiencia subyacente no de descarto.

La relación de los corticoesteroides y *P. jirovecii* cada vez más se ha enfatizado en pacientes con síndrome de Cushing y en niños con asma que son tratados con corticoesteroides, una situación que no había sido relacionada con ninguna infección oportunista (183-185).

## **2.6. PRESENTACIÓN CLÍNICA DE LA NEUMONÍA POR *P. jirovecii*.**

La PcP comúnmente se presenta con fiebre de bajo grado, tos no productiva y disnea progresiva. La exploración física es inespecífica, con auscultación pulmonar frecuentemente normal incluso en presencia de enfermedad importante e hipoxemia. La presencia de disnea aguda con dolor pleurítico puede indicar la presencia de neumotórax.

Los pacientes con SIDA y PcP tienen un número muy incrementado de organismos del hongo en sus pulmones con pocos neutrófilos, a diferencia de los pacientes sin SIDA (186). Este número mayor de organismos permite hacer un diagnóstico más fácil en esputo inducido o en lavado bronquioalveolar para confirmar la presencia del hongo, a diferencia de otras condiciones de inmunosupresión diferentes al SIDA. Los pacientes con síntomas moderados de neumonía por *P. jirovecii* pueden incluso ser tratados como pacientes externos; pero en presencia de hipoxemia severa deben de ser hospitalizados para realizar el diagnóstico preciso y otorgar terapia intravenosa. El desarrollo de neumonía grave con insuficiencia respiratoria es la causa más frecuente de ingreso a la

UCI en este tipo de pacientes. Entre más pacientes con PcP haya, la mortalidad es del 10 al 20% durante la infección inicial, pero la tasa se incrementa substancialmente con la necesidad de ventilación mecánica (187).

Los pacientes con PcP sin padecer SIDA típicamente se presentan con insuficiencia respiratoria aguda que puede estar relacionado con el incremento de la dosis de medicamentos inmunosupresores (125, 188). Los pacientes afectados tienen más neutrófilos y menos cantidad de organismos que los pacientes con SIDA que presentan la neumonía (187). La tasa de mortalidad en pacientes con PcP en pacientes sin SIDA esta reportada entre el 30 y 60%, dependiendo de la población de riesgo, con un mayor riesgo en los pacientes con cáncer que los receptores de algún trasplante o con enfermedades del tejido conectivo (189, 190).

La características radiográficas típicas de la neumonía por *P. jirovecii* son el infiltrado intersticial perihiliar bilateral que puede progresar a homogéneo y difuso conforme la neumonía progresa (Fig. 2) (191). Hallazgos menos comunes incluyen nódulos solitarios o múltiples, infiltrados del lóbulo superior en pacientes que reciben pentamidina en aerosol, neumatoceles y neumotórax. El derrame pleural y la linfadenopatía torácica son raras. Cuando la telerradiografía de tórax postero-anterior es normal, la tomografía computarizada, más sensible, puede revelar imágenes de vidrio esmerilado o lesiones quísticas (192).



Fig. 2: Telerradiografía de tórax P. A. que muestra infiltrado intersticial y alveolar mixto más prominente en el lado derecho. Esta imagen pertenece a un paciente con neumonía por *P. jirovecii*, que estuvo bajo tratamiento con corticoesteroides a largo plazo por una neuropatía inflamatoria. Tomada de N Engl J Med 2004; 350: 2487-98.

## 2.7. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE *P. jirovecii*.

*P. jirovecii* es un hongo que no ha podido ser cultivado realmente, por lo cual la identificación del hongo debe de ser realizada por la demostración microscópica o genética de las estructuras en muestras respiratorias de los pacientes.

### 2.7.1. Muestras.

Para identificar a *P. jirovecii* deben de analizarse muestras respiratorias obtenidas por esputo inducido, lavado bronquial, biopsia transbronquial obtenida por broncoscopia, lavado bronquioalveolar o biopsia abierta de pulmón. La identificación del hongo en muestras de esputo inducido fue muy popular hace algunos años, sobre todo en las áreas en las que la PcP tenía una alta incidencia (193-195). Los reportes sobre la utilidad de

este tipo de muestra varían ampliamente, reportando una sensibilidad desde el 15 al 92%, dependiendo del estudio y las condiciones de la obtención (196).

Los estudios sobre la utilidad del lavado bronquial muestran una sensibilidad baja para la identificación de *P. jirovecii* (197), por lo que prácticamente ha sido abandonado su utilización. La biopsia transbronquial ofrece una sensibilidad por arriba del 92% (198-205). Incluso en pacientes que recibieron pentamidina ofreció mayor sensibilidad que el lavado bronquioalveolar (199). Sin embargo, al ser una técnica invasiva para la obtención de la muestra, rara vez es utilizada con este propósito.

Se ha considerado al lavado bronquioalveolar como la muestra más adecuada para realizar la búsqueda e identificación de *P. jirovecii*, además de otros patógenos respiratorios (205). Algunos estudios reportan una sensibilidad del 97% cuando se realiza un solo lavado, pero que se incrementa hasta el 100% cuando son dos o más lavados (206).

Finalmente, aunque se continúa considerando a la biopsia abierta de pulmón como el estándar de oro para la búsqueda de *P. jirovecii*, rara vez es realizada, por ser el procedimiento más invasivo para este propósito (207); por tal motivo, actualmente se recomienda al lavado bronquioalveolar como la muestra más adecuada para realizar la búsqueda de *P. jirovecii*.

### **2.7.2. Métodos de identificación.**

Existen una cantidad importante de técnicas para la identificación de *P. jirovecii*, las cuales se pueden clasificar en: tinciones tradicionales, pruebas de inmunofluorescencia y pruebas de biología molecular.

### 2.7.2.1. Tinciones tradicionales.

Las tinciones de Wright-Giemsa modificadas (Diff-Quik) pueden ser utilizadas para la tinción de muestras de lavado bronquioalveolar y poder ser examinadas de forma rápida (208, 209). Ofrecen la ventaja de que no requieren un proceso de fijación especial, lo que ayuda a un rápido diagnóstico por el laboratorio (figura 3) (204). Desafortunadamente las tinciones modificadas de Wright son una forma indirecta de identificación y deben de ser interpretadas con cautela. La sensibilidad que ofrecen es baja cuando se comparan con otras tinciones (208, 209); especialmente cuando existe poca cantidad de estructuras del microorganismo, como en el caso de los pacientes trasplantados (204).

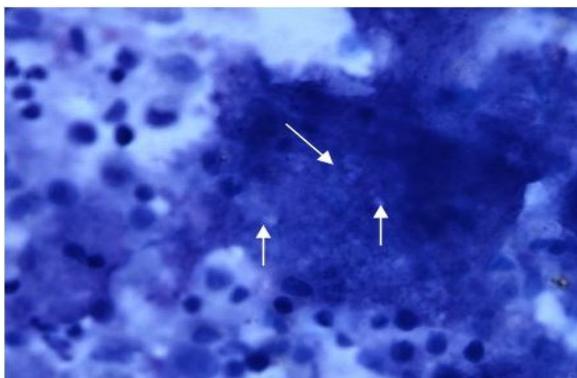


Fig.3: LAB teñido con tinción de Diff-Quik. Las flechas muestran células fantasmas que sugieren la presencia de *P. jirovecii*. 100X. Tomado de [www.ispub.com/ispub/ijpm/volume\\_7\\_number\\_1/](http://www.ispub.com/ispub/ijpm/volume_7_number_1/)

Las tinciones de Papanicolaou también han sido utilizadas para la identificación de material espumoso relacionado con la presencia de *P. jirovecii* en las muestras respiratorias (210, 211). Esta tinción es usada principalmente cuando se sospecha una cantidad abundante de microorganismo. La sensibilidad es similar a la tinción de Diff-Quik, pero menos útil que las tinciones de plata (212).

Por tal motivo, la tinción de la pared celular es más adecuada para el diagnóstico de *P. jirovecii*. Sin embargo, otros hongos también se tiñen, pero las diferencias morfológicas

entre unos y otros conducen al diagnóstico. En el caso de *P. jirovecii*, el tamaño de los quistes es uniforme y muy similar al tamaño de los eritrocitos. Este hongo tiende a formar agregados de estructuras micóticas pero con frecuencia se observan los quistes y los trofozoitos dispersos en la muestra (213). La tinción argéntica más empleada es la de Gomori-Grocott. Estas tinciones fueron consideradas como el estándar de oro para la identificación de *P. jirovecii*, hasta la llegada de las pruebas de biología molecular, pues ofrecen mejor sensibilidad y especificidad que las tinciones anteriores (figura 4) (209). Sin embargo, tienen la desventaja de que son técnicamente complicadas y laboriosas, necesitando invertir varias horas para su realización (212, 214).

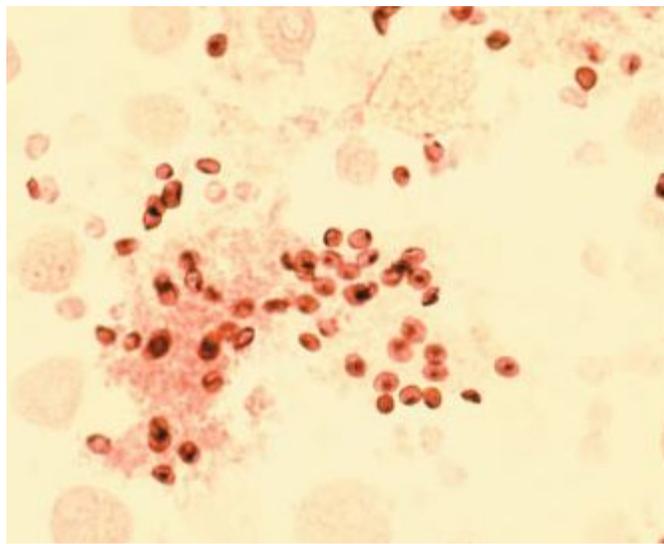


Fig. 4: Extensión de LBA en la que se observan formas quísticas de *P. jirovecii*. Tinción de Gomori-Grocott 400X. Tomada de N Engl J Med 2004; 350: 2487-98.

Aunque también se ha difundido el uso del azul de toluidina para la identificación microscópica de *P. jirovecii* (figura 5) (214). Sin embargo, cuando se compara con otras metodologías como la inmunofluorescencia directa o la PCR muestra una menor sensibilidad, aunque su especificidad es casi del 100% (215).

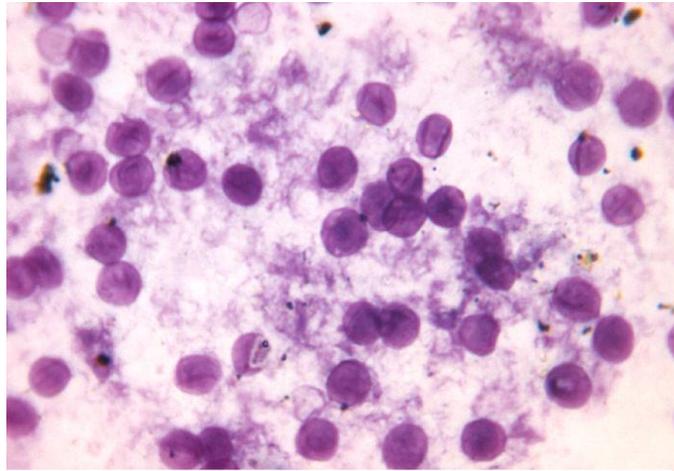


Fig. 5: LBA en el cual se aprecian abundantes formas quísticas de *P. jirovecii*. Tinción con azul de toluidina 100X. Tomado de Pathology 1994;26: 198-200.

Otros métodos utilizados para la identificación de *P. jirovecii* es a través de agentes quimiofluorescentes como el blanco de calcofluor, el cual se une a la quitina de la pared de los hongos y al ser excitado a determinada longitud de onda emite fluorescencia, permitiendo la visualización de las estructuras micóticas de *P. jirovecii* (216-218). La mayor ventaja que ofrece este tipo de tinción es la identificación rápida, especialmente cuando la muestra posee poca cantidad de estructuras micóticas, llegando a ser tan sensible como las tinciones argénticas (figura 6) (218).

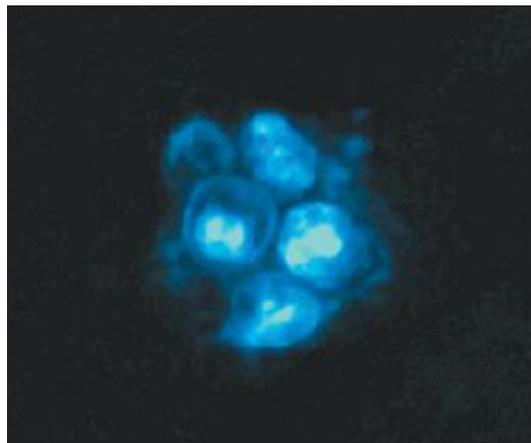


Fig.6: LBA en el que se aprecia un acumulo de quistes de *P. jirovecii*. Tinción con blanco de calcofluor 100X. Tomada de N Engl J Med 2004; 350: 2487-98.

### 2.7.2.2. Inmunofluorescencia.

Las tinciones inmunofluorescentes utilizan anticuerpos dirigidos contra *P. jirovecii* para su identificación directa en muestras respiratorias. Actualmente estas pruebas son usadas rutinariamente para la identificación de *P. jirovecii* en LBA o muestras de esputo inducido de pacientes de los que se sospecha neumonía causada por este hongo. Los reportes indican que tiene una mayor sensibilidad que las tinciones tradicionales. Sin embargo, existen reportes de algunos casos donde el resultado de esta prueba fue negativo y que al ser analizadas por PCR resultaron positivas para el hongo (219, 220).

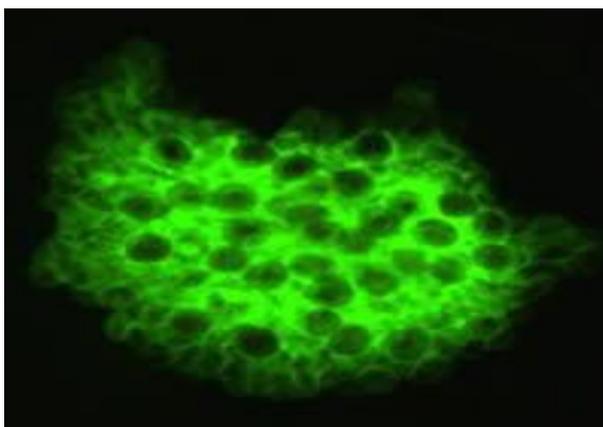


Fig. 7: LBA en el que se muestran abundantes formas quísticas de *P. jirovecii*, teñidas con anticuerpos monoclonales fluorescentes dirigidos contra el hongo. Tomada de [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov).

### 2.7.2.3. Identificación molecular.

Con la intención de mejorar el diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii* se han desarrollado varios métodos de reacción en cadena de la polimerasa, de los que destaca la PCR convencional, la PCR anidada y la PCR cuantitativa. Los reportes refieren una mejor sensibilidad de la PCR convencional en comparación de las técnicas microscópicas, pero algunos estudios revelan que posee un valor predictivo positivo bajo, lo cual limita su uso en la práctica clínica (221-223). El principal interés de la PCR convencional es su

valor predictivo negativo alto, permitiendo evitar las profilaxis anti-*P. jirovecii* (224). Sin embargo, en años recientes se han desarrollado métodos de PCR anidada para la detección y tipificación de *P. jirovecii* (225). En un estudio se encontró que todos los lavados bronquialveolares de pacientes con neumonía por *P. jirovecii* fueron positivos por este método y aquellos cuya neumonía por algún agente diferente fueron negativos por este método (225). Actualmente es la metodología considerada por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de los Estados Unidos como el estándar de oro para la identificación de *P. jirovecii*, especialmente cuando se realiza con el método denominado Pc-ITS-PCR (figura 8) (226). Sin embargo, actualmente se han desarrollado métodos de PCR en tiempo real, que permiten la identificación de *P. jirovecii* y la cuantificación del número de copias del microorganismo, permitiendo hacer la diferenciación entre los individuos colonizados y aquellos con neumonía por *P. jirovecii* (221, 223), pero los puntos de corte entre estos dos estadios no han sido estandarizados, por lo que esta metodología continúa siendo una herramienta de investigación.

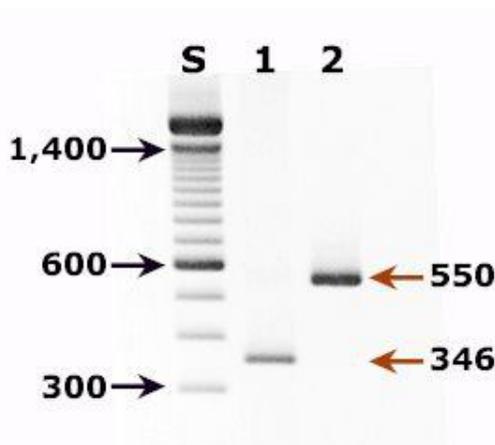


Fig. 8: Gel de agarosa 2% que muestra los productos amplificados de ADN extraído de LBA de sujeto con PcP. Carril S: Marcadores de peso molecular; carril 2: amplificación de PCR con el par de oligonucleótidos pAZ102-E/pAZ102-H: 346 pb; Carril 2: amplificación de ITS-PCR anidada con los oligonucleótidos, 1724F/ITS2R (primera ronda) e ITS1F/ITS2R1 (segunda ronda): 550 bp. Tomada de [www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En el laboratorio de micología médica del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” se realizó la identificación de *P. jirovecii* a través una prueba de inmunofluorescencia directa, pero la búsqueda del hongo solo es realizada cuando el médico tratante solicita su búsqueda intencionada. Sin embargo, un número importante de los pacientes atendidos en esta institución presentan algún grado de inmunosupresión, el principal factor predisponente para la colonización o la infección por el hongo. Por tal motivo, es necesario evaluar la posibilidad de implementar técnicas rápidas de tamizaje en los pacientes del hospital y técnicas que detecten a los individuos portadores del *P. jirovecii* y evitar la infección en los pacientes predispuestos a desarrollarla, pues los datos sobre la dinámica de transmisión muestran que los individuos colonizados son un reservorio importante para la diseminación de la infección en los pacientes inmunosuprimidos dentro del hospital.

#### 4. JUSTIFICACIÓN.

*Pneumocystis jiroveci* es uno de los microorganismos oportunistas más importantes que causa neumonía en pacientes inmunocomprometidos, principalmente en aquellos que padecen SIDA pero también en pacientes con cáncer o terapias inmunosupresoras. Si bien muchas pueden ser las causas de neumonía en estos pacientes, debe tenerse a *Pneumocystis jiroveci* como una de las primeras posibilidades diagnósticas, su pronta identificación significa la supervivencia del pacientes, además de que las características de la transmisión del hongo significa la posibilidad de contagio hacia otros pacientes y personal del hospital. El laboratorio de micología debe de ofrecer las técnicas adecuadas, aprovechando toda la infraestructura disponible, para la identificación rápida y precisa del hongo, a través de la validación del método, para proporcionar la mayor información útil y oportuna al médico tratante. Para que el laboratorio pueda decidir las metodología que empleara para la identificación de *Pneumocystis jiroveci* se debe de conocer el rendimiento de las pruebas al alcance del laboratorio, en las condiciones exclusivas de nuestro medio hospitalario. Basados en este principio decidimos realizar un estudio comparativo de técnicas de blanco de calcoflúor, la inmunofluorescencia directa (utilizada para la identificación de *Pneumocystis jiroveci* en el laboratorio de micología médica de Hospital Infantil de México), la PCR convencional y la técnica estándar de oro recomendada por el CDC de los Estados Unidos (PCR anidado), aprovechando la infraestructura de la que dispone el laboratorio clínico y la cual permite implementar técnicas alternativas a la implementada actualmente.

## **5. OBJETIVO.**

Realizar un estudio comparativo entre cuatro métodos de identificación para *Pneumocystis jirovecii* en lavados bronquio-alveolares de pacientes pediátricos con neumonía, para su implementación en el laboratorio clínico del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

## **6. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **6.1. Diseño del estudio.**

Este estudio es un análisis prospectivo, observacional, comparativo de prueba diagnóstica para evaluar diferentes métodos de detección de *P. jirovecii*.

### **6.2. Muestras clínicas.**

Las muestras clínicas utilizadas en este estudio fueron obtenidas de lavados bronquioalveolares (LBA) de pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de neumonía en el periodo comprendido del mes de diciembre del 2009 al mes de mayo del 2010, las cuales fueron enviados al laboratorio de micología médica del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” para búsqueda e identificación de estructuras micóticas.

El criterio de inclusión de las muestras en este estudio fue ser LBA con diagnóstico clínico de neumonía con sospecha de etiología micótica. El criterio de exclusión empleado fue el LBA de pacientes que estén bajo tratamiento con trimetropin-sulfametoxazol. Se eliminaron aquellas muestras de LBA que no tuvieran el volumen suficiente para realizar los cuatro métodos, que no hayan sido conservados en condiciones ideales para realizar alguna de las cuatro técnicas o que no hayan sido analizados por los cuatro métodos.

### **6.3. Preparación de las muestras:**

Todas las muestras de LBA incluidas en el estudio fueron separadas en dos aliquotas de 1 mL cada una. Las cuales fueron centrifugadas a 5000 *rpm* por 10 minutos a temperatura ambiente, eliminando el sobrenadante y resuspendiendo el sedimento en solución de NaCl al 0.85% estéril en una proporción 1:2. Una aliquota fue almacenada a

4°C para realizar los ensayos de PCR. La otra alícuota fue utilizada para realizar los extendidos para la tinción con blanco de calcoflúor y la inmunofluorescencia directa.

### **6.3.1. Tinción de blanco de calcoflúor:**

Se realizó un extendido del material obtenido del LBA con 50 µL de la muestra, se dejó secar a temperatura ambiente y posteriormente se fijó con metanol absoluto. La preparación fue cubierta con una solución de blanco de calcoflúor al 0.1% (Sigma, St Louis Missouri) diluida 1:10 en PBS a pH 7.2., por 10 minutos y se lavó con agua destilada. Se dejó secar a temperatura ambiente y se observó inmediatamente en microscopio de fluorescencia con filtro UV de 380-410 nm a 400 aumentos, en un tiempo promedio de 10 minutos por extendido.

### **6.3.2. Inmunofluorescencia directa:**

Para realizar esta prueba se utilizó una alícuota de 50 µL de LBA y se llevó a cabo el ensayo de inmunofluorescencia directa con anticuerpos monoclonales utilizando el kit MONOFLUO™ Pneumocystis IFA (Bio-Rad Laboratories, Inc. Redmond, WA). Las muestras se procesaron de acuerdo a las especificaciones del proveedor y una vez realizada la técnica se observaron al microscopio de fluorescencia con filtro UV de 490-510 nm a 400 aumentos para identificar los trofozoitos y los quistes de *P. jirovecii*. Cada muestra se leyó en un tiempo promedio de 15 minutos.

### **6.3.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):**

Para la detección de *P. jirovecii* por esta técnica se utilizó 1 mL de LBA, el cual fue centrifugado a 5000 rpm por 10 minutos a 22°C, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se incubó toda la noche a 37°C con 400 µL de amortiguador de proteínasa K (Tris [pH 7.5] 100 mM, SDS 0.5%, EDTA 30 mM) con 500 µg de proteínasa K (Boehringer Mannheim

Biochemicals, Indianapolis, Ind.) por mililitro. Después de la incubación se aisló el ADN por extracción con fenol-cloroformo y se realizó la precipitación con etanol según el protocolo de Lu J. J. y colaboradores (226). En el caso del control positivo la muestra se obtuvo de un fragmento de pulmón de un paciente fallecido por PcP (amablemente otorgada por la Dra. Rocio Peña, Departamento de Patología HIM FG), y que fue procesada de manera idéntica a las muestras de LBA. La muestra fue corroborada como positiva por la tinción de Gomori-Grocott (realizada en el Laboratorio de Técnicas Histológicas del Departamento de Histología, Facultad de Medicina de la UNAM) y cuya imagen representativa se muestra en la figura 9. Todo los reactivos, la infraestructura y la capacitación técnica necesaria para la realización de las técnicas de biología molecular fueron proporcionados amablemente por el Dr. Enrique Piña y la Dra. Magdalena Vilchis (Laboratorio 34 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UNAM).

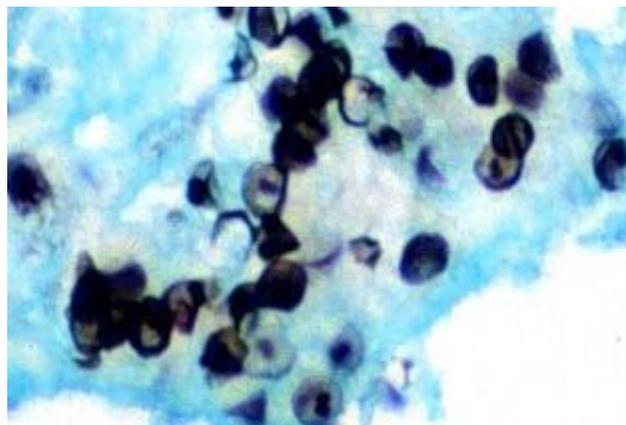


Fig. 9: Muestra representativa de corte de pulmón en la que se observan abundantes quistes y trofozoitos de *P. jirovecii*. Esta muestra fue utilizada para la extracción de ADN como control positivo para la realización de la PCR anidada. Tinción de Gomori-Grocott 100X.

### 6.3.3.1. PCR convencional.

Para la reacción de la PCR convencional se realizó de acuerdo al protocolo de Wakefield y colaboradores (227). La mezcla de PCR se realizó en un volumen de 50  $\mu\text{L}$ , la cual contiene 10 pmol de cada oligonucleótido: pAZ102E y pAZ102H, derivados del gen de la subunidad mitocondrial mayor de rRNA (*mtLSUrRNA*); 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP y 3 X dUTP); 3 mM de  $\text{MgCl}_2$ ; 5  $\mu\text{L}$  de buffer de PCR 10X; 1.25 U de *Taq* DNA polimerasa y 1 UI de uracil DNA glicosilasa (PCR Core Kit Plus; Roche molecular Biochemicals) y 500 ng de ADN de la muestra. El protocolo de la PCR que se siguió fue el siguiente: las fases de desnaturalización, alineación y extensión tuvieron una duración de 1 minuto cada una a 95, 58 y 72°C respectivamente. Las muestras de ADN se amplificaron por 40 ciclos. El producto específico amplificado (fragmento de 364 pb) fue separado en un gel de agarosa al 3% (Bio-Rad, CA, USA) y detectado después de teñirlo con SYBR Green I Nucleid Acid Gel Stain (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) bajo iluminación con luz UV (figura 10).

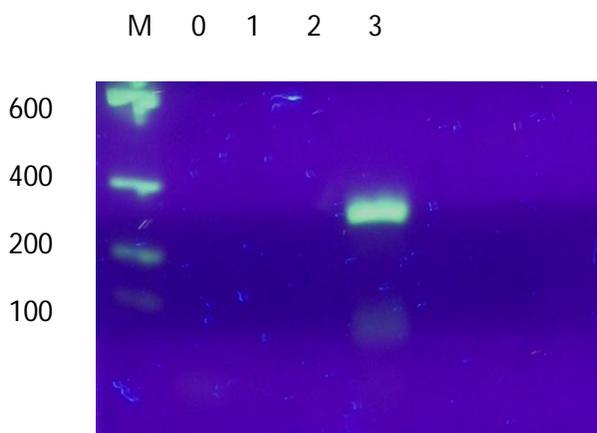


Fig. 10: Gel de agarosa al 3% en el que se muestra el producto de la amplificación de ADN de *P. jirovecii* en PCR convencional de muestra de pulmón infectado con el hongo. M: Marcador de peso molecular (pb), 0: sin mezcla de pcr, 1: mezcla sin primer ni ADN, 2: mezcla sin

### 6.3.3.2. PCR anidada

Los oligonucleótidos utilizados para la PCR anidada fueron: a) Primera reacción: 1724F: 5'-AAGTTGATCAAATTTGGTC-3' y ITS2R: 5'-CTCGGACGAGGATCCTCGCC-3'; b) Segunda reacción: ITS1F: 5'-CGTAGGTGAACCTGCGGAAAGGATC-3' e ITS2R1: 5'-GTTTCAGCGGGTGATCCYGCCTG-3'. En la primera reacción se siguió el siguiente protocolo: desnaturalización 94°C por 1 minuto; alineación 47°C por 1 minuto y extensión 72°C por 2 minutos durante 35 ciclos. La segunda reacción se realizó con desnaturalización 94°C por 1 minuto; alineación 58°C por 1 minuto y extensión 72°C por 2 minutos durante 35 ciclos. En la imagen 10 se muestra una imagen representativa del ADN de pulmón infectado con *P. jirovecii* utilizado como control positivo.

Para la realización de la PCR anidada se utilizaron 1000 ng de ADN extraído del fragmento del pulmón como control positivo y 500 ng de ADN obtenido de las muestras de LBA de cada paciente. La mezcla de reacción de la PCR anidada se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Lu JJ y colaboradores (226). El fragmento amplificado es de 550 pb después de la segunda ronda de amplificación, el cual se separó en un gel de agarosa al 3% (Bio-Rad, CA, USA) y se visualizó después de ser teñido con SYBR Green I Nucleid Acid Gel Stain (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) bajo iluminación con luz UV.

En la figura 11 se muestra una imagen representativa del control positivo utilizado para la validación de la PCR anidada.

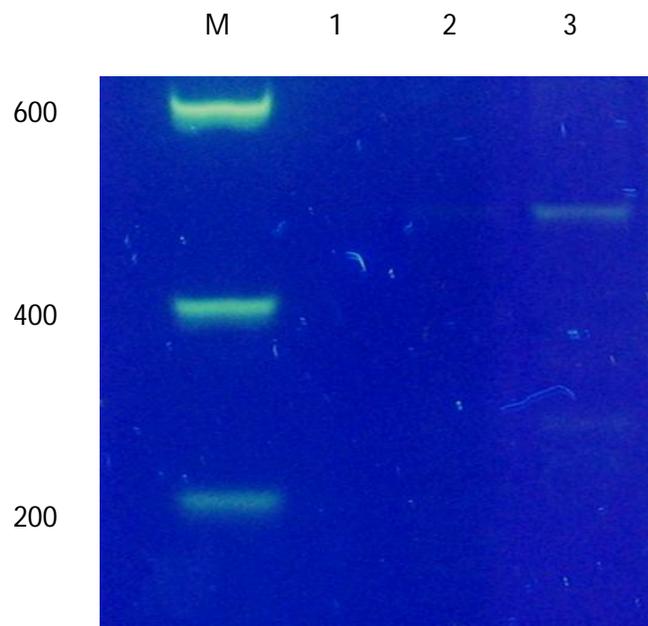


Fig. 11: Gel de agarosa (3%) en la que se muestra el producto de amplificación de 550 pb de ITS-PCR anidada para *P. jirovecii* . M: marcador de peso molecular, 1: reacción sin primers; 2: reacción sin ADN; 3: ADN pulmón infectado.

## 7. PRUEBAS ESTADÍSTICAS.

Para este estudio se analizó la significancia estadística a través de la prueba exacta de Fisher con  $p < 0.01$  utilizando el software SigmaStat 5 (CA. USA). Utilizando a la PCR anidada como el estándar de oro la sensibilidad, la especificidad, el valor predictivo positivo (VPP), el valor predictivo negativo (VPN) fueron definidas de la siguiente manera:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Especificidad} = \frac{VN}{VN + FP}$$

$$\text{VPP} = \frac{VP}{VP + FP}$$

$$\text{VPN} = \frac{VN}{FN + VN}$$

VP: verdaderos positivos.

FN: Falsos negativos.

VN: verdaderos negativos.

FP: falsos positivos.

## 8. RESULTADOS.

De los 63 lavados bronquioalveolares analizados, 40 (63.5%) fueron de pacientes masculinos y 23 (36.5%) fueron pacientes femeninos. Del total de lavados bronquioalveolares analizados 13 (20.6%) fueron positivos para *P. jirovecii* por la PCR anidada utilizada como prueba estándar de oro. De los LAB de pacientes masculinos el 25 % (10/40) resultaron positivos y de pacientes femeninas fue el 13% (3/23), encontrándose diferencia significativa de las proporciones entre los dos géneros ( $p < 0.05$ ). En la tabla 1 se muestran los resultados resumidos.

<b>Tabla 1: Número y proporción de LBA analizados por PCR anidada como prueba estándar de oro para detección de <i>P. jirovecii</i> de pacientes pediátricos con neumonía del HIMFG.</b>			
Resultado	Hombres (%)	Mujeres (%)	Total (%)
Positivo	10 (25)	3 (13)	13 (20.6)
Negativos	30 (75)	20 (87)	50 (79.4)

Se encontró diferencia significativa entre las proporciones de LBA positivos entre los dos géneros con  $p < 0.05$ .

### 8.1. Comparación de los métodos utilizados.

En lo que respecta a la eficiencia de las técnicas diagnósticas los resultados obtenidos muestran que la tinción con blanco de calcoflúor ofreció una sensibilidad y especificidad del 69.23% y 98.00% respectivamente. Con un valor predictivo positivo (VPP) de 90% y un valor predictivo negativo (VPN) de 92.24%. La razón de verosimilitudes positiva fue de 34.61 y la razón de verosimilitudes negativa (RV-) del 0.31. La inmunofluorescencia directa (IFD) mostro sensibilidad del 84.61; especificidad de 98%; VPP de 91.66%; VPN de 96.07%; RV+ de 42.30 y RV- de 0.15. La PCR convencional

mostró una sensibilidad del 92.30%; especificidad del 100%; VPP de 100%; VPN 98.05%; con RV+ de 92.23 y con RV- de 0.07. Se encontraron diferencia estadísticas significativas entre la PCR anidada (estándar de oro) ( $p < 0.01$ ) y las técnicas de blanco de calcoflúor, la IFD y la PCR convencional. También se encontró diferencia significativa al comparar dichas técnicas entre sí ( $p < 0.01$ ). Los resultados se resumen en la tabla 2. En la tabla 3 se muestran los resultados de los métodos para la identificación de *P. jirovecii* en los LBA con resultado positivo por la técnica de PCR anidada.

**Tabla 2: Resultados obtenidos de la comparación la PCR anidada con los métodos empleados para la detección de *P. jirovecii* en LBA de pacientes pediátricos con neumonía del HIMFG.**

Prueba	Blanco de calcoflúor	Inmunofluorescencia Directa	PCR convencional
<b>Sensibilidad</b>	69.23%	84.60 %	92.30 %
<b>Especificidad</b>	98.00%	98.00 %	100 %
<b>VPP</b>	90.00%	91.66 %	100 %
<b>VPN</b>	92.24%	96.07 %	98.05%
<b>RV+</b>	34.61	42.30	92.23
<b>RV-</b>	0.3139	0.157	0.077

VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; RV+: razón de verosimilitudes positiva; RV-: razón de verosimilitudes negativa

## 8.2. Casos falsos positivos:

En este estudio se presentó solo un caso de resultado falso positivo (1/50 casos) tanto con la tinción de blanco de calcoflúor y con la tinción de inmunofluorescencia directa (2%). Con la utilización de la PCR convencional no se presentaron casos falsos positivos.

### 8.3. Casos falsos negativos:

De los 13 casos positivos de acuerdo a la prueba estándar de oro para detección de *P. jirovecii* (PCR anidada) se presentaron 4 casos de falsos negativos (23%) con blanco de calcoflúor y 2 casos para la inmunofluorescencia directa (15.38%) y un caso para la PCR convencional (7.69%).

**Tabla 3: Resultados positivos obtenidos por alguno de los métodos utilizados para el diagnóstico de *P. jirovecii* en LAB de pacientes con neumonía de pacientes pediátricos del HIMFG.**

Muestra	Género	Edad	Diagnóstico	B.C.	IFD	PCR Conv.	PCR Anidada
173	M	0.6	NAC	+	+	+	+
230	M	14	ARJ	+	+	+	+
319	F	13	LAL-L2	+	+	+	+
346	M	2	NAC	-	+	+	+
728	M	10	NAC	+	+	+	+
734	M	2	VIH	+	+	+	+
803	F	3	SEPSIS	+	+	-	-
951	M	6	IPS	-	+	+	+
962	F	6	IPS	-	-	-	+
28	M	9	ARJ	+	+	+	+
77	M	7	LAM-M4	-	-	+	+
180	F	0.5	CC	+	+	+	+
256	M	6	LAL-L2	+	+	+	+
357	M	7	TFP	+	+	+	+

Las 49 muestras restantes fueron negativas por los cuatro métodos. NAC: neumonía adquirida en la comunidad; ARJ: artritis reumatoide juvenil; LAL-L2: leucemia linfoblástica aguda tipo L2; VIH: virus de inmunodeficiencia humana; IPS: inmunodeficiencia primaria severa; LAM-M4: leucemia mieloblástica aguda tipo M4; CC: cardiopatía congénita; TPF: tumor de la fosa posterior.

## 9. DISCUSIÓN.

Los tinciones tradicionales de identificación de *P. jirovecii* pueden ser utilizadas en muestras de LBA y poder ser examinadas de forma rápida (208, 209). Ofrecen la ventaja de ser rápidas y proporcionar un diagnóstico por el laboratorio (204). Desafortunadamente la sensibilidad que ofrecen es baja cuando se comparan con otras tinciones (208, 209); especialmente cuando existe poca cantidad de estructuras del microorganismo y por tal motivo han caído prácticamente en desuso por el laboratorio clínico. La tinciones argénticas fueron consideradas como el estándar de oro para la identificación de *P. jirovecii*, por su buena sensibilidad y especificidad, pero técnicamente son complicadas y tardadas (212, 214), razón por la cual han sido sustituidas por las pruebas de biología molecular (209).

De acuerdo a nuestras observaciones la tinción de blanco de calcoflúor, la cual ha sido considerada una técnica satisfactoria para detección de *P. jirovecii*, mostro una sensibilidad media (69.23%), aunque ofrece muy buena especificidad (98%) y VPN aceptables (92.24%); además de que es una técnica bastante rápida, por lo que no debe ser descartada totalmente en el laboratorio como prueba de tamizaje para la búsqueda de *P. jirovecci* en las muestras de los pacientes. Sobre todo en aquellas muestras en las que la búsqueda intencionada de *P. jirovecii* no está contemplada, como lo sugieren 3 de los 10 LBA positivos con blanco de calcoflúor de pacientes con diagnóstico clínico no relacionado a inmunosupresión; o en aquellos laboratorios que no tienen la posibilidad de implementar técnicas más sensibles, más costosas y que requieren mayor infraestructura. Aunque se debe de considerar que es una técnica que ofreció un número importante de resultados falsos negativos, así como 1 caso de resultado falso positivo.

En este estudio es claro que la identificación de *P. jirovecii* por inmunofluorescencia (un método utilizado ampliamente por los laboratorio clínico) ofrece una mejor sensibilidad (84.6%), con un VPP y un VPN de 91.6 y 96% respectivamente, si se compara con el blanco de calcoflúor, por lo cual debe ser considerada como un método muy bueno para el tamizaje de muestras de LBA de pacientes con neumonía, aunque es una técnica relativamente más tardada (2.5 horas) si se compara con la tinción de blanco de calcofluor (30 minutos). Es importante hacer notar que en este estudio la sensibilidad de la prueba resulto más baja que lo reportado por otros autores (220); aunque obtuvimos valores predictivos muy similares. Sin embargo, este método puede proporcionar resultados falsos positivos y falsos negativos. En nuestro estudio se presentaron 1 y 2 casos respectivamente.

En este estudio, la PCR convencional mostró ser el método con la mejor sensibilidad (92.3%), con una especificidad del 100% y excelentes valores predictivos. De acuerdo a estos parámetros muestra ser mejor que las técnicas microscópicas utilizadas en este estudio. Más aún, la especificidad obtenida en este estudio fue mayor que lo reportado con anterioridad (223), aunque hay que considerar la utilización de un estándar de oro diferente al utilizado por nosotros. A pesar de mostrar ser una técnica que ofrece parámetros excelentes para la detección de *P. jirovecii*, se presento un caso de resultado falso negativo, posiblemente por la escasa cantidad de moléculas de ADN del genoma del hongo en el LBA, lo que no permitió visualizar el fragmento amplificado en el gel de agarosa. La utilización de esta técnica en el laboratorio clínico se ve limitada por la necesidad de infraestructura y recursos humanos altamente especializados en la realización de este tipo de metodología, sin dejar de considerar el aspecto económico, pues es una técnica más costosa.

Si tomáramos los resultados de las pruebas y los colocáramos en orden descendente de acuerdo a su eficiencia como prueba diagnóstica concluimos que PCR anidada > PCR convencional > inmunofluorescencia directa > tinción de blanco de calcoflúor para la detección de *P. jirovecii*. Cabe destacar que hubo una muestra que solo pudo ser detectada como positiva por la PCR convencional y la PCR anidada, resultado negativo por los otros dos métodos. La falla de los otros dos métodos puede ser debido a la menor sensibilidad, dudas en la interpretación de la inmunofluorescencia o la variabilidad antigénica propia del hongo. Además de la baja carga de estructuras micóticas en las muestras de LBA.

La especificidad de la PCR convencional puede ser diferente de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados y a la porción específica del gene detectado. Nuestros resultados revelan una especificidad del 100% en los LBA. Seguramente porque utilizamos oligonucleótidos específicos para amplificar el gen 5S rARN de *P. jirovecii*, desarrollado especialmente para la detección de este hongo (227). Sin embargo, se ha demostrado que el método de la PCR anidada con la amplificación de los espaciadores de transcripción interna (ITS) de los genes ribosomales de ARN de *P. jirovecii* es más sensible y específica que otros métodos de PCR anidada o convencional (226). Sin embargo, a pesar de ser un método de diagnóstico excelente consume más tiempo que las técnicas comparadas en este estudio, pues requiere dos tipos diferentes de oligonucleótidos y dos reacciones de PCR consecutivas, por lo cual se ha limitado su uso como prueba de detección en el laboratorio clínico, y ha permanecido como el estándar de oro para comparar otros métodos de detección y para la realización de estudios epidemiológicos (99, 100).

En conclusión, los resultados sugieren que la tinción con blanco de calcoflúor puede ser utilizada como una prueba de tamizaje para los LBA enviados al laboratorio de micología sin sospecha clínica de PcP, pues además de permitir la identificación de *P. jirovecii* facilita la visualización de estructuras filamentosas y levaduras de otros géneros de hongos. Sin embargo, en aquellos LBA de pacientes con padecimientos o tratamientos que condicionen inmunosupresión se deben utilizar métodos de detección más sensibles. Nuestros resultados muestran que la inmunofluorescencia directa puede ser una estrategia adecuada para tal propósito, pero se deben considerar programas de capacitación al personal encargado para disminuir la posibilidad de errores en la interpretación de las laminillas, además de contar con toda la infraestructura adecuada para la realización de la prueba (microscopio con filtros adecuados, un plan de mantenimiento, reactivos sin caducar, etc.). La PCR convencional o anidada se debe de realizar solo en aquellos casos en los cuales las tinciones resulten negativas y la situación clínica del paciente sea muy sugestiva de PcP. Además de la realización de estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia e incidencia de la infección por este hongo. Sin embargo, en aquellos laboratorios, cuya infraestructura y recursos económicos y humanos lo permitan, se deben de implementar las técnicas más sensibles y específicas que existen. Se debe de recordar que un alto porcentaje de individuos sanos, especialmente los niños, están colonizados por *P. jirovecii*, sin que ello signifique enfermedad, y no sería sorprendente que alguno de los casos que resultaron positivos por PCR anidada en nuestro estudio, especialmente aquellos pacientes sin inmunosupresión, fueran colonización más que infección. Sin embargo, no se debe de pasar por alto que la dinámica de transmisión de este hongo requiere la detección oportuna y precisa de pacientes tanto colonizado como infectados, así como del personal médico colonizado, por

la posibilidad de transmisión a pacientes profundamente inmunosuprimidos que están en alto riesgo de desarrollar PcP (74-82, 106, 107). Por lo tanto, los hospitales de tercer nivel de atención deberían de considerar la implementación de las técnicas disponibles con mayor sensibilidad y especificidad para la detección de *P. jirovecii* como parte de su catalogo de pruebas del laboratorio clínico. Así como programas de detección de portadores en pacientes y personal médico asintomáticos para evitar la propagación de la infección a pacientes con alto riesgo de desarrollar PcP en caso de llegar a ser colonizados.

## 10. REFERENCIAS.

1. Delanoe P, Delanoe M. [Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*]. CR Acad Sci 1912;155:658–60 [in French].
2. Ammich O. [Uber die nichtsyphilitische interstitielle pneumoniae des ersten kindersalters]. Virchows Arch Pathol Anat 1938;302:539–54 [in German].
3. Van der Meer G, Brug SL. [Infection par *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux]. Annales de la Soci\_ete Belge de M\_edecine Tropicale 1942;22:301–5 [in French].
4. Vanek J, Jirovec O. [Parasitaere pneumonie. Interstitielle plasmazellen pneumonie der fruehgeborenen verursacht durch *Pneumocystis carinii*]. Zentralbl Bakteriologie 1952;158:120–7 [in German].
5. Sepkowitz KA, Brown AE, Armstrong D. *Pneumocystis carinii* pneumonia without acquired immunodeficiency syndrome. More patients, same risk. Arch Intern Med 1995;155(11):1125–8.
6. Ng VL, Yajko DM, Hadley WK. Extrapulmonary pneumocystosis. Clin Microbiol Rev 1997;10(3):401–18.
7. Excler JL, Mojon M, Guyonnet C, et al. [*Pneumocystis carinii* pneumonia in children. Apropos of 33 cases]. Pediatrie 1984;39(7):513–23 [in French].
8. Walzer PD, Schultz MG, Western KA, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and primary immune deficiency diseases. Natl Cancer Inst Monogr 1976;43:65–74.
9. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 1981;305(24):1425–31.

10. Masur H, Michelis MA, Greene JB, et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 1981;305(24):1431–8.
11. Jaffe HW, Bregman DJ, Selik RM. Acquired immune deficiency syndrome in the United States: the first 1,000 cases. *J Infect Dis* 1983;148(2):339–45.
12. Gebo KA, Fleishman JA, Moore RD. Hospitalizations for metabolic conditions, opportunistic infections, and injection drug use among HIV patients: trends between 1996 and 2000 in 12 states. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2005; 40(5):609–16.
13. San-Andres FJ, Rubio R, Castilla J, et al. Incidence of acquired immunodeficiency syndrome-associated opportunistic diseases and the effect of treatment on a cohort of 1115 patients infected with human immunodeficiency virus, 1989- 1997. *Clin Infect Dis* 2003;36(9):1177–85.
14. Bonnet F, Lewden C, May T, et al. Opportunistic infections as causes of death in HIV-infected patients in the HAART era in France. *Scand J Infect Dis* 2005; 37(6-7):482–7.
15. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 1988;334(6182):519–22.
16. Stringer SL, Stringer JR, Blase MA, et al. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp Parasitol* 1989; 68(4):450–61.
17. Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, et al. *Pneumocystis* and *Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. *J Eukaryot Microbiol* 2006;53(1):2–11.
18. Frenkel JK. *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr* 1976;43:13–30.
19. Walzer PD, Linke MJ. A comparison of the antigenic characteristics of rat and human *Pneumocystis carinii* by immunoblotting. *J Immunol* 1987;138(7): 2257–65.

20. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, et al. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 2002;8(9):891–6.
21. Li J, Edlind T. Phylogeny of *Pneumocystis carinii* based on beta-tubulin sequence. *J Eukaryot Microbiol* 1994;41(5):97S.
22. Mazars E, Odberg-Ferragut C, Dei-Cas E, et al. Polymorphism of the thymidylate synthase gene of *Pneumocystis carinii* from different host species. *J Eukaryot Microbiol* 1995;42(1):26–32.
23. Ma L, Kovacs JA. Expression and characterization of recombinant humanderived *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(11):3092–6.
24. Banerji S, Lugli EB, Miller RF, et al. Analysis of genetic diversity at the *arom* locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 1995;42(6):675–9.
25. Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, et al. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991;45(1):183–4.
26. Liu Y, Rocourt M, Pan S, et al. Sequence and variability of the 5.8s and 26s rRNA genes of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Res* 1992;20(14):3763–72.
27. Denis CM, Mazars E, Guyot K, et al. Genetic divergence at the *soda* locus of six different *formae speciales* of *Pneumocystis carinii*. *Med Mycol* 2000;38(4): 289–300.
28. Shah JS, PieciakW, Liu J, et al. Diversity of host species and strains of *Pneumocystis carinii* is based on rRNA sequences. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996;3(1):119–27.
29. Aliouat EM, Mazars E, Dei-Cas E, et al. *Pneumocystis* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong hostspecies specificity. *J Eukaryot Microbiol* 1994;41(5):71S.

30. Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, et al. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infect Immun* 1993;61(7): 2886–90.
31. Beard CB, Jennings VM, Teague WG, et al. Experimental inoculation of immunosuppressed owl monkeys with *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. *J Eukaryot Microbiol* 1999;46(5):113S–5S.
32. Stringer JR, Cushion MT, Wakefield AE. New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. *J Eukaryot Microbiol* 2001;(Suppl):184S–9S.
33. Gigliotti F. *Pneumocystis carinii*: has the name really been changed? *Clin Infect Dis* 2005;41(12):1752–5.
34. Cushion MT, Stringer JR. Has the name really been changed? It has for most researchers. *Clin Infect Dis* 2005;41(12):1756–8.
35. Gigliotti F. *Pneumocystis carinii* nomenclature: response to cushion and stringer. *Clin Infect Dis* 2006;42(8):1208–9.
36. Thomas CF Jr, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nat Rev Microbiol* 2007;5(4):298–308.
37. Huang L, Morris A, Limper AH, et al. An official ATS workshop summary: recent advances and future directions in *Pneumocystis pneumonia* (PCP). *Proc Am Thorac Soc* 2006;3(8):655–64.
38. Yoneda K, Walzer PD. Attachment of *Pneumocystis carinii* to type I alveolar cells studied by freeze-fracture electron microscopy. *Infect Immun* 1983;40(2):812–5.
39. Walzer PD, Smulian AG. *Pneumocystis* species. In: Livingstone C, editor, *Principles and practice of infectious disease*, vol. 2. Elsevier; 2004. p. 3080–94.
40. Limper AH, Martin WJ 2nd. *Pneumocystis carinii*: inhibition of lung cell growth mediated by parasite attachment. *J Clin Invest* 1990;85(2):391–6.

41. Limper AH, Edens M, Anders RA, et al. Pneumocystis carinii inhibits cyclin-dependent kinase activity in lung epithelial cells. *J Clin Invest* 1998;101(5):1148–55.
42. Limper AH, Hoyte JS, Standing JE. The role of alveolar macrophages in Pneumocystis carinii degradation and clearance from the lung. *J Clin Invest* 1997; 99(9):2110–7.
43. Lasbury ME, Durant PJ, Ray CA, et al. Suppression of alveolar macrophage apoptosis prolongs survival of rats and mice with Pneumocystis pneumonia. *J Immunol* 2006;176(11):6443–53.
44. Koziel H, Eichbaum Q, Kruskal BA, et al. Reduced binding and phagocytosis of Pneumocystis carinii by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor downregulation. *J Clin Invest* 1998;102(7): 1332–44.
45. Koziel H, Li X, Armstrong MY, et al. Alveolar macrophages from human immunodeficiency virus-infected persons demonstrate impaired oxidative burst response to Pneumocystis carinii in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23(4):452–9.
46. Beck JM, Warnock ML, Kaltreider HB, et al. Host defenses against Pneumocystis carinii in mice selectively depleted of CD41 lymphocytes. *Chest* 1993; 103(Suppl 2):116S–8S.
47. Bhagwat SP, Gigliotti F, Xu H, et al. Contribution of T cell subsets to the pathophysiology of Pneumocystis-related immunorestitution disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006;291(6):L1256–66.
48. Roths JB, Sidman CL. Both immunity and hyperresponsiveness to Pneumocystis carinii result from transfer of CD41 but not CD81 T cells into severe combined immunodeficiency mice. *J Clin Invest* 1992;90(2):673–8.
49. Harmsen AG, Stankiewicz M. Requirement for CD41 cells in resistance to Pneumocystis carinii pneumonia in mice. *J Exp Med* 1990;172(3):937–45.

50. Beck JM, Newbury RL, Palmer BE, et al. Role of CD81 lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *J Lab Clin Med* 1996;128(5): 477–87.
51. Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, et al. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Invest* 1999;104(9):1307–17.
52. Beck JM, Warnock ML, Curtis JL, et al. Inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1991;5(2):186–97.
53. Azoulay E, Parrot A, Flahault A, et al. AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia in the era of adjunctive steroids: implication of BAL neutrophilia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160(2):493–9.
54. Limper AH, Offord KP, Smith TF, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis* 1989;140(5):1204–9.
55. Benfield TL, Vestbo J, Junge J, et al. Prognostic value of interleukin-8 in AIDS-associated *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151(4):1058–62.
56. Swain SD, Wright TW, Degel PM, et al. Neither neutrophils nor reactive oxygen species contribute to tissue damage during *Pneumocystis* pneumonia in mice. *Infect Immun* 2004;72(10):5722–32.
57. Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol* 1996;34(7):1754–9.

58. Casanova-Cardiel L, Leibowitz MJ. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol* 1997;44(6):28S.
59. Morris A, Beard CB, Huang L. Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*. *Microbes Infect* 2002;4(1):95–103.
60. Wakefield AE. Detection of DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* in samples of ambient air. *J Eukaryot Microbiol* 1994;41(5):116S.
61. Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, et al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect* 2004;10(11): 1029–31.
62. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis* 2001;32(6):855–61.
63. Larsen HH, von Linstow ML, Lundgren B, et al. Primary *Pneumocystis* infection in infants hospitalized with acute respiratory tract infection. *Emerg Infect Dis* 2007;13(1):66–72.
64. Morris AM, Swanson M, Ha H, et al. Geographic distribution of human immunodeficiency virus associated *Pneumocystis carinii* pneumonia in San Francisco. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(5):1622–6.
65. Dohn MN, White ML, Vigdorth EM, et al. Geographic clustering of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(5):1617–21.
66. Beard CB, Carter JL, Keely SP, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: Implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 2000;6(3):265–72.

67. Garvy BA, Qureshi MH. Delayed inflammatory response to *Pneumocystis carinii* infection in neonatal mice is due to an inadequate lung environment. *J Immunol* 2000;165(11):6480–6.
68. Chen W, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 1993;61(12):5406–9.
69. An CL, Gigliotti F, Harmsen AG. Exposure of immunocompetent adult mice to *Pneumocystis carinii* f. sp. muris by cohousing: growth of *P. carinii* f. sp. Muris and host immune response. *Infect Immun* 2003;71(4):2065–70.
70. Gigliotti F, Harmsen AG, Wright TW. Characterization of transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris through immunocompetent BALB/c mice. *Infect Immun* 2003;71(7):3852–6.
71. Chabe M, Dei-Cas E, Creusy C, et al. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(2):89–97.
72. Olsson M, Sukura A, Lindberg LA, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by filtration of air. *Scand J Infect Dis* 1996;28(3):279–82.
73. Hughes WT, Bartley DL, Smith BM. A natural source of infection due to *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 1983;147(3):595.
74. Arichi N, Kishikawa H, Mitsui Y, et al. Cluster outbreak of *Pneumocystis pneumonia* among kidney transplant patients within a single center. *Transplant Proc* 2009;41(1):170–2.
75. de Boer MG, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Gaasbeek A, 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.

76. Olsson M, Eriksson BM, Elvin K, et al. Genotypes of clustered cases of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Scand J Infect Dis* 2001;33(4):285–9.
77. Hennequin C, Page B, Roux P, et al. Outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a renal transplant unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995;14(2):122–6.
78. Branten AJ, Beckers PJ, Tiggeler RG, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10(7):1194–7.
79. Singer C, Armstrong D, Rosen PP, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a cluster of eleven cases. *Ann Intern Med* 1975;82(6):772–7.
80. Hocker B, Wendt C, Nahimana A, et al. Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. *Emerg Infect Dis* 2005;11(2):330–2.
81. Schmoldt S, Schuegger R, Wendler T, et al. Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. *J Clin Microbiol* 2008;46(3):966–71.
82. Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S, et al. Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis pneumonia* among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis* 2004;10(10):1766–73.
83. Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, et al. Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 2007;13(10):1008–11.
84. Morris A, Wei K, Afshar K, et al. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. *J Infect Dis* 2008;197(1):10–7.
85. Nevez G, Jounieaux V, Linas MD, et al. High frequency of *Pneumocystis carinii* sp.f. *hominis* colonization in HIV-negative patients. *J Eukaryot Microbiol* 1997; 44(6):36S.

86. Huang L, Crothers K, Morris A, et al. Pneumocystis colonization in HIV-infected patients. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50(Suppl):616–7.
87. Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE, et al. Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 2003;187(6):901–8.
88. Rabodonirina M, Raffenot D, Cotte L, et al. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from human immunodeficiency virus-infected patients: use of a simple DNA extraction procedure and nested PCR. *J Clin Microbiol* 1997;35(11):2748–51.
89. Morris A, Kingsley LA, Groner G, et al. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV-infected men. *AIDS* 2004;18(5):793–8.
90. Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, et al. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *J Clin Microbiol* 1999;37(10):3409–10.
91. Sing A, Geiger AM, Hogardt M, et al. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *J Clin Microbiol* 2001; 39(7):2717–8.
92. Matos O, Costa MC, Correia I, et al. *Pneumocystis jirovecii* carriage in Portuguese immunocompetent patients: preliminary results. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50(Suppl):647–8.
93. Probst M, Ries H, Schmidt-Wieland T, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in patients with chronic lung diseases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19(8):644–5.
94. Morris A, Sciruba FC, Lebedeva IP, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170(4):408–13.

95. Calderon EJ, Rivero L, Respaldiza N, et al. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clin Infect Dis* 2007;45(2):e17–9.
96. Vidal S, de la Horra C, Martin J, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clin Microbiol Infect* 2006;12(3):231–5.
97. Miguez-Burbano MJ, Ashkin D, Rodriguez A, et al. Increased risk of *Pneumocystis carinii* and community-acquired pneumonia with tobacco use in HIV disease. *Int J Infect Dis* 2005;9(4):208–17.
98. Miguez-Burbano MJ, Burbano X, Ashkin D, et al. Impact of tobacco use on the development of opportunistic respiratory infections in HIV seropositive patients on antiretroviral therapy. *Addict Biol* 2003;8(1):39–43.
99. Nevez G, Raccurt C, Vincent P, et al. Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus-negative patients: assessing risk with blood CD4 T cell counts. *Clin Infect Dis* 1999;29(5): 1331–2.
100. Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax* 2003;58(7):594–7.
101. Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, et al. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis* 2003;9(5):605–6.
102. Nevez G, Totet A, Pautard JC, et al. *Pneumocystis carinii* detection using nested-PCR in nasopharyngeal aspirates of immunocompetent infants with bronchiolitis. *J Eukaryot Microbiol* 2001;(Suppl):122S–3S.

103. Totet A, Meliani L, Lacube P, et al. Immunocompetent infants as a human reservoir for *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50(Suppl):668–9.
104. Vargas SL, Ponce CA, Galvez P, et al. *Pneumocystis* is not a direct cause of sudden infant death syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26(1):81–3.
105. Montes-Cano MA, Chabe M, Fontillon-Alberdi M, et al. Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerg Infect Dis* 2009;15(1):125–7.
106. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001;39(11):3877–82.
107. Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with *P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol* 2000;38(4):1536–8.
108. Lundgren B, Elvin K, Rothman LP, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* from patients to hospital staff. *Thorax* 1997;52(5):422–4.
109. Wissmann G, Varela JM, Calderon 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.
110. Mori S, Cho I, Ichiyasu H, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in elderly patients with rheumatoid arthritis in Japan: a possible association between colonization and development of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia during low-dose MTX therapy. *Mod Rheumatol* 2008;18(3):240–6.
111. Christensen PJ, Preston AM, Ling T, et al. *Pneumocystis murina* infection and cigarette smoke exposure interact to cause increased organism burden, development of

airspace enlargement, and pulmonary inflammation in mice. *Infect Immun* 2008;76(8):3481–90.

112. Norris KA, Morris A, Patil S, et al. Pneumocystis colonization, airway inflammation, and pulmonary function decline in acquired immunodeficiency syndrome. *Immunol Res* 2006;36(1–3):175–87.

113. Vargas SL, Ponce CA, Hughes WT, et al. Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. *Clin Infect Dis* 1999;29(6): 1489–93.

114. Masur H, Ognibene FP, Yarchoan R, et al. CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Ann Intern Med* 1989;111(3):223–31.

115. Phair J, Munoz A, Detels R, et al. 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.

116. D'Egidio GE, Kravcik S, Cooper CL, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia prophylaxis is not required with a CD4 T-cell count <200 cells/microl when viral replication is suppressed. *AIDS* 2007;21(13):1711–5.

117. Kovacs JA, Masur H. Evolving health effects of *Pneumocystis*: one hundred years of progress in diagnosis and treatment. *JAMA* 2009;301(24):2578–85.

118. Walzer PD, Evans HE, Copas AJ, et al. Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985–2006. *Clin Infect Dis* 2008;46(4):625–33.

119. Pillonel J. [Surveillance de l'infection par le VIH/SIDA en France, 2006]. *Bull \_Epid\_emiol Hebd* 2007;46–47:386–93 [in French].

120. Mikaelsson L, Jacobsson G, Andersson R. Pneumocystis pneumonia—a retrospective study 1991–2001 in Gothenburg, Sweden. *J Infect* 2006;53(4):260–5.
121. Hui M, Kwok WT. Pneumocystis carinii pneumonia in Hong Kong: a 10 year retrospective study. *J Med Microbiol* 2006;55(Pt 1):85–8.
122. Arend SM, Kroon FP, van't Wout JW. Pneumocystis carinii pneumonia in patients without AIDS, 1980 through 1993. An analysis of 78 cases. *Arch Intern Med* 1995;155(22):2436–41.
123. Russian DA, Levine SJ. Pneumocystis carinii pneumonia in patients without HIV infection. *Am J Med Sci* 2001;321(1):56–65.
124. Overgaard UM, Helweg-Larsen J. Pneumocystis jiroveci pneumonia (PCP) in HIV-1-negative patients: a retrospective study 2002-2004. *Scand J Infect Dis* 2007;39(6–7):589–95.
125. Sepkowitz KA, Brown AE, Telzak EE, et al. Pneumocystis carinii pneumonia among patients without AIDS at a cancer hospital. *JAMA* 1992;267(6):832–7.
126. Leggiadro RJ, Winkelstein JA, Hughes WT. Prevalence of Pneumocystis carinii pneumonitis in severe combined immunodeficiency. *J Pediatr* 1981; 99(1):96–8.
127. Walzer PD, Schultz MG, Western KA, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and primary immune deficiency diseases of infancy and childhood. *J Pediatr* 1973; 82(3):416–22.
128. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr* 1997;131(1 Pt 1):47–54.
129. Winkelstein JA, Marino MC, Ochs H, et al. The X-linked hyper-IgM syndrome: clinical and immunologic features of 79 patients. *Medicine (Baltimore)* 2003; 82(6):373–84.

130. Imai K, Morio T, Zhu Y, et al. Clinical course of patients with wasp gene mutations. *Blood* 2004;103(2):456–64.
131. Elhasid R, Etzioni A. Major histocompatibility complex class II deficiency: a clinical review. *Blood Rev* 1996;10(4):242–8.
132. Richman DD, Zamvil L, Remington JS. Recurrent *Pneumocystis carinii* pneumonia in a child with hypogammaglobulinemia. *Am J Dis Child* 1973;125(1):102–3.
133. Dittrich AM, Schulze I, Magdorf K, et al. X-linked agammaglobulinaemia and *Pneumocystis carinii* pneumonia—an unusual coincidence? *Eur J Pediatr* 2003;162(6):432–3.
134. Burke BA, Good RA. *Pneumocystis carinii* infection. *Medicine (Baltimore)* 1973; 52(1):23–51.
135. Lund FE, Hollifield M, Schuer K, et al. B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection. *J Immunol* 2006;176(10):6147–54.
136. Alibrahim A, Lepore M, Lierl M, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in an infant with X-linked agammaglobulinemia. *J Allergy Clin Immunol* 1998;101(4 Pt 1):552–3.
137. Adinoff AD, Johnston RB Jr, Dolen J, et al. Chronic granulomatous disease and *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Pediatrics* 1982;69(1):133–4.
138. Rosenszweig SD, Holland SM. Phagocyte immunodeficiencies and their infections. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113(4):620–6.
139. Kovacs JA, Hiemenz JW, Macher AM, 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.

140. Yale SH, Limper AH. Pneumocystis carinii pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc* 1996;71(1):5–13.
141. Pagano L, Fianchi L, Mele L, et al. Pneumocystis carinii pneumonia in patients with malignant haematological diseases: 10 years' experience of infection in gimema centres. *Br J Haematol* 2002;117(2):379–86.
142. Cheson BD. Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy. *J Clin Oncol* 1995;13(9):2431–48.
143. Byrd JC, Hargis JB, Kester KE, et al. Opportunistic pulmonary infections with fludarabine in previously treated patients with low-grade lymphoid malignancies: a role for Pneumocystis carinii pneumonia prophylaxis. *Am J Hematol* 1995; 49(2):135–42.
144. Morra E, Nosari A, Montillo M. Infectious complications in chronic lymphocytic leukaemia. *Hematol Cell Ther* 1999;41(4):145–51.
145. Roblot F, Imbert S, Godet C, et al. Risk factors analysis for Pneumocystis jiroveci pneumonia (PCP) in patients with haematological malignancies and pneumonia. *Scand J Infect Dis* 2004;36(11–12):848–54.
146. De Castro N, Pavie J, Lagrange-Xelot M, et al. [Pneumocystis jiroveci pneumonia in patients with cancer: is it unavoidable?]. *Rev Mal Respir* 2007;24(6): 741–50 [in French].
147. Martin SI, Marty FM, Fiumara K, et al. Infectious complications associated with alemtuzumab use for lymphoproliferative disorders. *Clin Infect Dis* 2006;43(1): 16–24.
148. Lundin J, Kimby E, Bjorkholm M, et al. Phase II trial of subcutaneous anti-CD52 monoclonal antibody alemtuzumab (Campath-1H) as first-line treatment for patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood* 2002;100(3): 768–73.

149. Otahbachi M, Nugent K, Buscemi D. Granulomatous *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in a patient with chronic lymphocytic leukemia: a literature review and hypothesis on pathogenesis. *Am J Med Sci* 2007;333(2):131–5.
150. Morrison VA. Update on prophylaxis and therapy of infection in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2001;1(1): 84–90.
151. Kolstad A, Holte H, Fossa A, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in B-cell lymphoma patients treated with the rituximab-CHOEP-14 regimen. *Haematologica* 2007;92(1):139–40.
152. Venhuizen AC, Hustinx WN, van Houte AJ, et al. Three cases of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) during first-line treatment with rituximab in combination with CHOP-14 for aggressive B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol* 2008;80(3):275–6.
153. Varthalitis I, Meunier F. *Pneumocystis carinii* pneumonia in cancer patients. *Cancer Treat Rev* 1993;19(4):387–413.
154. Henson JW, Jalaj JK, Walker RW, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with primary brain tumors. *Arch Neurol* 1991;48(4):406–9.
155. Kulke MH, Vance EA. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients receiving chemotherapy for breast cancer. *Clin Infect Dis* 1997;25(2):215–8.
156. Godeau B, Coutant-Perronne V, Le Thi Huong D, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the course of connective tissue disease: report of 34 cases. *J Rheumatol* 1994;21(2):246–51.
157. Ognibene FP, Shelhamer JH, Hoffman GS, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a major complication of immunosuppressive therapy in patients with Wegener's granulomatosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151(3 Pt 1):795–9.

158. Kadoya A, Okada J, Iikuni Y, et al. Risk factors for *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with polymyositis/dermatomyositis or systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1996;23(7):1186–8.
159. Alarcon GS. Infections in systemic connective tissue diseases: systemic lupus erythematosus, scleroderma, and polymyositis/dermatomyositis. *Infect Dis Clin North Am* 2006;20(4):849–75.
160. Marie E. [Infections au cours des polymyosites et des dermatomyosites]. *Presse Med* 2009;38:303–16 [in French].
161. Bachelez H, Schremmer B, Cadranet J, et al. Fulminant *Pneumocystis carinii* pneumonia in 4 patients with dermatomyositis. *Arch Intern Med* 1997;157(13):1501–3.
162. Smith MB, Hanauer SB. *Pneumocystis carinii* pneumonia during cyclosporine therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 1992;327:497–8.
163. Bernstein CN, Kolodny M, Block E, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with ulcerative colitis treated with steroids. *Am J Gastroenterol* 1993; 88:574–7.
164. Kaur N, Mahl TC. *Pneumocystis jirovecii* (carinii) pneumonia after infliximab therapy: a review of 84 cases. *Dig Dis Sci* 2007;52(6):1481–4.
165. Komano Y, Harigai M, Koike R, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with infliximab: a retrospective review and case-control study of 21 patients. *Arthritis Rheum* 2009;61(3):305–12.
166. Gordon SM, LaRosa SP, Kalmadi S, et al. Should prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in solid organ transplant recipients ever be discontinued? *Clin Infect Dis* 1999;28(2):240–6.

167. Hardy AM, Wajszczuk CP, Suffredini AF, et al. Pneumocystis carinii pneumonia in renal-transplant recipients treated with cyclosporine and steroids. *J Infect Dis* 1984;149(2):143–7.
168. Lufft V, Kliem V, Behrend M, et al. Incidence of Pneumocystis carinii pneumonia after renal transplantation. Impact of immunosuppression. *Transplantation* 1996; 62(3):421–3.
169. Sollinger HW. Mycophenolate mofetil for the prevention of acute rejection in primary cadaveric renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation* 1995;60(3):225–32.
170. Dominguez J, Mahalati K, Kiberd B, et al. Conversion to rapamycin immunosuppression in renal transplant recipients: report of an initial experience. *Transplantation* 2000;70(8):1244–7.
171. Radisic M, Lattes R, Chapman JF, et al. Risk factors for Pneumocystis carinii pneumonia in kidney transplant recipients: a case-control study. *Transpl Infect Dis* 2003;5(2):84–93.
172. Arend SM, Westendorp RG, Kroon FP, et al. Rejection treatment and cytomegalovirus infection as risk factors for Pneumocystis carinii pneumonia in renal transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1996;22(6):920–5.
173. Neff RT, Jindal RM, Yoo DY, et al. Analysis of USRDS: incidence and risk factors for Pneumocystis jirovecii pneumonia. *Transplantation* 2009;88(1): 135–41.
174. Shapiro R, Young JB, Milford EL, et al. Immunosuppression: evolution in practice and trends, 1993-2003. *Am J Transplant* 2005;5(4):874–86.
175. Issa NC, Fishman JA. Infectious complications of antilymphocyte therapies in solid organ transplantation. *Clin Infect Dis* 2009;48(6):772–86.

176. Anderson KC, Soiffer R, DeLage R, et al. T-cell-depleted autologous bone marrow transplantation therapy: analysis of immune deficiency and late complications. *Blood* 1990;76(1):235–44.
177. Tuan IZ, Dennison D, Weisdorf DJ. *Pneumocystis carinii* pneumonitis following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1992;10(3): 267–72.
178. De Castro N, Neuville S, Sarfati C, et al. Occurrence of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia after allogeneic stem cell transplantation: a 6-year retrospective study. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(10):879–83.
179. Duncan RA, von Reyn CF, Alliegro GM, et al. Idiopathic CD41 T-lymphocytopenia—four patients with opportunistic infections and no evidence of HIV infection. *N Engl J Med* 1993;328(6):393–8.
180. Tarr PE, Sneller MC, Mechanic LJ, et al. Infections in patients with immunodeficiency with thymoma (good syndrome). Report of 5 cases and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2001;80(2):123–33.
181. Al Soub H, Taha RY, El Deeb Y, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in a patient without a predisposing illness: case report and review. *Scand J Infect Dis* 2004; 36(8):618–21.
182. Hughes WT. *Pneumocystis carinii* infections in mothers, infants and non-AIDS elderly adults. In: Sattler FR, Walzer PD, editors, *Pneumocystis carinii* clinical infectious diseases, vol. 2. London: Bailliere Tindall; 1995. p. 461–70.
183. Graham BS, Tucker WS Jr. Opportunistic infections in endogenous Cushing's syndrome. *Ann Intern Med* 1984;101(3):334–8.

184. Abernathy-Carver KJ, Fan LL, Boguniewicz M, et al. Legionella and Pneumocystis pneumonias in asthmatic children on high doses of systemic steroids. *Pediatr Pulmonol* 1994;18(3):135–8.
185. Oosterhuis JK, van den Berg G, Monteban-Kooistra WE, et al. Life-threatening *Pneumocystis jiroveci* pneumonia following treatment of severe Cushing's syndrome. *Neth J Med* 2007;65(6):215–7.
186. Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ II. *Pneumocystis carinii* pneumonia: differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis* 1989;140:1204-9.
187. Randall Curtis J, Yarnold PR, Schwartz DN, Weinstein RA, Bennett CL. Improvements in outcomes of acute respiratory failure for patients with human immunodeficiency virus related *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:393-8.
188. Yale SH, Limper AH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc* 1996;71:5-13.
189. Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 2002;34:1098-107. [Erratum, *Clin Infect Dis* 2002;34:1293.]
190. Pareja JG, Garland R, Koziel H. Use of adjunctive corticosteroids in severe adult non-HIV *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest* 1998;113:1215-24.
191. DeLorenzo LJ, Huang CT, Maguire GP, Stone DJ. Roentgenographic patterns of *Pneumocystis carinii* pneumonia in 104 patients with AIDS. *Chest* 1987;91:323-7.

192. Gruden JF, Huang L, Turner J, et al. Highresolution CT in the evaluation of clinically suspected *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients with normal, equivocal, or nonspecific radiographic findings. *AJR Am J Roentgenol* 1997;169:967-75.
193. Pitchenik AE, Ganjei P, Torres A, Evans DA, Rubin E, Baier H. Sputum examination for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 226-9.
194. Bigby TD, Margolskee D, Curtis JL, Michael PF, Sheppard D, Hadley WK, Hopewell PC. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 515-8.
195. Kirsch CM, Azzi RL, Yenokida GG, Jensen WA. Analysis of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Med Sci* 1990; 299: 386-91.
196. Levine SJ, Masur H, Gill VJ, Feuerstein I, Suffredini AF, Brown D, Lane HC, Yarchoan R, Shelhamer JH, Ognibene FP. Effect of aerosolized pentamidine prophylaxis on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by induced sputum examination in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Am Rev Respir Dis* 1991; 144: 760-4.
197. Baughman RP. Use of bronchoscopy in the diagnosis of infection in the immunocompromised host. *Thorax* 1994; 49: 3-7.
198. Francis ND, Goldin RD, Forster SM, Cook HT, Coleman DV, Shaw R, Pinching AJ. Diagnosis of lung disease in acquired immune deficiency syndrome: biopsy or cytology and implications for management. *J Clin Pathol* 1987; 40: 1269-73.
199. Jules-Elysee KM, Stover DE, Zaman MB, Bernard EM, White DA. Aerosolized pentamidine: effect on diagnosis and presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Ann Intern Med* 1990;112: 750-7.

200. Cadranel J, Gillet Juvin K, Antoine M, Carnot F, Reynaud P, Parrot A, Carette MF, Mayaud C, Israel Biet D. Site-directed bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy in HIV-infected patients with pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1103-6.
201. Broaddus C, Dake MD, Stulbarg MS, Blumenfeld LV, Hadley K, Golden JA, Hopewell PC. Bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy for the diagnosis of pulmonary infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1985;102: 747-52.
202. Griffiths MH, Kocjan G, Miller RF, Godfrey Faussett P. Diagnosis of pulmonary disease in human immunodeficiency virus infection: role of transbronchial biopsy and bronchoalveolar lavage. *Thorax* 1989;44:554-8.
203. Weldon Linne CM, Rhone DP, Bourassa R. Bronchoscopy specimens in adults with AIDS. Comparative yields of cytology, histology and culture for diagnosis of infectious agents. *Chest* 1990;98:24-8.
204. Tollerud DJ, Wesseler TA, Kim CK, Baughman RP. Use of a rapid differential stain for identifying *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid. Diagnostic efficacy in patients with AIDS. *Chest* 1989;95:494-7.
205. Golden JA, Hollsnder H, Stulbarg MS, Gamsu G. Bronchoalveolar lavage as the exclusive diagnostic modality for *Pneumocystis carinii* pneumonia: a prospective study among patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Chest* 1986;90:18-22.
206. Baughman RP, Dohn MN, Frame PT. The continuing utility of bronchoalveolar lavage to diagnose opportunistic infection in AIDS patients. *Am J Med* 1994;97:515-22.
207. Ellis ME, Spence D, Bouchama A, Antonius J, Bazarbashi M, Khougeer F, De Vol EB. Open lung biopsy provides a higher and more specific diagnostic yield compared to broncho-alveolar lavage in immunocompromised patients. Fungal Study Group. *Scand J Infect Dis* 1995;27:157-62.

208. Cregan P, Yamamoto A, Lum A, VanDerHeide T, MacDonald M, Pulliam L. Comparison of four methods for rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1990;28:2432-6.
209. Armbruster C, Pokieser L, Hassl A. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by bronchoalveolar lavage in AIDS patients. Comparison of Diff-Quik, fungifluor stain, direct immunofluorescence test and polymerase chain reaction. *Acta Cytol* 1995;39: 1089-93.
210. Tregnago R, Xavier RG, Pereira RP, Prolla JC. The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by cytologic evaluation of Papanicolaou and Leishman-stained bronchoalveolar specimens in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Cytopathology* 1993;4:77-84.
211. Stanley MW, Henry MJ, Iber C. Foamy alveolar casts: diagnostic specificity for *Pneumocystis carinii* pneumonia in bronchoalveolar lavage fluid cytology. *Diagn Cytopathol* 1988;4:113-5.
212. Naimey GL, Wuerker RB. Comparison of histologic stains in the diagnosis of *Pneumocystis carinii*. *Acta Cytol* 1995;39:1124-7.
213. Naryshkin S, Daniels J, Freno E, Cunningham L. Cytology of treated and minimal *Pneumocystis carinii* pneumonia and a pitfall of the Grocott methenamine silver stain. *Diagn Cytopathol* 1991;7:41-7.
214. Paradis IL, Ross C, Dekker A, Dauber J. A comparison of modified methenamine silver and toluidine blue stains for the detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from immunosuppressed patients. *Acta Cytol* 1990;34:511-6.
- 215.- Aderaye G, Woldeamanuel D, Lindquist L. Evaluation of toluidine O staining for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* in expectorated sputum simple and bronchoalveolar

lavage from HIV-infected patients in a tertiary care referral center in Ethiopia. *Infection* 2008; 36:237-243.

216. Fraire AE, Kemp B, Greenberg SD, Kim HS, Estrada R, McBride RA. Calcofluor white stain for the detection of *Pneumocystis carinii* in transbronchial lung biopsy specimens: a study of 68 cases. *Mod Pathol* 1996;9:861-4.

217. Kim YK, Parulekar S, Yu PK, Pisani RJ, Smith TF, Anhalt JP. Evaluation of calcofluor white stain for detection of *Pneumocystis carinii*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1990;13:307-10.

218. Baselski VS, Robison MK, Pifer LW, Woods DR. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage samples by using Cellufluor staining. *J Clin Microbiol* 1990;28:393-4.

219.- Cintini C, Villa MP, Romani R, Merolla R, Delia S, Ronchetti R. Detection of *Pneumocystis carinii* among children with chronic respiratory disorders in the absence of HIV infection and immunodeficiency. *J Med Microbiol* 1998;47: 329-33.

220.- Khan MA, Farrag N, Butcher P. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: immunofluorescence staining, simple PCR or nPCR. *J Infect* 1999;39: 77-80.

221. Fujisawa T, Suda T, Matsuda H, et al. Real-time PCR is more specific than conventional PCR for induced sputum diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients without HIV infection. *Respirology* 2009;14(2):203-9.

222. Ribes JA, Limper AH, Espy MJ, et al. PCR detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 1997;35(4):830-5.

223. Flori P, Bellete B, Durand F, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* 2004;53(Pt7):603–7.
224. Azoulay E, Bergeron A, Chevret S, et al. Polymerase chain reaction for diagnosing *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Chest* 2009;135(3):655–61.
- 225.- Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM, Queener SF, Smith JW, Ortiz-Rivera M, Leibowitz MJ and Lee CH. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans base don nucleotide sequences variations of internal transcribed spacers of rRNA genes . *J Clin Microbiol* 1994;32: 2904-12.
- 226.- Lu JJ, Chen CH, Bartlett MS, Smith WJ, Lee CH 1995. Comparison of six different methods for detection of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol* 1995;33 (10):2785-8.
- 227.- Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Cinclair K, Miller RF and Hopkin JM. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 1990; 336: 451-3.

