



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCIÓN DE *Pneumocystis jirovecii* POR PCR-
SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN ITS EN
PACIENTES CON Y SIN VIH

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

AMANDA ALCÁNTARA MOJICA



DIRECTORA DE TESIS:

DRA. FRANCISCA HERNÁNDEZ HERNÁNDEZ

2014



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.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

7. Datos del trabajo escrito

Título

Número de páginas

Año

1. Datos del alumno

Alcántara
Mojica
Amanda
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
304130753

2. Datos del tutor

Dra.
Francisca
Hernández
Hernández

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Sigfrido
Sierra
Galván

4. Datos del sinodal 2

M. en C.
Fabiola
Ramírez
Corona

5. Datos del sinodal 3

M. en C.
Guadalupe
Vidal
Gaona

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
María de los Ángeles Patricia
Manzano
Gayosso

7. Datos del trabajo escrito

Detección de *Pneumocystis jirovecii* por
PCR-secuenciación de la región ITS en
Pacientes con y sin VIH

92

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

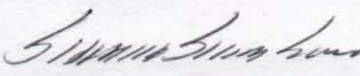

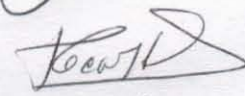
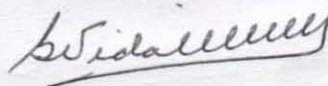

Votos Aprobatorios

DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ
Director General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Detección de Pneumocystis jirovecii por PCR-secuenciación de la región ITS en pacientes con y sin VIH

realizado por **Alcántara Mojica Amanda** con número de cuenta **3-0413075-3** quien ha decidido titularse mediante la opción de **tesis** en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

- | | | |
|-----------------------|--|--|
| Propietario | Dr. Sigfrido Sierra Galván |  |
| Propietario | M. en C. Fabiola Ramírez Corona |  |
| Propietario Tutora | Dra. Francisca Hernández Hernández |  |
| Suplente | M. en C. Guadalupe Vidal Gaona |  |
| Suplente | M. en C. María de los Angeles Patricia Manzano Gayosso |  |

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU "
Ciudad Universitaria, D. F., a 06 de diciembre de 2013
EL JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

MAG/mdm



„Deine erste Pflicht ist, dich selbst glücklich zu machen.“

Ludwig Feuerbach

„Ohne Leidenschaft gibt es keine Genialität.“

Theodor Mommsen

*„Alle Kraft des Menschen wird erworben durch Kampf mit sich selbst und
Überwindung seiner selbst.“*

Johann Gottlieb Fichte

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

Goethe

*“Ningún soñador jamás es demasiado pequeño; ningún sueño jamás es
demasiado grande.”*

Anónimo

Mereces lo que sueñas...

Tarda en llegar pero al final hay recompensa.

Gustavo Cerati

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con recursos financieros del Presupuesto de la Facultad de Medicina, asignado a la Dra. Francisca Hernández Hernández, de la Unidad de Micología, Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Dr. Francisco Quiñones Falconi, Jefe del Departamento de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), por proporcionar las muestras biológicas para la realización de este trabajo.

A la M. en C. QFB Rocío López del Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza” (ISSSTE), por proporcionar diversas muestras incluidas en el presente trabajo.

A los integrantes del jurado:

Dr. Sigfrido Sierra Galván

M. en C. Fabiola Ramírez Corona

Dra. Francisca Hernández Hernández

M. en C. Guadalupe Vidal Gaona

M. en C. María de los Ángeles Patricia Manzano Gayosso.

Muchas gracias por su tiempo, por las correcciones y las sugerencias para mejorar mi trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México que ha sido mi segundo hogar. Gracias por abrirme las puertas al maravilloso mundo del conocimiento y la ciencia, además que en sus aulas tuve la fortuna de conocer a magníficas personas. Gracias a la máxima casa de estudios logré crecer a nivel personal y profesional.

A Dios:

Gracias por guiarme a lo largo de este camino, darme la fuerza para salir adelante en los momentos más difíciles, por escuchar mis oraciones, por permitirme despertar cada día.

Dra. Francisca Hernández Hernández:

Gracias por motivarme, por ayudarme a crecer a nivel personal y profesional, por todas y cada una de sus enseñanzas, sus consejos, los detalles, el apoyo que siempre me brindó. Las horas en su oficina en las que con intercambio de conocimiento, risas y modificaciones, me ayudó con mi escrito. Espero que la vida la recompense por ser tan maravillosa persona y sobre todo por esa calidad humana que la caracteriza. Usted ha sido una pieza clave para que esta meta se haya hecho realidad. Mil gracias por ser mi tutora y mi amiga.

M. en C. Fabiola Ramírez Corona:

Gracias por su apoyo para el mejoramiento de este trabajo, me dio una nueva visión para analizar y terminar mi trabajo. Mil gracias por el tiempo que me dedicó, sin su ayuda no hubiese sido posible concluir este trabajo.

QFB Fernando R. Morales Villareal:

Por sus enseñanzas, por el apoyo, consejos y su linda amistad. Por siempre estar al pendiente de mi trabajo. Al personal del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) quienes hicieron que mi estancia fuera muy agradable.

A mis profesores del laboratorio de Micología Médica:

Dr. Rubén López, Dra. Patricia Manzano, Dra. Rosio Castañón, Biól. Elva Bazán y Dra. Blanca Millán, gracias por las enseñanzas y el apoyo durante mi estancia en el laboratorio, gracias por los consejos.

A la QFB Erika Córdova Martínez:

Por su apoyo técnico durante todo el desarrollo de este trabajo.

A mis compañeros del laboratorio de Micología Médica:

Betzabé, Mariana, Ana, Paola, Sol, Brianda, Jamie, Verónica, Elda, Ángeles, Saúl, Claudia y Oscar. Por los consejos y apoyo para mis experimentos, disfruté mucho de su compañía.

A la Biól. Dalia Viviana Vallejo:

Gracias por ayudarme con el análisis de mi trabajo y asesorarme, gracias por tu amistad.

A Tania, que muy amablemente me brindaste una muy bonita amistad y estuviste al pendiente de que estuviese mi material listo, mil gracias ☺.

A Pablo quien me ofreció su apoyo, consejos y divertidos momentos en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

A Papá: José Alcántara que me apoyaste a lo largo de este camino, me escuchaste y me diste los mejores consejos, sin tu apoyo moral y económico no hubiese llegado tan lejos, este título demuestra tu esfuerzo, tus desvelos, tus preocupaciones por brindarme la mejor educación y prepararme para un mejor futuro. Te amo Papá

A mamá Amanda, mis hermanos Jesús, Diocelina, Vanessa, Mariana y José y a los pequeños sobrinos Derek, Mildred, Carlitos y Karen.

A Christiane, Dilan, Giovani, Luis Alberto, Karina, Stevens, Esmeralda, Nayeli, Rosario etc. Gracias a todos mis amigos y compañeros de aula que hicieron de este camino de sabiduría un momento súper especial y divertido.

A Mis profesores de la secundaria 132 Japón, CCH-Azcapotzalco y la maravillosa Facultad de Ciencias, quienes creyeron en mí y siempre me dieron palabras de aliento, aquellos que dentro y fuera del aula estuvieron apoyándome.

MIL GRACIAS A QUIENES CREYERON EN MI, ME BRINDARON UN SABIO CONSEJO, ME APOYARON Y ME DIERON ALIENTO EN LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES DE MI VIDA.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Antecedentes históricos | 1 |
| 1.2 El género <i>Pneumocystis</i> | 3 |
| 1.2.1 Clasificación taxonómica (Redhead, 2006) | 3 |
| 1.3 Especies del género <i>Pneumocystis</i> | 4 |
| 1.4 Características generales de <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 5 |
| 1.5 Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 8 |
| 1.5.1 Factores de riesgo:..... | 8 |
| 1.5.2 Epidemiología | 9 |
| 1.5.3 Fisiopatogenia | 14 |
| 1.5.4 Sintomatología | 16 |
| 1.5.5 PCP extrapulmonar..... | 17 |
| 1.5.6 Tratamiento | 17 |
| 1.5.7 Resistencia a antibióticos..... | 19 |
| 1.5.8 Diagnóstico | 21 |
| 1.5.8.1 Revisión de muestras | 21 |
| 1.5.8.2 Procedimientos tradicionales tintoriales | 21 |
| 1.5.8.3 Procedimientos inmunológicos | 25 |
| 1.5.8.4 Titulación de anticuerpos..... | 26 |
| 1.5.8.5 Procedimientos moleculares | 27 |
| 1.5.8.5.1 Genes blanco | 27 |
| 1.5.8.5.2 PCR tradicional..... | 28 |
| 1.5.8.5.3 PCR anidada | 30 |
| 1.5.8.5.4 PCR tiempo Real | 31 |
| 1.5.8.5.5 Identificación de genotipos | 32 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 34 |
| 2.1 Casos de neumocistosis en México y técnicas de detección de <i>P. jirovecii</i> | 34 |
| 3. JUSTIFICACIÓN | 36 |
| 4. OBJETIVOS | 36 |
| 4.1 Objetivo general | 36 |
| 4.2 Objetivos particulares..... | 36 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 37 |

| | |
|---|----|
| 5.1 Muestras | 37 |
| 5.2 Extracción de DNA | 37 |
| 5.3 Amplificación de un fragmento de la región ITS por PCR anidada..... | 38 |
| 5.4 Purificación de fragmentos | 40 |
| 5.5 Secuenciación..... | 40 |
| 5.6 Análisis de secuencias | 40 |
| 6. RESULTADOS..... | 42 |
| 6.1 Productos de amplificación de la región..... | 45 |
| 6.2 Purificación y análisis de similitud de secuencias de los fragmentos amplificados | 54 |
| 6.3 Reconstrucción filogenética | 57 |
| 6.4 Determinación de genotipos | 62 |
| 7. DISCUSIÓN | 66 |
| 8. CONCLUSIONES | 70 |
| 9. PERSPECTIVAS | 71 |
| 10 REFERENCIAS..... | 72 |
| 11 ANEXO..... | 83 |

1. INTRODUCCIÓN

A pesar de que *Pneumocystis* fue descubierto hace más de 100 años, la neumocistosis (PCP o neumonía por *Pneumocystis*) aún sigue siendo un factor de mortalidad entre pacientes con VIH/SIDA, con terapias inmunosupresoras y en aquellos pacientes cuyo conteo de linfocitos es menor a 250 células/mm³. Es difícil detectar la PCP en estadios tempranos, debido a que los signos y síntomas de la patología suelen confundirse con los de otras enfermedades pulmonares. La detección del agente causal se realiza utilizando muestras provenientes del tracto respiratorio (esputo y líquido de lavado bronquio-alveolar) a través de métodos tintoriales junto con microscopía óptica (Grocott, Azul de O-toluidina, Giemsa), procedimientos inmunológicos (titulación de anticuerpos e inmunofluorescencia) y técnicas moleculares (PCR).

Los procedimientos moleculares han permitido determinar que el género *Pneumocystis* se encuentra conformado por diversas especies que son hospedero-específicas, en donde *Pneumocystis jirovecii* es la especie infectante en el hombre. Actualmente se desconocen muchos de los mecanismos dentro del ciclo biológico y continúa la incertidumbre sobre la transmisión de la enfermedad. A partir de la introducción de los antiretrovirales y la terapia profiláctica, hay datos que indican una tendencia general a la disminución del número de casos de PCP.

1.1 Antecedentes históricos

En 1909 en el estado de Minas Gerais en Brasil, el epidemiólogo Carlos Chagas describió por primera vez a *Pneumocystis* durante un estudio que realizaba en un cobayo, al cual le había inoculado sangre de niños que presentaban enfermedad por *Trypanosoma sp*; al observar un estadio quístico, consideró que se trataba de una nueva especie a la que denominó *Tripanosoma schizotrypanum*. (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Borelli *et al.*, 2000; Bottaro, 1999).

En 1910 Antonio Carini visualizó la misma forma reportada por Chagas, en pulmones de ratas (*Rattus norvegicus*) infectadas con *Trypanosoma lewisi*; al considerar relevante las formas observadas, envió parte del tejido al prestigioso parasitólogo Alphonse Laveran del Instituto Pasteur de París en Francia, quien trabajaba en ese momento con el matrimonio Delanoë. Estos investigadores habían observado las mismas estructuras

quísticas en ratas que vivían en alcantarillas. Después de observar el tejido parasitado enviado por Carini, los investigadores franceses concluyeron que se trataba de un nuevo microorganismo el cual estaba relacionado con *Trypanosoma*, por lo que Delanoë & Delanoë propusieron el género *Pneumocystis* (*Pneumo* = pulmón; *cyst* = estructura similar a quíste) y la especie *carinii* en honor a Antonio Carini (Borelli *et al.*, 2000).

Después de la Segunda Guerra Mundial, se observaron casos severos de neumonía en niños; la enfermedad fue descrita como una infección asociada a la presencia de sustancias espumosas en los alveolos pulmonares, engrosamiento de los tabiques alveolares e infiltrado inflamatorio. Al analizar estos casos, Vanek y Jiroveck, en 1952, encontraron que el agente causal de la neumonía era por *Pneumocystis carinii* (Morales-Aguirre *et al.*, 2004) y desde este momento fue reconocido a este microorganismo como un patógeno del hombre (Borelli *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 1997).

En 1955, Weller señaló que el uso de corticoides en ratas se asociaba a la susceptibilidad para desarrollar neumonía por *Pneumocystis* (PCP). Frenkel en 1976 estableció que la PCP se presentaba en forma de colonización en diversos roedores. Tiempo después se describieron casos de PCP en pacientes con inmunosupresión severa (neoplasias, trasplante de órganos, administración de corticoides y uso de drogas citotóxicas (Bottaro, 1999; Ng *et al.*, 1997).

En 1970, Vavra y Kucera, basados en sus estudios ultraestructurales, sugirieron que *Pneumocystis* podría pertenecer al grupo de los hongos. Por otra parte, Frenkel (1976) observó que los agentes causantes de neumonía en *Homo sapiens* y en *Rattus norvegicus* presentaban diferencias en antígenos y que eran especie-hospedero específicos. Esta relación entre especie de *Pneumocystis* y especie de hospedero, puede explicarse a través de las teorías de co-evolución (Aliouat-Denis *et al.*, 2008). Dentro de las primeras evidencias moleculares que describieron a *Pneumocystis* como un hongo, fueron dadas por Edman *et al* (1988) quienes encontraron similitud de la secuencia nucleotídica del gen 16S del RNA ribosómico presente en hongos (Calderón *et al.*, 2011).

Durante el 3er Taller Internacional sobre Protistas Oportunistas realizado en 1994 en Cleveland, se dio a conocer la tipificación de aislados de *Pneumocystis* basada en el polimorfismo de la secuencia de nucleótidos del rRNA. Así mismo, se llegó al acuerdo de

usar la nomenclatura trinomial (Código Internacional de Nomenclatura Botánica, ICBN), quedando el nombre de la especie de *Pneumocystis* en el hombre como “*Pneumocystis carinii sp. hominis*”. En 2001, 50 investigadores que participaban en la cumbre del Taller Internacional sobre Protistas oportunistas, realizado en Cincinnati, Estados Unidos, establecieron los parámetros para nombrar a las especies que conformaban al género *Pneumocystis*, otorgando el nombre de *Pneumocystis jirovecii* para la especie infectante en el hombre.

En los últimos años se han descrito diversas especies adicionales: *Pneumocystis wakefieldiae*, *Pneumocystis murina*, *Pneumocystis oryctolagi* (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Cermeño *et al.*, 2006; Stringer *et al.*, 2002; Ng *et al.*, 1997; Wissmann *et al.*, 2010). **Cuadro 1.**

1.2 El género *Pneumocystis*

1.2.1 Clasificación taxonómica (Redhead, 2006)

Después de integración de *Pneumocystis jirovecii* al Reino Fungi, la clasificación taxonómica más reciente de este microorganismo es la siguiente:

Super reino: Eukaryota

Reino: Fungi

Sub reino: Dikarya

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Taphrinomycotina

Clase: Pneumocystidomycetes

Orden: Pneumocystidales

Familia: Pneumocystidaceae O. E. Erikiss

Género: *Pneumocystis*

Especie: *Pneumocystis jirovecii*

1.3 Especies del género *Pneumocystis*

A partir del estudio comparativo de diferentes aislados de *Pneumocystis* obtenidos de mamíferos se han identificado diversas especies por medio de procedimientos genéticos como son cariotipos, moleculares y por análisis de antígenos de superficie (Bottaro, 1999; Hong *et al.*, 1990; Ng *et al.*, 1997; Stringer *et al.*, 2002; Wissmann *et al.*, 2010).

Las especies que conforman al género *Pneumocystis* presentan diferencias morfológicas, estructurales, antigénicas, tiempo de duplicación y especificidad del hospedero. En la mayoría de casos, estos microorganismos provocan neumonía severa en aquellos hospederos que cursan con un notable deterioro del sistema inmune. Se desconoce el papel que tienen las variaciones genéticas y fenotípicas en aspectos como patogenicidad y transmisión entre especies (Aliouat-Denis *et al.*, 2008).

Cuadro 1. Especies que conforman al género *Pneumocystis*.

| Agente etiológico | Hospedero |
|--|---|
| <i>Pneumocystis carinii</i> | Rata (<i>Rattus norvegicus</i>) |
| <i>Pneumocystis wakefieldiae</i> | Rata (<i>Rattus norvegicus</i>) |
| <i>Pneumocystis murina</i> | Ratón (<i>Mus musculus</i>) |
| <i>Pneumocystis oryctolagi</i> | Conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>) |
| <i>Pneumocystis jirovecii</i> | Hombre (<i>Homo sapiens</i>) |
| <i>Pneumocystis</i> de primates no humanos | Macacos de diversas especies |
| <i>Pneumocystis</i> de hurón | Hurón (<i>Mustela putorius furo</i>) |
| <i>Pneumocystis</i> de caballos | Caballo (<i>Equus caballus</i>) |
| <i>Pneumocystis</i> de cerdos | Cerdo (<i>Sus scrofa</i>) |
| <i>Pneumocystis</i> de perros | Perro (<i>Canis familiaris</i>) |

Durante el desarrollo del proyecto del genoma de *Pneumocystis*, la especie *carinii* (causante de neumonía en *Rattus norvegicus*) fue la primera en estudiarse (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Stringer *et al.*, 1998). **Cuadro 1.**

Se han descrito algunos hallazgos morfológicos o genéticos de las diversas especies de *Pneumocystis* que parasitan ratones, ratas y conejos y son mencionados a continuación. Esta información no es uniforme para todas las especies conocidas.

P. carinii: Los filopodios son más delgados que aquellos desarrollados en conejos y primates. El microorganismo *in vitro* sobrevive de 4 a 5 días en medio de cultivo celular conteniendo esteroides. En la tinción de Giemsa se observan las estructuras parasitarias en forma aglomerada (Aliouat-Denis *et al.*, 2008). **Cuadro 1.**

P. wakefieldiae: especie descrita tanto en ratas silvestres como de laboratorio. La aplicación de la PCR para la subunidad 26S del RNA mitocondrial permite diferenciar las especies *wakefieldiae* de *carinii* (Aliouat-Denis *et al.*, 2008). **Cuadro 1.**

P. murina: presenta una gran cantidad de filopodios; con microscopía electrónica se observan abundantes gránulos citoplasmáticos; con la tinción de Giemsa las formas tróficas y quísticas aparecen dispersas. El tiempo de duplicación del microorganismo dentro de los ratones puede ser de hasta 10 días. Tiene débil capacidad de unión *in vitro* a células diana al compararse con *P. carinii*. Aliouat-Denis *et al.* (2008) han observado que la neumonía no es tan recurrente en ratones como lo es para ratas o conejos; a estos hospederos se les ha utilizado para realizar estudios de transmisión, polimorfismo genético, relación hospedero-parasito y respuesta inmune (Aliouat-Denis *et al.*, 2008). **Cuadro 1.**

P. oryctolagi: especie usualmente benigna en conejos en destete; no es necesario recurrir a corticoesteroides para inducir la infección en el conejo, por lo que es un modelo perfecto para entender la interacción entre el líquido surfactante y el hongo, así como la respuesta del hospedero (Aliouat-Denis *et al.*, 2008). **Cuadro 1.**

A principios del año 2000 se analizaron las variaciones genéticas del rRNA y DHFR con lo cual se estimó que *P. carinii* y *P. jirovecii* se separaron hace 90-100 millones de años, dato que coincide con la divergencia de los primates de los roedores; *P. carinii* se separó de *P. murina* hace aproximadamente 51-71 millones de años, y la divergencia filogenética entre rata y ratón ha sido estimada en 70-71 millones de años. Finalmente *P. carinii* y *P. wakefieldiae* se separaron aproximadamente hace 15 a 22 millones de años (Aliouat-Denis *et al.*, 2008).

1.4 Características generales de *Pneumocystis jirovecii*

Respecto a protozoarios:

- Este microorganismo presenta en su pared carbohidratos (glucosa, manosa, β 1-3 glucano), quitina, (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Carrada, 2004).

- Comparte características morfológicas con los protozoarios (Álvarez-Martínez, 2008; Bottaro, 1999; Brancart *et al.*, 2005; Morales-Aguirre *et al.*, 2004; Ng *et al.*, 1997).
- No se ha logrado su cultivo *in vitro*.
- Es sensible a medicamentos contra protozoarios.
- Carece de ergosterol en su membrana celular.

Sin embargo presenta características que comparte y han permitido reclasificar a *Pneumocystis* dentro del reino de los hongos son (Bottaro, 1999; Ng *et al.*, 1997):

- Las secuencias de DNA mitocondrial y RNA ribosomal (subunidades 16s y 5s).
- Un fragmento de 6.8 kb del DNA mitocondrial que codifica para el apocitocromo B.
- Las subunidades 1,2 ,3 y 6 de la NADH deshidrogenasa.
- El citocromo oxidasa, subunidad II.
- La subunidad pequeña de rRNA presenta en promedio 60% de similitud con la de los hongos.
- Factor de transcripción IID y una ATPasa de translocacion de cationes tipo P.
- Presenta genes de dos enzimas importantes: 1) Timidilato sintasa: cataliza el paso de desoxiuridilato a timidilato y 2) Dihidrofolato reductasa: transforma el dihidrofolato a tetrahidrofolato. Los genes de estas enzimas se encuentran presentes en diferentes cromosomas de *Pneumocystis*.
- El rRNA 5S es homologo con el de los cigomicetos.
- El gen de la β -tubulina es 89-91% homólogo con la de los hongos filamentosos.

Características que asocian a *Pneumocystis* con los ascomicetos (Borelli *et al.*, 2000):

- ✓ El factor proteico de elongación en el gen 3EF-3, el cual es un elemento importante para la síntesis de proteínas que solo se encuentra en hongos y no en protozoarios.
- ✓ Crestas mitocondriales lamelares
- ✓ Formación de una estructura quística que contiene ocho cuerpos equivalentes a ascosporas.
- ✓ La subunidad 16S del rRNA de *P. jirovecii* se relaciona con los ascomicetos.

A través del estudio de su genoma, se ha reportado que *P. jirovecii* presenta 68% de homología con levaduras, como *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, y los hongos filamentosos *Aspergillus sp* y *Neurospora crassa* (Aliouat-Denis *et al.*, 2008).

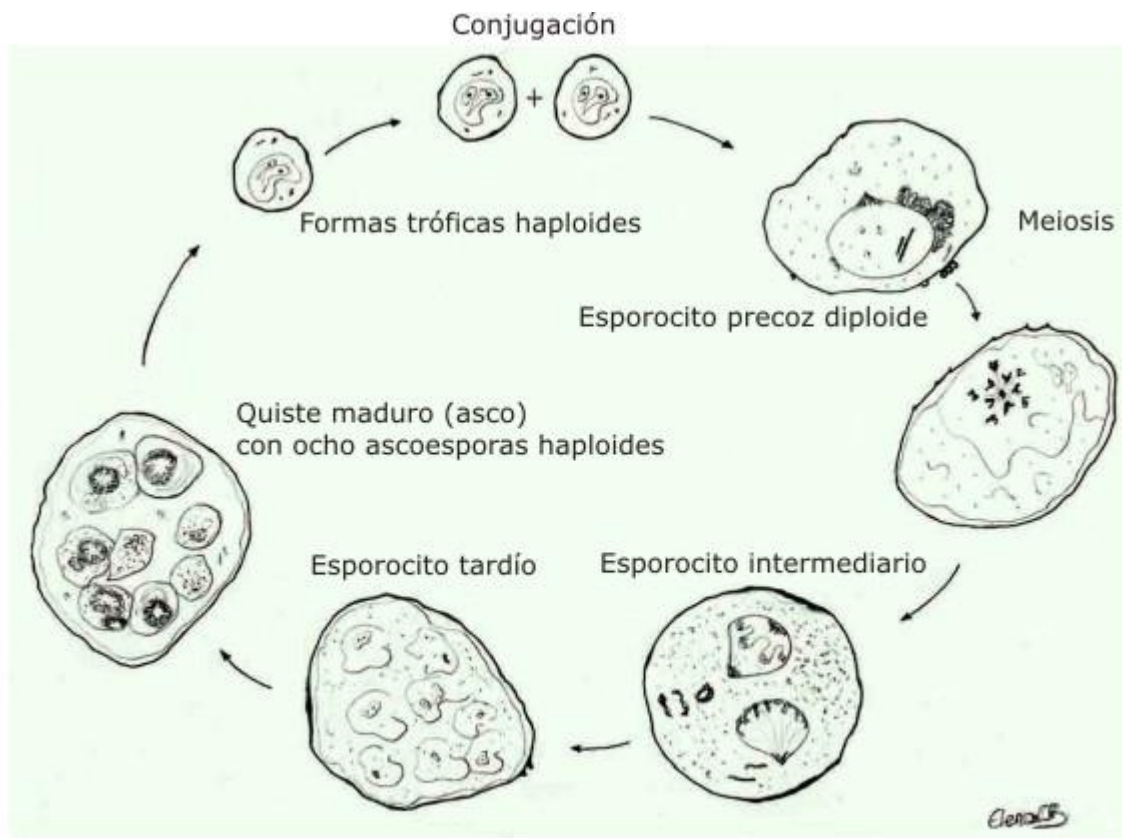
La genómica ha colocado a las especies de *Pneumocystis* en el punto de ramificación entre ascomicetos y basidiomicetos, y el género se incluyó en *Taphrinomycotina* (Aliouat-Denis *et al.*, 2009).

Ciclo de vida

La hipótesis sobre el ciclo de vida se fundamenta en imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión y reconstrucciones tridimensionales (Aliouat-Denis *et al.*, 2008).

Las formas tróficas (2-8µm de diámetro) son células de *Pneumocystis* que se adhieren a las células epiteliales alveolares de tipo 1 (neumocitos tipo 1) utilizando prolongaciones citoplasmáticas denominadas filopodios. Estas células mononucleadas (que se identifican por presentar una pared celular densa) posteriormente se transforman en esporocitos (tempranos, intermedios y tardíos) que finalmente darán lugar a una forma quística (4-7µm de diámetro) (equivalentes a una asca) que contiene ocho núcleos que al madurar darán lugar a ocho ascosporas. Esta forma quística al madurar expulsa las esporas a través de un orificio preformado iniciando una nueva generación de formas tróficas. (Aliouat-Denis *et al.*, 2009; Borelli *et al.*, 2000) **Fig. 1.**

Se consideran a las formas tróficas, esporocitos y quistes maduros, como las tres principales estructuras morfológicas de *Pneumocystis*, de las cuales la forma trófica es la predominante (90-95%) en el pulmón. Con tinciones de Diff Quick (Giemsa modificado) y Azul de Orto-toluidina, Chary-Reddy y Graves encontraron una relación entre quistes y trofozoitos de 1:10 (Aliouat-Denis *et al.*, 2009).



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

Figura 1. Ciclo de vida hipotético de *Pneumocystis jirovecii* (tomado de Calderon *et al.*, 2011).

1.5 Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*

1.5.1 Factores de riesgo:

- **Número de linfocitos:** El número de linfocitos CD4+ es un factor crucial que establece el grado de inmunosupresión, por lo que en los pacientes con VIH/SIDA el riesgo de adquirir infección por *P. jirovecii*, tuberculosis y neumonía bacteriana aumenta al tener un número de linfocitos CD4+ igual o inferior a 200 células/mm³ (Álvarez-Martínez, 2008; Beser *et al.*, 2011; Bottaro, 1999; González y Tobón, 2006; Villasís-Keever *et al.*, 2001).
- Tratamiento con citotóxicos y corticosteroides usados en neoplasias (linfoma, leucemia linfocítica, enfermedad de Hodgkin y tumores sólidos). (Álvarez-Martínez, 2008; Fernández *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 1997).

- **Tratamiento con inmunosupresores:** en pacientes con trasplantes de órganos a los cuales se les administra entre el segundo y sexto mes posterior a la intervención quirúrgica, suelen presentarse infecciones por Virus tipo 6 del Herpes, PCP, *Nocardia sp*, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii*. Los pacientes con trasplantes de corazón o pulmón son 45% más propensos de adquirir infecciones oportunistas (Álvarez-Martínez, 2008; Beser *et al.*, 2011; Cuellar-Rodríguez y Sierra-Madero, 2005).
- **Inmunodeficiencias congénitas** como la hipogammaglobulinemia.
- **Desnutrición** proteico-calórica, particularmente en niños (marasmo) (Álvarez-Martínez, 2008; Fernández *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 1997).

1.5.2 Epidemiología

A finales de la segunda guerra mundial, la neumonía afectaba a niños prematuros y desnutridos. En Berlín (1938) se describieron los primeros casos de neumonitis intersticial; después se reportaron casos en Suiza, Checoslovaquia, Italia, Hungría, Yugoslavia, Dinamarca, Suecia, Francia y Finlandia. En 1956 se registraron los primeros casos de PCP en adultos inmunodeprimidos tratados con corticosteroides. (Álvarez-Martínez, 2008). Sin embargo, fue hasta los años 80 cuando la PCP cobró vital importancia ya que con el advenimiento del VIH/SIDA los casos de morbilidad y mortalidad por PCP aumentaron dramáticamente.

- VIH/SIDA

En 1981 se describió por primera vez el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 en Estados Unidos de América, presentándose 11 casos en Nueva York y 4 en California. Años más tarde el Centro de Control de Enfermedades (Centers for Disease Control, CDC) de Atlanta recomendó a los sistemas de vigilancia epidemiológica prestar atención a los casos de infección causada por *Pneumocystis jirovecii* (antes *P. carinii*) ya que en solo un año la demanda de pentamidina se había incrementado. En 1982 se presentaron alrededor de 750 casos de PCP. La infección por VIH empezó a ser la causa de muerte en personas entre 20 y 40 años de edad (Álvarez-Martínez, 2008; Córdova-Villalobos *et al.*, 2009; Gatell *et al.*, 2009).

Hasta 2008 a nivel mundial se habían estimado alrededor de 65 millones de personas infectadas con este virus, el cual causó la muerte de más de 25 millones de personas, con un promedio de 3.1 millones de decesos al año (Córdova-Villalobos *et al.*, 2009).

El 40% de las personas que desconocen tener VIH/SIDA desarrollan alguna infección por un agente oportunista, lo que conduce a un diagnóstico tardío.

Gatell *et al* (2009) han descrito que existen alrededor de 26 infecciones por hongos oportunistas que suelen ser indicadoras de VIH-1, entre los que destacan *Pneumocystis jirovecii*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum* (Gatell *et al.*, 2009; González y Tobón, 2006).

SIDA en México

Los primeros pacientes con VIH/SIDA al parecer fueron infectados en 1981; fue en 1983 cuando se diagnosticó por primera vez la enfermedad en un hombre homosexual, mientras que en 1985 se hizo público el primer caso de SIDA en una mujer cuya fuente de infección fue una transfusión sanguínea. Desde 1983 hasta el 1 de abril de 1995 se habían notificado 22 312 casos de SIDA que integraban el Registro Nacional de Casos de SIDA. Los pacientes en México y de Latinoamérica con esta enfermedad fueron habitantes temporales en EUA (Córdova-Villalobos *et al.*, 2009).

Los primeros casos registrados en niños con VIH/SIDA fueron de 1986 en el Hospital Infantil. Hasta el año 2000 esta institución atendió 1 116 pacientes menores de 15 años con SIDA. En 1984 el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias atendió su primer caso de SIDA. (Cano *et al.*, 1989; Cota *et al.*, 2003; García *et al.*, 2003).

En 1986 el Consejo Nacional para la Prevención y Control del SIDA (CONASIDA) inicio actividades en favor de la prevención de la transmisión del VIH/SIDA (educación, epidemiología, atención médica, laboratorios, bancos de sangre. El incremento en la diseminación del virus propició la modificación de las políticas en la donación de sangre. Hasta julio de 1988, el Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicas (INDRE), tenía registrados 1565 casos de SIDA (Cano *et al.*, 1989), mientras que en 1995 se tenían 22 312 casos (624 menores de 15 años, 3 021 en mujeres adultas y 18 667 en hombres adultos). En 1988 se implementaron exámenes serológicos a grupos de personas con

prácticas de riesgo (homosexuales, prostitutas, prisioneros, hemofílicos y embarazadas), usando la técnica Western Blot para confirmación. Para 1992 se estimaba una tasa de infección de 29.4 por cada 100 000 habitantes, ocupando el decimonoveno lugar de causas de mortalidad en la población. Las ciudades con mayor índice de VIH/SIDA fueron la Ciudad de México, Jalisco y Cuernavaca, mientras que el menor índice se encontraba en Hidalgo, Tabasco, Zacatecas y Chiapas (Córdova-Villalobos *et al.*,2009).

Infecciones oportunistas en México

De acuerdo con diversos estudios, al principio de los años 80s, entre el 60 y el 100% de los pacientes con SIDA desarrollaba infecciones oportunistas; el 42% tenía afectados los pulmones, el 29% el aparato digestivo, el 25% el sistema linfático y el 11% el sistema nervioso central (Martin Del Campo Rodríguez y Sifuentes, 2004). Entre los agentes causales más frecuentes de estas infecciones oportunistas se encontraban: *Pneumocystis jirovecii* (*P. carinii*), *Candida spp.* y *Cryptosporidium spp.* *Mycobacterium spp.* el *citomegalovirus* y en menor porcentaje bacilos Gram negativos; *Treponema pallidum*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans* y *Toxoplasma gondii* (Cano *et al.*, 1989; Martin Del Campo Rodríguez y Sifuentes, 2004).

La prevalencia de PCP en el mundo es variable de acuerdo a diversos autores. En el **cuadro 2** se muestran algunos datos sobre la prevalencia de la enfermedad en diferentes países.

Cuadro 2. Prevalencia de PCP entre pacientes con VIH/SIDA en el mundo.

| País | Año | Prevalencia | Autor |
|----------------|-------------|-------------------------|--|
| América | | | |
| Brasil | 1981-1985 y | 43% | Álvarez-Martínez, 2008 Bahamondes <i>et al.</i> , 2006 |
| Chile | 1988 | 1.2 % | |
| E.U.A. | 2001-2004 | 20 000 – 50 000 por año | Morales-Aguirre <i>et al.</i> , 2004 |
| | 1982 | 50% a 39% con HAART* | |
| | 1996 | 50% | González y Tobón, 2006 |
| Haití | 2008 | 35% | Álvarez-Martínez, 2008 |
| Panamá | 1983 | 45% | Pitchenik <i>et al.</i> , 1983 |
| Venezuela | 1995 | 40% | Borelli <i>et al.</i> , 2000 |
| | 1999 | | |
| África | | | |
| Ruanda | 1990 | 3% | Álvarez-Martínez <i>et al.</i> , 2008 |
| Tanzania | 1989-1990 | 5% | |
| Zambia | 1988-1990 | 9% | |
| Rep. Dem. C. | 1989 | 14% | |
| Zimbabwe | 1989 | 22% | |
| Asia | | | |
| Tailandia | 1998 | 9-40% | Álvarez- Martínez, 2008 Banerjee, 2005 |
| Filipinas | 1998 | 27-30% | |
| Corea del Sur | 1999 | 10% | |
| India | 2005 | 6-10% | |
| Europa | | | |
| España | 2002-2006 | 22.4% | Álvarez-Martínez, 2008 |
| | 2007 | 29.2% | |

Abreviaturas: HAART = High Active Antiretroviral Therapy (Terapia antiretroviral de alta eficacia). Rep. Dem. C. = República Democrática del Congo.

PCP en pacientes con VIH/SIDA en México

En México, de 1983 a 1984, tres cuartas partes de los enfermos de SIDA eran diagnosticados con Sarcoma de Kaposi o neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. A partir de 1988, las infecciones oportunistas estaban presentes en 72.6%; entre las patologías se encontraban el Síndrome de desgaste (37.1%), la PCP (14.6%), el sarcoma de Kaposi (12.2%), la tuberculosis (10.6%) y las manifestaciones neurológicas (7.7%) (Córdova-Villalobos *et al.*, 2009).

En 1992 Gómez *et al* encontraron que de 102 autopsias realizadas en México en pacientes con SIDA, el citomegalovirus se encontraba en un 78.4%, *Mycobacterium sp.* en un 25.4% , *Pneumocystis jirovecii* en un 21.5%, *Cryptosporidium sp.* 15.6% e *Histoplasma capsulatum* 12.7%.

En 1994, el sarcoma de Kaposi y/o la PCP se presentaban en el 9.6% de pacientes con SIDA; el síndrome de desgaste en 58.2%, la tuberculosis en 10.9%, manifestaciones neurológicas en 12.9% y otras infecciones oportunistas en 55.3%. Entre las infecciones oportunistas se encontraban la candidosis, la neumonía por agente no identificado, el herpes simple, el herpes zoster, la criptosporidiosis, la criptococosis, la toxoplasmosis y la salmonelosis (Córdova-Villalobos *et al.*, 2009).

En 2003 García *et al* publicaron los resultados de un estudio retrospectivo que incluyó 1 182 expedientes de pacientes con VIH/SIDA y en los que se encontró que el 55.2% estaba infectado con *P. jirovecii*, el 21.7% tenía neumonía bacteriana y el 18.9% tuberculosis.

Individuos inmunodeficientes no VIH, portadores de *Pneumocystis*

En el líquido de lavado bronquio-alveolar (LLBA) de 77 pacientes que presentaban enfermedades respiratorias agudas, negativos a VIH, sin terapia inmunosupresora y un número de linfocitos promedio de 810 por μL , por procedimientos tintoriales, en 5 de ellos (6.5%) se encontró *P. jirovecii*. Por presentarse en niveles bajos, este resultado fue considerado como colonización en estos individuos (Armbruster *et al.*, 1997).

Portadores asintomáticos de *Pneumocystis*

De acuerdo con Wissmann *et al* (2010) se han distinguido cuatro grupos poblacionales en quienes se detecta a *Pneumocystis*, pero que no presentan síntomas respiratorios. A la población que presenta esta característica, se le denomina portadora asintomática. Estos grupos son:

- Individuos con deterioro celular como es el caso de los pacientes con VIH/SIDA que se encuentran con factores de riesgo, como bajas concentraciones de linfocitos CD4+ y la asociación de quimioprofilaxis con clotrimoxazol. Se desconoce el tiempo de

colonización; se especula que este grupo puede ser un reservorio y fuente de infección para individuos susceptibles.

- Pacientes con enfermedades pulmonares crónicas. Se ha determinado la incidencia de colonización por *Pneumocystis* en individuos con alteraciones respiratorias, como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC, 40.5%), fibrosis quística (21.5%), neumonía intersticial idiopática (37.8%), sarcoidosis (19.8%) y enfermedad intersticial pulmonar (37%). El uso de corticoides se considera de riesgo en estas personas.
- En trabajadores de la salud se han realizado estudios para detectar *P. jirovecii* en aspirado nasal, y/o esputo inducido. Se ha encontrado que el 8% (n=164) del personal de enfermería son positivos; este resultado sugiere que este personal es una fuente importante de infección/colonización para los individuos susceptibles.
- El último grupo se encuentra conformado por las mujeres embarazadas, en quienes la colonización se encuentra ligada a las alteraciones de la inmunidad celular y humoral presentes durante la gestación.

1.5.3 Fisiopatogenia

El DNA de *P. jirovecii* se ha detectado en muestras de agua y aire, aunque no se ha podido comprobar que sean un reservorio o fuente de infección (Calderón *et al.*, 2011). Se desconoce cuál es la cantidad del inóculo para causar infección, así como el tiempo que permanece el patógeno dentro del hospedero. La forma infectante sigue siendo desconocida (Fernández *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 1997; Wissmann *et al.*, 2010).

Respecto al mecanismo de infección, una hipótesis sugiere que el microorganismo se incorpora a la microbiota comensal del hospedero manteniéndose inactivo durante largos periodos de tiempo; al disminuir las defensas inmunitarias se activa la infección (Álvarez-Martínez, 2008).

Durante mucho tiempo se consideró que algunos animales como los roedores podrían ser la fuente de infección para el humano. Sin embargo, desde 1997 se descartó esta hipótesis ya que los microorganismos encontrados en humanos y roedores son genéticamente diferentes, aunque morfológicamente son indistinguibles. Se ha documentado que existe una transmisión vertical tanto en ratas como en el humano. En relación al humano, existe el reporte de un bebé nacido muerto, de una mujer que cursaba con VIH y

PCP; el resultado de la autopsia arrojó la presencia de *Pneumocystis* en el pulmón del bebé y en las vellosidades de la placenta (Beard *et al.*, 2000; Ng *et al.*, 1997).

Está bien documentado que el acceso de *Pneumocystis* al hospedero es a través de las vías respiratorias. La infección por *P. jirovecii* se produce a edades tempranas y al parecer es asintomática. La colonización ha sido detectada con estudios de inmunofluorescencia indirecta en niños mayores de 2 años. También se ha encontrado que del 83-94% de niños menores de 5 años poseen anticuerpos contra *Pneumocystis jirovecii*. Aunque la exposición se da a edades tempranas, el sistema inmune no es capaz de proporcionar una respuesta eficaz para evitar la infección en un futuro frente a las variantes antigénicas de este patógeno (Álvarez-Martínez, 2008; Bottaro, 1999; Fernández *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 1997).

Se considera que las formas tróficas de *Pneumocystis* entran al pulmón, en donde las adhesinas (fibronectina y vitronectina) favorecen su interacción con las células epiteliales alveolares (neumocitos) tipo 1, creando un puente de unión entre antígenos de superficie de *P. jirovecii* y antígenos de la célula hospedera. Posteriormente hay un acoplamiento entre los receptores de manosa de los macrófagos y de *P. jirovecii*, que produce un aumento en la permeabilidad de la membrana alvéolo-capilar a través de enzimas de degradación que libera el agente. Al adherirse las formas tróficas, proliferan y forman cúmulos; *P. jirovecii* obtiene fosfolípidos del líquido surfactante, lo cual induce la pérdida de sus características fisicoquímicas. Finalmente el microorganismo patógeno invade las cavidades alveolares que derivan en insuficiencia respiratoria (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Álvarez-Martínez, 2008; Borelli *et al.*, 2000; Fernández *et al.*, 1999; Ng *et al.*, 1997).

Los macrófagos alveolares son un componente esencial en la respuesta inmune frente a *Pneumocystis*, por lo que son considerados los responsables de eliminar a este agente infeccioso. Al detectar a *Pneumocystis*, los macrófagos lo internalizan formando fagolisosomas, induciendo la liberación de citocinas que incrementan la permeabilidad endotelial, favorecen el desarrollo de un edema pulmonar y promueven la formación de un infiltrado neutrofílico. Se ha descrito que el VIH disminuye la expresión del receptor de manosa de los macrófagos, lo cual altera su capacidad para detectar a *Pneumocystis*; este microorganismo también puede afectar la fagocitosis al propiciar la pérdida del receptor de manosa. Este evento puede ser erradicado administrando al paciente inmunoadhesina soluble (Álvarez-Martínez, 2008; Blanco y García, 2008).

1.5.4 Sintomatología

Las manifestaciones clínicas que sugieren la presencia de neumocistosis (PCP) incluyen síntomas inespecíficos como la fatiga, disnea progresiva, tos no productiva o con secreción mucosa, fiebre, cianosis, taquicardia y taquipnea. Los datos radiológicos más comúnmente observados son: infiltrado intersticial difuso bilateral (aspecto de “vidrio despulido”) **Fig.2**, infiltrado alveolar o alveolo-intersticial con localización hiliar, bilateral o bibasal. En algunos casos graves se observan cavitaciones en los lóbulos superiores o nódulos y radio-opacidades difusas. Se ha visto que los pacientes presentan disminución de presión arterial de oxígeno, incremento del gradiente de oxígeno alveolo-arterial y alcalosis respiratoria. (Álvarez-Martínez, 2008; Bava *et al.*, 2002; Calle y Cardona, 2009; Carrillo *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 1999; Flori *et al.*, 2004; Gatell *et al.*, 2009; Metta *et al.*, 2006). La insuficiencia respiratoria es la complicación más frecuente de la PCP y se asocia con una alta mortalidad (Álvarez-Martínez, 2008).

En niños y adultos la sintomatología puede confundirse con la de otras enfermedades como la tuberculosis miliar, infección por *Mycobacterium avium intracellulare*, histoplasmosis, el citomegalovirus, neumonitis intersticial linfoide (Atzori *et al.*, 1999; Carrada, 2004).



Figura 2. Placa simple de tórax de un paciente con neumonía por *P. jirovecii* en la que se observa patrón de vidrio despulido. Imagen tomada de Cortés-Télles *et al.* (2011).

1.5.5 PCP extrapulmonar

Existen pocos estudios sobre la presencia de *P. jirovecii* fuera del pulmón. Entre los órganos que han sido involucrados se encuentran: oído, ojo (coroides), tiroides, bazo, hígado, riñones, ganglios linfáticos abdominales, en pared del intestino delgado, médula ósea, músculo, meninges, corteza cerebral, tracto gastrointestinal (colon descendente y sigmoides) (Ng *et al.*, 1997). Cada uno de estos casos ha presentado condiciones epidemiológicas, terapéuticas y clínicas diferentes. Se creó que la infección por *Pneumocystis* se disemina por vía hematogena y linfática a partir del tejido pulmonar destruido. El agente infeccioso en estos casos solamente ha sido detectado *post mortem* (Álvarez-Martínez, 2008; Chary-Reddy y Graves, 1996).

Experimentalmente se ha reportado que las ratas que desarrollan PCP extrapulmonar presentan cargas elevadas del agente infeccioso en pulmones, dando lugar a la destrucción del tejido mismo y coadyuvando a la diseminación de *P. carinii*. (Chary-Reddy y Graves, 1996).

En Estados Unidos de América desde el año 1982 a 1997 se reportaron 90 casos de PCP extrapulmonar en pacientes con VIH. Se calcula que la incidencia de casos por PCP extrapulmonar es de 1-3% (Ng *et al.*, 1997).

1.5.6 Tratamiento

Desde que se conoce la enfermedad, una gran diversidad de agentes antimicrobianos se han utilizado para el tratamiento de la PCP.

Por carecer de ergosterol, en su membrana celular, los antifúngicos como miconazol, anfotericina-B, 5-fluorocitocina, alilaminas y los agentes triazólicos no pueden ser utilizados para erradicar la infección por *P. jirovecii* (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Carrada, 2004; Ng *et al.*, 1997). A continuación se enlistan los medicamentos que han sido utilizados para el tratamiento de la PCP y se describe brevemente su mecanismo de acción.

- **Trimetrexato:** es un potente inhibidor de la Dihidrofolato reductasa (DHFR), que altera la síntesis de DNA, RNA y proteínas con la consiguiente muerte celular (Fulton *et al.*, 1995).
- **Clindamicina:** antibiótico de amplio espectro que se une de forma irreversible a la subunidad ribosomal 50s de las bacterias. Inhibe la síntesis de proteínas bacterianas

alterando su superficie celular con lo cual se disminuye la producción de toxinas y enzimas bacterianas (Smieja,1998).

- **Primaquina:** probablemente induzca la generación de oxígeno reactivo, que al interferir con el transporte de electrones, produce un efecto parasiticida (Mendoza, 2008).
- **Pirimetamina:** inhibidor potente de la dihidrofolato reductasa, enzima que cataliza la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato, el cual es indispensable para la biosíntesis de purinas, pirimidinas y de algunos aminoácidos. La inhibición de la DHFR se manifiesta en los parásitos por deficiencia de la división celular (Calvo y Martínez-Martínez, 2009).
- **Trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX):** el trimetoprim actúa sobre la DHFR, enzima que cataliza el paso de dihidrofolato a tetrahidrofolato, fundamental para llevar a cabo la síntesis de ácido fólico, y en consecuencia impide la formación de DNA. El sulfametoxazol (SMX), al ser un análogo del PABA actúa sobre la dihidropteroato sintetasa (DHPS) (Lorenzo *et al.*, 2005).
- **Pentamidina:** antiprotozoario que interfiere con el metabolismo nuclear por inhibición de la síntesis de DNA, RNA, fosfolípidos y proteínas (Hardman *et al.*, 1996).
- **Atovacuna:** actúa sobre el complejo bc₁ citocrómico e inhibe el transporte de electrones de la membrana mitocondrial, colapsa el potencial de membrana e interfiere con la síntesis de ATP y pirimidinas (Hardman *et al.*, 1996).
- **Casposungina:** antifúngico que inhibe la 1,3-beta-D-glucano sintetasa de la pared celular que conlleva a la producción de hifas deformes y la muerte del hongo, ya que disminuye la síntesis de glucanos, componente básico de la pared celular de diversos hongos (Mensa *et al.*, 2008).

La pentamidina fue el primer medicamento que se utilizó para el tratamiento de la PCP en 1958, manteniéndose como tratamiento estándar hasta mediados de los años 70. Hasta 1989 fue aprobada como medicamento apto para la profilaxis anti-PCP. Este fármaco tiene relativamente pocos efectos secundarios entre los que se encuentra el sabor metálico en la boca. No es eficaz para prevenir o tratar la infección extrapulmonar (Álvarez-Martínez, 2008; Andama *et al.*, 2009).

Actualmente TMP-SMX es el fármaco de elección para la PCP. (Álvarez-Martínez, 2008; Borelli *et al.*, 2000; Calle, 2009; Carrillo *et al.*, 2008; González y Tobón, 2006; Ng *et al.*, 1997; Villasís-Keever *et al.*, 2001). Su administración es por vía oral y su adquisición es de bajo costo y está disponible en el mercado. Entre sus desventajas se encuentra su toxicidad; entre 30 y 40% de los pacientes que cursan con VIH no toleran las profilaxis con sulfas debido a que experimentan fiebre, cefalea, náusea y erupción cutánea, supresión de la médula ósea y aumento de las concentraciones de las enzimas hepáticas (Mendoza, 2008).

La caspofungina es un antifúngico que ha mostrado actividad contra la infección experimental por *P. carinii* (Deresinski, 2003). En algunos casos ha sido utilizada con éxito en humanos (Hof y Schnülle, 2008; Mu *et al.*, 2009). Sin embargo, no hay estudios con un número suficiente de pacientes que perfilen a este medicamento como efectivo en la neumocistosis humana.

La implementación de una profilaxis primaria o secundaria con alguno de los medicamentos antes mencionados, ha permitido disminuir la frecuencia de PCP y aumentar la sobrevivencia del paciente. La **profilaxis primaria** se suministra cuando el número de linfocitos es inferior a 200/ μ L, se tiene diagnóstico de SIDA y existe fiebre inexplicada con duración mayor a 20 días. La **profilaxis secundaria** se suministra posterior a un cuadro de PCP para prevenir una recaída (Álvarez-Martínez, 2008).

1.5.7 Resistencia a antibióticos

Se ha encontrado que en los países en vías de desarrollo los pacientes con neumocistosis presentan 13.3% de mutaciones en el gen de la DHPS derivadas del uso de sulfamidas, mientras que en los países en desarrollo se han encontrado un 91% de mutaciones (Córdova-Villalobos *et al.*, 2009; Wissmann *et al.*, 2010).

Se ha descrito que la reincidencia de PCP en pacientes con SIDA bajo terapia profiláctica se asocia a: 1) abandono de la profilaxis, 2) medicamentos distintos a TMP-SMX, 3) mutaciones en el gen de la DHPS y 4) la inmunosupresión grave (Bottaro, 1999; González y Tobón, 2006).

La descripción de las mutaciones presentes en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* se ha basado en el estudio de esa enzima en *E.coli*. En la cepa silvestre de *E. coli* el aminoácido 55 corresponde a treonina (Thr) y el aminoácido 57 corresponde a prolina (Pro) (Álvarez-

Martínez, 2008; Huang *et al.*, 2004; Calderón *et al.*, 2004). Los cambios producidos en el gen DHPS de *P. jirovecii* ha propiciado el reporte de diversos genotipos; algunos de ellos se muestran en el cuadro 3:

Cuadro 3. Genotipos de la DHPS descritos por diversos autores. Tomado de Huang *et al.*, 2004.

| Genotipo DHPS | Nucleótido | Aminoácido Posición 55 | Nucleótido | Aminoácido Posición 57 |
|----------------------|-------------------|-----------------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| Silvestre 1 | 165 | Treonina | 171 | Prolina |
| Mutante 2 | 165 | Alanina | 171 | Prolina |
| 3 | 165 | Treonina | 171 | Serina |
| 4 (doble mutante) | 165 | Alanina | 171 | Serina |
| Mixtos 5 | 165 | Treonina | 171 | Prolina/Serina |
| 6 | 165 | Treonina/Alanina | 171 | Prolina/Serina |
| 7 | 165 | Treonina/Alanina | 171 | Prolina |
| 8 | 165 | Alanina | 171 | Prolina/Serina |

Cuando *Pneumocystis* presenta mutaciones en el locus DHPS, principalmente es en los nucleótidos 165 y 171, sitio de unión de las sulfas. La primera mutación corresponde a la transición de A a G o el cambio de treonina a alanina en el nucleótido 55. La segunda mutación corresponde a la transición de C a T o el cambio de prolina por serina (Le Gal *et al.*, 2012).

El porcentaje de resistencia reportado varía de acuerdo a diferentes autores. En España, Calderón *et al* (2004) describen un 75% en una muestra de 12 pacientes. En San Francisco se encontró en el 71% de los pacientes con SIDA/PCP. En Copenhagen (1999) se ha encontrado un 20%; en Londres, 17-23% y en Zurich, 10% (Calderón *et al.*, 2004; Wissmann *et al.*, 2010).

Estas mutaciones han sido asociadas a la resistencia de *P. jirovecii* a TMS y dapsona (Álvarez-Martínez, 2008; Beard *et al.*, 2000; Calderón *et al.*, 2004; Dimonte *et al.*, 2013; Muñoz *et al.*, 2012; Wissmann *et al.*, 2010).

En la región ITS se han documentado aproximadamente 15 tipos diferentes de ITS1 y 14 tipos diferentes de ITS2, de los cuales A₂c1 y B₂a1, se han asociado a PCP severa, a infecciones persistentes y a falla profiláctica (Álvarez-Martínez, 2008; Matos *et al.*, 2003). La asociación de estos genotipos con la resistencia del microorganismo a las diferentes drogas terapéuticas queda por determinar.

1.5.8 Diagnóstico

1.5.8.1 Revisión de muestras

El diagnóstico de la PCP se realiza a partir de muestras del tracto respiratorio, como esputo inducido, biopsia pulmonar, biopsia transbronquial, líquido de lavado bronquioalveolar (LLBA) o líquido de lavado orofaríngeo, de los cuales el LLBA es considerado el material óptimo (Álvarez-Martínez, 2008; Bava *et al.*, 2002; Brancart *et al.*, 2005; Carrillo *et al.*, 2008; De Armas *et al.*, 2008).

Respecto al esputo se recomienda obtenerlo por expectoración inducida por nebulización con solución salina hipertónica al 3%. Es una técnica que ha demostrado tener 56 - 94.7% de sensibilidad (Casanova *et al.*, 1992).

1.5.8.2 Procedimientos tradicionales tintoriales

Durante el siglo pasado, la detección de *Pneumocystis* se basaba principalmente en el estudio morfológico con ayuda de diferentes tinciones fundamentadas en la composición celular del microorganismo. Además, el uso de la microscopía electrónica de transmisión propició el conocimiento detallado de las estructuras del ciclo de vida propuesto para *Pneumocystis* (Álvarez-Martínez, 2008; Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Armbruster *et al.*, 1997; Bava *et al.*, 2002; Bava *et al.*, 2005; Borelli *et al.*, 2000; Calderón *et al.*, 2004; Carrada, 2004; Casanova *et al.*, 1992; Cermeño *et al.*, 2006; De Armas *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 1999; Gómez *et al.*, 1992; Metta *et al.*, 2006; Ng *et al.*, 1997).

Los procedimientos tintoriales más utilizados en los diferentes laboratorios de diagnóstico son plata-metenamina de Gomori, Giemsa, blanco de calcoflúor, azul de ortotoluidina e inmunofluorescencia, que son descritos brevemente a continuación.

Plata metenamina de Gomori (Grocott)

La presencia de quitina y de beta-glucanos en la pared celular de *Pneumocystis* facilita su detección a través de esta tinción. En presencia de ácido crómico, los grupos hidroxilo de los polisacáridos de la pared celular (en general de los hongos) son oxidados a aldehídos; estos, a su vez, reducen el complejo nitrato-plata metenamina produciendo la coloración marrón a negra, debido al depósito de la plata reducida en los lugares de localización de los aldehídos. **Fig. 3.**

La pared celular del hongo se observa delineada en color marrón-negro, el color del fondo es verde (por el uso de verde de malaquita durante el procedimiento). Algunas células y tejidos del hospedero, como eritrocitos pueden teñirse también de verde (Arango y Castañeda, 2003). Esta técnica permite visualizar las formas quísticas (Bava *et al.*, 2002; Bava *et al.*, 2005). La sensibilidad se ha calculado en un 80% y la especificidad cercana a un 100% en un estudio de 111 muestras de LLBA de pacientes con SIDA (Bava *et al.*, 2005). Procop *et al.* (2004) obtuvo una sensibilidad de 79.4% y una especificidad de 99.2%. Jiancheng *et al.* (2009) describió una sensibilidad de 100% y una especificidad de 87.9%.

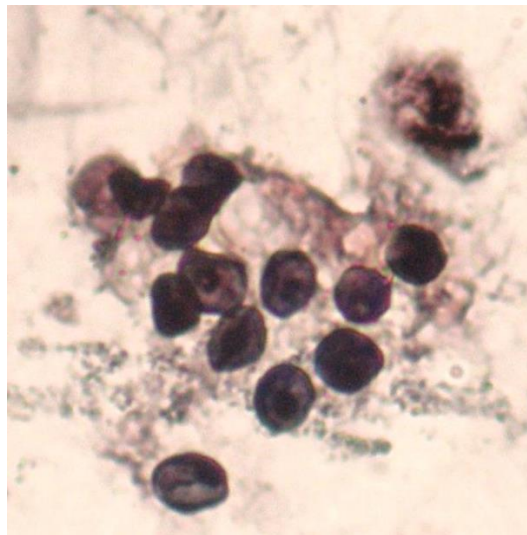


Figura 3. Examen microscópico de LLBA, teñido con Grocott (100X), en el que se observan formas quísticas. La muestra pertenece al paciente no. 1 del INER, la cual fue considerada control positivo de DNA de *P. jirovecii* para la PCR anidada.

Giemsa

Este procedimiento de tinción combina el azul de metileno con eosina. Los iones de eosina están cargados negativamente y tiñen los componentes básicos de las células de color entre naranja y rosa, mientras que otros pigmentos tiñen las estructuras celulares ácidas en varios tonos entre azul y violeta (Murray *et al.*, 2006) **Fig.4.**

Permite identificar las formas tróficas y quísticas de *Pneumocystis*, de tal forma que el citoplasma presenta coloración azul, y el material nuclear adquiere un tono de rojo a púrpura (Bava *et al.*, 2002; Carrada 2004; García *et al.*, 1993). Esta coloración también pone en evidencia las formas intraquísticas (Bava *et al.*, 2005; Panizo y Reviakina, 2002).

Andama *et al.* (2009) reportaron una sensibilidad de 58% y una especificidad de 97% al aplicar esta tinción en muestras de esputo, mientras que al usar LLBA se observó una sensibilidad de 81-100% y especificidad de 97%. Armbruster *et al* (1998) describieron una sensibilidad de 79.1% y una especificidad de 99.2%.

Esta técnica se utiliza también para detectar parásitos sanguíneos, cuerpos de inclusión de virus y clamidias y especies de *Borrelia*, *Toxoplasma*, *Rickettsia*, *Histoplasma capsulatum* y especies de *Leishmania* (Koneman *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 2006).

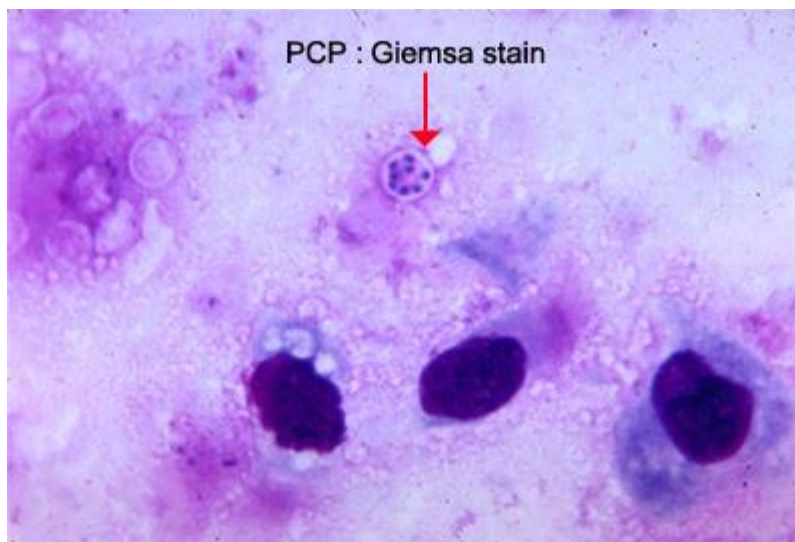


Figura 4. Examen microscópico de espécimen biológico teñido con Giemsa, en el que se observa una estructura compatible con una forma quística de *P. jirovecii*. Imagen tomada de opportunistic infections (http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/applications/pics/parasitic3.html).

Azul de Orto-Toluidina

El azul de toluidina (AT) es un colorante catiónico, cuya unión al ADN da un color azul-violeta (metacromático), que corresponde a agregados de AT interactuando iónicamente con los fosfatos negativos. La coloración azul celeste (ortocromática) se debe a la participación de un número mucho más reducido de moléculas de AT que se unen como monómeros al ADN, mediante intercalación o por unión iónica (Carretero *et al.*, 2009).

El azul de Orto-toluidina tiñe la pared de los quistes de *Pneumocystis* de rojizo o púrpura, con un fondo ligeramente azul; todo el material de fondo se remueve con los ácidos que se emplean para el tratamiento inicial de la muestra (Álvarez-Martínez, 2008; Arango y Castañeda, 2003; Carrada, 2004; Chary-Reddy y Graves, 1996; Bava *et al.*, 2005; Panizo y Reviakina, 2002).

Aderaye *et al.* (2008) describieron la sensibilidad de 71.4% y 34.5% en esputo; mientras que en LLBA la sensibilidad fue de 68% y 41.5% con una especificidad en ambos casos de 100%. Tiley *et al.* (1994) obtuvieron una sensibilidad de 49% y una especificidad de 33-65%. Ng *et al.* (1990) reportaron una sensibilidad de 74% y una especificidad de 100% en muestras de esputo.

Blanco de calcoflúor con azul de Evans

El calcoflúor es un fluorocromo que se une a los polisacáridos con enlaces β 1-3 y β 1-4, presentes en polímeros como la celulosa y la quitina. El colorante fluoresce cuando se expone a una fuente de luz ultravioleta de longitud de onda corta o una longitud de onda mayor de 410-450 nm, capaz de producir luz azul. Es un método de alta sensibilidad para definir claramente los elementos micóticos en muestras clínicas, pero requiere de un microscopio de fluorescencia (Arango y Castañeda, 2003). Esta tinción también detecta levaduras, lo cual puede dar un diagnóstico falso-positivo.

Procop *et al.* (2004) describieron una sensibilidad de 73.8% y una especificidad de 99.6% en un estudio de 313 muestras respiratorias. Stratton *et al.* (1991) reportaron una sensibilidad de 78.3% y una especificidad de 100%. Baselski *et al.* (1990) describieron una sensibilidad de 95% y una especificidad de 100%.

1.5.8.3 Procedimientos inmunológicos

Inmunofluorescencia

Permite identificar microorganismos en muestras clínicas y detectar la presencia de anticuerpos específicos en el suero. Combina colorantes fluorescentes como el isotiocianato de fluoresceína unidos al anticuerpo para conferirle fluorescencia cuando se expone a la luz ultravioleta.

Existen dos tipos:

- Inmunofluorescencia directa. Durante este procedimiento se utilizan anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína, los cuales se unen al antígeno (moléculas de la superficie de la pared celular de *Pneumocystis*) tras una breve incubación. La muestra se examina con un microscopio de fluorescencia para detectar las estructuras de interés en un color amarillo verdoso. Esta técnica es más sensible y específica que las tinciones comunes ya que puede detectar tanto formas quísticas como formas tróficas (Álvarez-Martínez, 2008; Arango y Castañeda, 2003; Bava *et al.*; 2002).
- Inmunofluorescencia indirecta. Se utiliza para detectar la presencia de anticuerpos anti-*Pneumocystis* en suero. Durante este procedimiento se utilizan antígenos de *Pneumocystis* que van a formar complejos con los anticuerpos séricos. Para que este complejo antígeno-anticuerpo pueda observarse, se utiliza una anti-inmunoglobulina sérica humana (anti-IgSH) y un anticuerpo que reacciona con cualquier anticuerpo humano, marcado con fluoresceína.

Algunas desventajas de esta técnica son: a) la presencia de fluorescencia de fondo que puede dificultar la interpretación de los resultados; b) la necesidad de contar con un microscopio especial para la observación y c) la documentación fotográfica de los resultados debe ser rápida, dada la disminución o pérdida de fluorescencia con el paso del tiempo (Ceccotti *et al.*, 2007; Tortora *et al.*, 2007).

Armbruster *et al* (1997) describieron una sensibilidad de 97.3% y una especificidad de 56.1% en 217 muestras de pacientes con VIH/SIDA, mientras que Bahamondes *et al* (2006) determinaron una sensibilidad de 90% y una especificidad de 90-100%. Cartwright *et*

al (1994) describieron una sensibilidad de 78% y especificidad de 100% al aplicarse en 166 esputos inducidos; mientras que en LLBA se obtuvo una especificidad y sensibilidad de 100%.

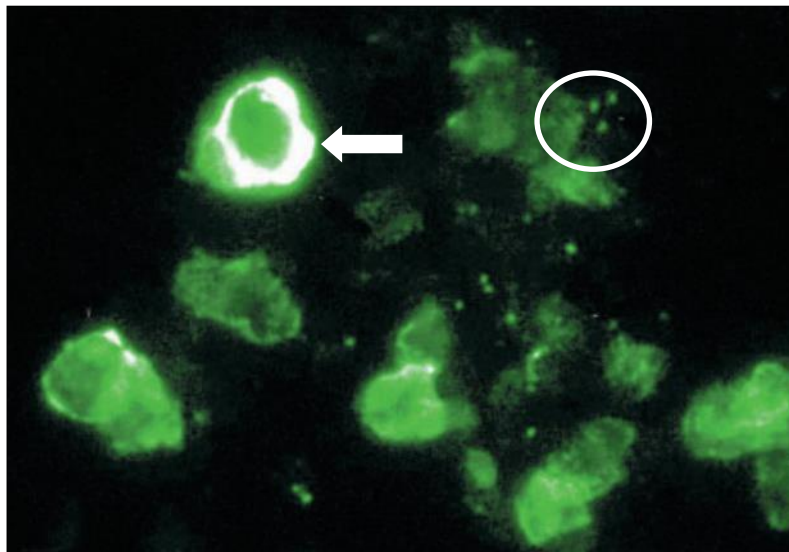


Figura 5. Examen microscópico de producto biológico teñido con anticuerpos teñidos con inmunofluorescencia. Se observan las formas tróficas y quísticas de *P. jirovecii* las cuales están indicadas por un círculo y una flecha respectivamente. Imagen tomada de Thomas y Limper (2004).

1.5.8.4 Titulación de anticuerpos

La presencia de anticuerpos anti-*Pneumocystis* han sido detectados a edades tempranas. De acuerdo a Calderón *et al.* (2011), en el 85% de los niños de 20 meses son detectables. En los primeros estudios para detectar anticuerpos séricos se recurría a técnicas como la inmunotransferencia. Sin embargo este procedimiento no permitía la cuantificación, por lo que actualmente se utiliza la técnica de ELISA (Enzyme-Linked immunoSorbent Assay) (Burbelo *et al.*, 2007).

Se ha observado que el (1-3) β -D glucano es el principal componente estructural de la pared celular en hongos incluyendo las formas quísticas de *Pneumocystis jirovecii*. Altos niveles séricos de este polímero se han reportado en pacientes con PCP, sobre todo en aquellos que cursan con VIH.

Este procedimiento presenta una sensibilidad de 90-100% y una especificidad de 88-96%. Se ha reportado que la técnica puede dar falsos positivos en un 30% (Varela *et al.*, 2011). Desafortunadamente no es una prueba específica para *P. jirovecii*. Esta técnica es más barata que otras pruebas y no depende de personal altamente calificado para llevarla a

cabo. Este procedimiento no está disponible en muchos hospitales (Morris y Masur, 2011). Existe controversia en torno a la técnica ya que algunos autores mencionan que los niveles de β -D glucano tienden a disminuir cuando el paciente recibe un tratamiento efectivo anti-*Pneumocystis*, mientras que otros han observado que los niveles de β -D glucano pueden no estar relacionados con el diagnóstico de PCP, ni con la severidad de la enfermedad (Varela *et al.*, 2011).

Otra molécula que han sido utilizada para el diagnóstico serológico de la neumocistosis son la glicoproteína KL-6, que es expresada por los neumocitos tipo II y células epiteliales bronquiales. Se han descrito que KL-6 es un marcador de lesiones pulmonares y de regeneración del epitelio, por lo que no es útil como marcador específico de infección por *Pneumocystis* (Varela *et al.*, 2011).

Se ha observado que la S-adenosilmetionina (SAM) podría estimular el crecimiento *in vitro* de *Pneumocystis*, debido a que este microorganismo no es capaz de sintetizarlo; además, los niveles de S-adenosilmetionina en plasma son bajos en pacientes que cursan con PCP y conforme reciben tratamiento incrementan los niveles de la coenzima. A pesar de los estudios que se han realizado en torno al S-adenosilmetionina, no se ha podido diferenciar entre una infección y colonización, además de que varios factores pueden repercutir en la concentración plasmática de SAM (Varela *et al.*, 2011).

La detección de anticuerpos en suero permite detectar infecciones fúngicas sistémicas. Se ha observado que la respuesta de anticuerpos contra *Pneumocystis* es altamente variable y los resultados reportados por diversos grupos son contradictorios. Los ensayos con anticuerpos, especialmente aquellos que usan antígenos recombinantes, constituyen una interesante herramienta en epidemiología (Varela *et al.*, 2011).

Hasta ahora la Glicoproteína mayor de superficie (MSG) es el único antígeno de *P. jirovecii* que ha sido mejor caracterizado (Calderón *et al.*, 2011).

1.5.8.5 Procedimientos moleculares

1.5.8.5.1 Genes blanco

Debido a que no se han logrado medios de cultivo para recuperar a *P. jirovecii* de los diversas muestras clínicas, y a que las técnicas tintoriales son muy laboriosas y dan un resultado tardío, en los últimos años se han desarrollado diversos métodos moleculares para detectar este microorganismo. A principios de la década de los 90s se desarrollaron los

primeros ensayos de PCR para evidenciar el DNA de *Pneumocystis* en muestras de líquido de lavado bronquio-alveolar (Wakefield *et al.*, 1994). Desde entonces esta técnica ha sido modificada y mejorada con la finalidad de aumentar la sensibilidad y especificidad en la prueba. Las diferentes técnicas han sido dirigidas a diversos genes blanco (los cuales hasta 2008 eran aproximadamente 15); entre ellos destacan el gen de la subunidad mayor del RNA mitocondrial (mtLSUrRNA, primer gen estudiado), la subunidad menor del RNA ribosomal (mtSSUrRNA), el gen del citocromo b mitocondrial, el espaciador interno transcrito del ribosoma nuclear (ITS1 e ITS2), el gen de la dihidropteroato sintetasa (DHPS), la proteína mayor de superficie (MSG), beta-tubulina, timidilato sintasa y el gen *arom* (Aliouat-Denis *et al.*, 2008; Álvarez-Martínez, 2008; Beard *et al.*, 2000; Beser *et al.*, 2011; Brancart *et al.*, 2005; Calderón *et al.*, 2011; De Armas *et al.*, 2008; Durand-Joly *et al.*, 2005; González y Tobón, 2006; Stringer *et al.*, 2002).

La región ITS1 se encuentra ubicada entre los genes rRNA 18S y 5.8S; y la región ITS2 se encuentra localizada entre los genes rRNA 5.8S y 26S. Respecto a ITS1 se ha reportado el hallazgo de 15 tipos de secuencias (A-O), mientras que para ITS2 se tienen 14 tipos de secuencias (a-n). Las secuencias de ITS presentes en aislados humanos difieren de los aislados presentes en ratas (Lee *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1995) **Fig.6**.



Figura 6. Relación de las regiones ITS con los genes para diferentes subunidades de rRNA. Tomada y modificada de Lu *et al.*, 1994.

1.5.8.5.2 PCR tradicional

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Esta técnica fue desarrollada por Kary B. Mullis en 1983 y se usó inicialmente para el diagnóstico de la anemia falciforme. La PCR es una técnica muy precisa ya que duplica de manera exponencial secuencias de DNA a partir de una cantidad muy pequeña de éste, el cual se usa como templado, además de un par de oligonucleótidos que funcionan como cebadores y limitan la secuencia de interés, de una DNA polimerasa (Taq polimerasa), de

nucleótidos trifosfatados (dNTPs) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), de una solución amortiguadora de la reacción y sales de MgCl₂. La amplificación del DNA se lleva a cabo en un aparato que realiza cambios rápidos de temperatura (termociclador) y ocurre en ciclos repetidos de la siguiente secuencia de reacciones: 1) Separación de las hebras de DNA (95°C); 2) Hibridación de los cebadores al DNA de interés (con la temperatura de alineación ya determinada); 3) Amplificación o polimerización del fragmento sintetizado (72°C). Así, se incrementa la cantidad de DNA de forma exponencial, y se obtendrán hasta 10⁶ copias en 25 ciclos. Posteriormente los productos son separados por electroforesis en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio o con SYBR green y son observados en un transiluminador que emite luz UV. El tamaño de los fragmentos de DNA generados se determina por comparación con un marcador de peso molecular conocido (González, 2008).

La sensibilidad y especificidad de la PCR es variable dependiendo de la experiencia de los diversos autores. Así, los porcentajes para la primera oscilan entre 97% y 98% y para la segunda entre 56 y 79% (Armbruster *et al.*, 1997; Huggett *et al.*, 2008). Estos porcentajes varían también en función de la técnica utilizada o incluso del espécimen o del tipo de paciente. Por ejemplo, en un estudio realizado en 17 muestras de tracto respiratorio Caliendo *et al.* (1998) observaron una sensibilidad y especificidad de 100% y 98% respectivamente al usar LLBA mientras que al utilizar esputo obtuvieron una sensibilidad de 94% y una especificidad de 90%.

Se ha observado que al utilizar primers para la mt-rRNA, la sensibilidad es de 48.6% y una especificidad de 100% (Atzori *et al.*, 1999). Al usar primers mtLSUrRNA se ha reportado una sensibilidad de 100% y especificidad de 90% (Durand-Joly *et al.*, 2005). Otros primers han sido utilizados con menor frecuencia para genes blanco como: β – tubulina, citocromo B, MSG, 5SrRNA, SOD (super oxido dismutasa), timidilato sintasa, tioredoxin reductasa y DHPS (Dihidropteroato sintetasa). La sensibilidad y especificidad para estos genes es variable (Calderón *et al.*, 2011; Robberts *et al.*, 2007).

Utilidad de la PCR tradicional en el diagnóstico de la PCP

Esta técnica ha sido descrita como más sensible que el examen microscópico con diferentes tinciones; incluso este procedimiento ha dado resultados positivos en personas que no presentan sintomatología respiratoria y que han sido consideradas como portadoras

asintomáticas. En este tipo de personas por PCR se ha encontrado una positividad que oscila entre 2-21%.

1.5.8.5.3 PCR anidada

La PCR anidada es una modificación de la PCR diseñada para aumentar la sensibilidad de la reacción del ensayo. Incluye el uso secuencial de dos juegos de primers dirigidos contra la misma región blanco. El primer juego se usa para amplificar una secuencia blanco. A continuación se utiliza el amplicón obtenido como secuencia diana para una segunda amplificación en la que se usan cebadores que se hibridan a las regiones internas del primer amplicón. El mayor problema de esta metodología es la posibilidad de contaminación del amplicón y la consecuente pérdida de especificidad del ensayo como prueba clínica (Forbes *et al.*, 2009; Winn *et al.*, 2008).

Lu *et al.* (1995) desarrollaron por primera vez la PCR anidada dirigida a diferentes genes blanco de *P. jirovecii*. Esta técnica fue más sensible para amplificar la región ITS (Lu *et al.*, 1995).

Al igual que con la PCR tradicional, los resultados de sensibilidad y especificidad han sido variables dependiendo de los diferentes investigadores, tipos de muestras, genes blanco. Aplicando la PCR anidada dirigida a la región ITS y aplicada a líquidos de lavados orofaríngeos, Atzori *et al.* (1999) encontraron una sensibilidad de 69.1% y una especificidad de 100%. Se ha estimado que la PCR anidada es de 30 a 50 veces más sensible que una PCR tradicional (Atzori *et al.*, 1999, Lu *et al.*, 1995). Durand-Joly *et al.* (2005) *et al* describieron una sensibilidad de 90% y especificidad de 100% al usar primers dirigidos al mtLSUrRNA y un termociclador con Touch Down. Muñoz *et al.* (2012) describieron una sensibilidad de 86% y una especificidad de 98%.

Con primers para otros genes blanco la sensibilidad y especificidad han sido menores. Por ejemplo Álvarez-Martínez *et al.* (2006) al emplear el gen de la DHPS en PCR anidada observaron una sensibilidad de 94% y una especificidad de 81% (Beard *et al.*, 2000; Calderón, 2004; Calderón *et al.*, 2011; Durand-Joly *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 1995; Tsolaki *et al.*, 1998).

1.5.8.5.4 PCR tiempo Real

El primer reporte de PCR en tiempo real fue documentado por Higuchi *et al.* en 1993. Este procedimiento fue realizado utilizando bromuro de etidio durante la PCR, un termociclador modificado para irradiar rayos UV y una cámara de detección. La señal recogida fue graficada en función de cada ciclo. Los datos finales indicaban la cantidad de producto de PCR que era generado durante cada uno de los ciclos (Anaya *et al.*, 2005).

Ésta técnica brinda la posibilidad de medir los productos de PCR a medida que estos se van generando (“en tiempo real”). Al inicio de la fase exponencial el termociclador hace una medición inicial a partir de la emisión de fluorescencia basal con el objetivo de que todas las muestras utilizadas sean comparables y normalizadas. La fluorescencia emitida se debe a la acción de agentes intercalantes o marcadores de unión de DNA y sondas específicas marcadas con fluorocromos. Los primeros son compuestos que se insertan entre las bases de una molécula de DNA, interrumpiendo la alineación y el apareamiento de bases de las cadenas complementarias (colorantes de acridina, bromuro de etidio). La emisión de fluorescencia se da cuando los marcadores se unen al DNA de cadena doble, de tal forma que a mayor cantidad de producto generado en la reacción de PCR, mayor cantidad de fluorescencia será emitida. Esta señal es calculada en función de la cantidad de fluorescencia emitida por la reacción, previo a su duplicación exponencial y es graficada en un punto en donde la señal originada de una muestra es significativamente mayor que la señal fluorescente de fondo. De esta manera, el número de ciclos de PCR requeridos para generar suficiente señal de fluorescencia que sobrepase la señal basal, se le conoce como punto de corte (C_p , crosspoint) o ciclo umbral (C_t , threshold cycle). Los valores C_p son directamente proporcionales a la cantidad de templado inicial y son la base para calcular los niveles de expresión de mRNA o la cantidad de copias de DNA iniciales (Fonseca *et al.*, 2010)

En 2002 Larsen *et al* propusieron la PCR tiempo real como un método de detección de *P. jirovecii*, la cual podría distinguir entre una colonización (portador asintomático) y una enfermedad clínica (Flori *et al.*, 2004; González y Tobón, 2006). En 2005 Brancart *et al* desarrollaron la PCR tiempo real cuantitativa que emplearon en muestras de LLBA, para ello usaron el gen de la beta-tubulina (Brancart *et al.*, 2005).

Se ha descrito que la sensibilidad de esta técnica abarca cantidades de DNA que van desde 10^2 a 10^6 copias (dependiendo del autor); 10^4 es la concentración más comunmente

detectada. La técnica se realiza en 3 horas (incluyendo la extracción, amplificación y obtención de resultados), además de que permite cuantificar el microorganismo y en consecuencia diferenciar entre colonización y enfermedad clínica (Flori *et al.*, 2004).

Flori *et al.* (2004) encontraron útil el uso del gen de la proteína MSG como blanco para la PCR tiempo real describiendo una sensibilidad de 100% y especificidad de 84.9%. Esta técnica requiere alrededor de 3 horas y es capaz de diferenciar una colonización de una infección, ya que la presencia de *Pneumocystis* mayor a 10^3 copias es un indicador en el paciente portador crónico, lo cual necesita un seguimiento que descarte la etapa inicial de una PCP (Flori, 2004). De acuerdo a Huang *et al.* (1999), la proteína MSG es útil, debido a que se requiere una cantidad mínima (16fg) para detectar a *P. jirovecii* en muestras provenientes de tracto respiratorio; estos autores reportaron una sensibilidad de 50% y una especificidad de 96%.

Otro gen blanco que ha sido utilizado con esta técnica es Cdc2 el cual mostró una sensibilidad mayor que el blanco de calcoflúor. Álvarez-Martínez *et al.* (2006) reportaron una sensibilidad y una especificidad de 94% y 96%, respectivamente cuando usaron el gen DHPS (Arcenas *et al.*, 2006; Calderón *et al.*, 2011).

1.5.8.5.5 Identificación de genotipos

La secuenciación de fragmentos de DNA que se obtienen por la técnica de PCR, es un método para detectar y caracterizar a *Pneumocystis*, por lo que se le considera una técnica de referencia en los estudios de epidemiología molecular; también se usa el análisis de polimorfismos en cadenas sencillas de DNA, detectando cambios específicos en la secuencia de los nucleótidos (Álvarez-Martínez, 2008).

Se han descrito diversos genotipos, dependiendo del gen amplificado. Así, para el gen mtLSUrRNA, se han publicado 6 tipos (Wissmann *et al.*, 2010); en mtSSUrRNA se han reportado 2 (Wissmann *et al.*, 2010). Beard *et al.* (2004) describieron más de 30 genotipos de ITS1 y más de 40 genotipos para ITS2, así como alrededor de 90 haplotipos (combinaciones entre ITS e ITS2). (Varela *et al.*, 2011; Wissmann *et al.*, 2010). Para reportar estos genotipos se han tomado como referencia las secuencias encontradas en los primeros estudios. Por ejemplo, para la mtLSUrRNA se ha utilizado como referencia la secuencia de Sinclair *et al.*

(1991). Para las regiones ITS1 e ITS2 se ha utilizado la secuencia de Tsolaki *et al.* (1996).
En el caso de mtSSUrRNA se ha utilizado la secuencia de Hunter y Wakefield (1996).

2. ANTECEDENTES

La neumonía provocada por *Pneumocystis jirovecii* cuya especie es específica para humano, es considerada como un problema de salud pública ya que ocasiona un alto índice de morbimortalidad en los pacientes inmunodeprimidos, especialmente en pacientes infectados con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo-1 (VIH-1) y/o con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Gatell *et al.*, 2009; Metta *et al.*, 2006; Wissmann *et al.*, 2010)

A pesar de la administración de la terapia antiretroviral que ha propiciado una disminución en la incidencia de PCP en pacientes con VIH/SIDA, existen otros grupos en los cuales se presenta una notable incidencia de esta infección (Beard *et al.*, 2000; Bottaro, 1999). Así, *Pneumocystis jirovecii* es causante de neumonía en niños prematuros, niños con malnutrición, pacientes con tratamiento inmunosupresor (Bahamondes *et al.*, 2006; Borelli *et al.*, 2000). Por otro lado la mortalidad descrita en niños y adultos también es elevada (Morales-Aguirre *et al.*, 2004).

2.1 Casos de neumocistosis en México y técnicas de detección de *P. jirovecii*

En México diferentes autores han reportado estudios de detección de neumocistosis en diferentes grupos de pacientes, particularmente en pacientes infectados con VIH/SIDA. A pesar de que estos estudios no presentan un número extenso de casos, sí son indicativos del problema en nuestro país. A diferencia de otros países en donde la identificación de *P. jirovecii* se lleva a cabo por procedimientos moleculares, en el **cuadro 4** se pone en evidencia que en México el reporte de la PCP se basa en procedimientos tintoriales.

Cuadro 4. Métodos que han sido utilizados en México para detectar *P. jirovecii*.

| Institución | Autor /Año | Producto biológico | Factor de oportunidad | Método de detección | % de colonización /infección |
|-------------|-----------------------|------------------------------|---|---------------------|------------------------------|
| HICMNLR | Cano, 1989 | 131 biopsias y LLBA | SIDA | No reportado | 12.9% |
| HICMNLR | Casanova, 1992 | 128 (expectoración inducida) | VIH | Giemsa | 51 % |
| HICMNLR | Hermida, 1992 | 30 (expectoración inducida) | VIH | Giemsa | Positivo |
| HECMNLR | Gómez, 1992 | 102 autopsias | SIDA | Grocott | 22 casos (21.5%) |
| INNSZ | Villasís-Keever, 2001 | 909 autopsias | VIH/SIDA | No reportado | 14% |
| INER | Cota, 2003 | 13 niños | VIH/SIDA Desnutrición | No reportado | 1 positivo |
| INER | García, 2003 | 1 182 pacientes | VIH/SIDA | No reportado | 55.2% |
| HGZMF-2 | Carrada, 2004 | Pulmón (autopsia en niño) | Infecciones Respiratorias repetidas y desnutrición. | Grocott e IF | Positivo |
| DP-INP | Ridaura, 2007 | 34 autopsias | SIDA | No reportado | 26.4% |
| FCMS | Carrillo, 2008 | Biopsia pulmonar | VIH | No reportado | Positivo |
| HIMFG | Virgen-Díaz, 2010 | 63 LLBA | Pb. Neumonía | PCR-anidada | 20% |
| INER | Cortés-Télles, 2010 | 33 (LLBA,BTB) | VIH/SIDA | No reportado | 51.6% |
| INER | Vazquez-González,2013 | 73 Expedientes | VIH. Pb PCP | No reportado | 57% |

Claves. HICMLR: Hospital de Infectología, Centro Médico Nacional la Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS). HECMNLR: Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional “La Raza”, Instituto Mexicano del Seguro Social. INNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, “Salvador Zubirán”. INER: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Secretaría de Salud. HGZMF-2: Hospital General de Zona y Medicina Familiar 2, IMSS. DP-INP: Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud. FCMS: Fundación Clínica Médica Sur. HIMFG: Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. LLBA: Líquido de lavado bronquio-alveolar. IF: Inmunofluorescencia, BTB: Biopsia transbronquial. Pb: Probable neumonía. Pb PCP: Probable neumonía por *Pneumocystis jirovecii*.

3. JUSTIFICACIÓN

La neumocistosis no presenta un cuadro clínico característico que permita diferenciarlo de otras infecciones de etiología diversa. En México la gran mayoría de casos de neumocistosis han sido detectados por procedimientos tintoriales, por lo que es necesario utilizar métodos más sensibles y específicos para establecer un diagnóstico preciso, particularmente en los pacientes con VIH/SIDA, quienes son más propensos a presentar infección por *Pneumocystis jirovecii*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

- Detectar DNA de *Pneumocystis jirovecii* en pacientes inmunosuprimidos por VIH/SIDA y no VIH/SIDA, para establecer una identificación molecular.

4.2 Objetivos particulares

- Estandarizar las condiciones de extracción de DNA a partir de LLBA y esputo de pacientes con y sin VIH/SIDA.
- Detectar la presencia de *Pneumocystis jirovecii* en estos grupos de pacientes por PCR-Secuenciación de la región ITS.
- Establecer las condiciones de PCR anidada para la identificación de *P. jirovecii* en el laboratorio de Micología Médica Molecular de la Facultad de Medicina de la UNAM.
- Integrar resultados para determinar prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en pacientes de diversos hospitales de la ciudad de México.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Metodología general

El Laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina de la UNAM solicitó muestras de líquido de lavado bronquio-alveolar (LLBA), positivas a *P. jirovecii* con tinción de Grocott (**Figura 3**), a dos centros hospitalarios del Distrito Federal. Estas muestras fueron procesadas para extraer el ADN y posteriormente realizar amplificación por PCR de la región ITS. Los productos obtenidos fueron purificados y secuenciados para corroborar la identidad de los fragmentos; los productos positivos a *P. jirovecii*, fueron analizados para determinar el genotipo correspondiente.

5.1 Muestras

Se solicitaron muestras de origen respiratorio, con énfasis en líquido de lavado bronquio-alveolar (LLBA) y esputo a dos centros hospitalarios del Distrito Federal (Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y Hospital Regional “General Ignacio Zaragoza” del ISSSTE, las cuales fueron colectadas durante el periodo de Agosto de 2010 a Noviembre de 2011. Las muestras fueron trasladadas en un recipiente de unicel con bolsas de congelante y almacenadas a -20 °C hasta su procesamiento en las instalaciones del Laboratorio de Micología Médica (Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM).

5.2 Extracción de DNA

Este proceso se realizó en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar y de acuerdo al instructivo del High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), con algunas modificaciones: las muestras de esputo con consistencia mucoide: fueron tratadas con N-acetil-cisteína al 5%, incubadas a 37°C durante 20 minutos, y centrifugadas a 2500 rpm durante 10 min; además se omitió el uso de PBS y lítica en el tratamiento de las muestras (Casanova *et al.*, 1992).

Para la extracción de DNA, a 200 µl de espécimen biológico se le agregaron 200 µl de Binding buffer y 40 µl de proteinasa K (Roche); la mezcla fue incubada a 70°C durante 1 hora; después el ADN fue precipitado con 100 µl de isopropanol; posteriormente la mezcla fue colocada en una columna de purificación, adicionando 500 µl de “Inhibitor Removal Buffer”; después de centrifugar a 10000 rpm por 1 min, la columna fue lavada dos veces

con 500 µl de “Washing buffer”. El DNA fue eluido con 200 µl de “Elution Buffer” previamente calentado a 70°C. El DNA obtenido fue almacenado a -20°C. Para cada ronda de extracción de DNA de muestras problema, se utilizó un control negativo (200 µl de grado Milli-Q (MQ) estéril en lugar de espécimen).

5.3 Amplificación de un fragmento de la región ITS por PCR anidada

La PCR anidada se llevó a cabo en una campana de flujo laminar con la finalidad de manejar las muestras bajo condiciones estériles. Con el fin de disminuir el riesgo de contaminación se utilizaron puntas con filtro.

Por cada bloque de muestras problema se procesó un control negativo y uno positivo; el control negativo contenía todos los reactivos del mix y agua ultrapura Milli-Q estéril (agua MQ) en lugar de ADN, mientras que el control positivo contenía los reactivos del mix y DNA positivo para *P. jirovecii* de un paciente (corroborado con tinción de Grocott, PCR anidada y secuenciación) + 17 µl de H₂O MQ estéril.

PCR I. Se realizó en un volumen final de 50 µl. Para el control negativo se utilizaron 20 µl de H₂O MQ estéril. Para el control positivo se utilizaron 3 µl de DNA positivo por tinción para *P. jirovecii* + 17 µl de H₂O MQ estéril. En las muestras problema se utilizaron 20 µl del DNA obtenido a partir del espécimen. La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Perkin-Elmer (GeneAmp PCR system 2400). Las condiciones de temperatura fueron: desnaturalización a 94°C, 5 min; después, 35 ciclos de 94°C por 1 min, 47°C por 1 min, 72°C por 2 min. Se aplicó una extensión final a 72°C por 5 min. El tamaño del producto de la PCR I esperado fue de 693 pb (Atzori *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1995). Las concentraciones finales de los diferentes componentes de la mezcla para cada reacción fueron:

PCR I

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|-------------------------|---------------|---------------------|
| Buffer 10X | 5.0 µL | 1X |
| MgCl ₂ 50 mM | 1.5 µL | 1.5 mM |
| dNTPs 5 mM | 1.0 µL de c/u | 1.0 mM |
| Primer 1724F 4 µM | 2.5 µl | .2 µM |

| | | |
|---------------------------------------|---|-----------------|
| Primer ITS2R 4 μ M | 2.5 μ L | .2 μ M |
| Taq (5 U/ μ L, Invitrogen nativa) | 0.25 μ L | .025 U/ μ L |
| H ₂ O (c.b.p. 50 μ L) | 14.25 μ L | |
| DNA | 20 μ L (del material extraído con el kit Roche) | |

PCR II. Se preparó en un volumen final de 50 μ l; se utilizaron 2 μ l del producto obtenido de la PCR I. El proceso de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización a 94°C por 10 min; y 35 ciclos bajo las siguientes temperaturas: 94°C por 1 min, 58°C por 1 min, 72°C por 2 min. Se aplicó una extensión a 72°C por 10 min. El tamaño esperado del producto de la PCR II fue de 550 pb. (Atzori *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1995). Las concentraciones finales fueron:

PCR II

| Reactivo | Cantidad | Concentración final |
|--|--------------------|---------------------|
| Buffer 10X | 5.0 μ L | 1X |
| MgCl ₂ 50 mM | 1.5 μ L | 1.5 mM |
| dNTPs 5 mM | 1.0 μ L de c/u | 1.0 mM |
| Primer ITS1F 4 μ M | 2.5 μ l | .2 μ M |
| Primer ITS2R1 4 μ M | 2.5 μ L | .2 μ M |
| Taq (5 U/ μ L, Invitrogen nativa) | 0.25 μ L | .025 U/ μ L |
| H ₂ O (c. b. p. 50 μ L) | 32.25 μ L | |
| DNA (producto del PCRI) | 2 μ L | |

De los productos resultantes de la PCR I y PCR II se tomaron 10 μ l a los cuales se les agregó 2 μ l de buffer de carga, y fueron depositados en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (10mg/ml). Los productos fueron simultáneamente corridos con un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler de Fermentas DNA Ladder), las muestras fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta (Marca UVP Modelo H-20E). Finalmente se hizo un registro fotográfico utilizando una Polaroid GelCam.

5.4 Purificación de fragmentos

Las muestras que presentaron fragmentos de amplificación similares en peso molecular al esperado para *P. jirovecii* fueron purificadas de acuerdo al protocolo QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Para esto se colocaron 35 µl de la reacción de PCR II en una columna a la cual se adicionaron 175 µl de Buffer PB; después se agregaron 750 µl de Buffer PE y por último se eluyó el ADN en 15 µl de H₂O MQ estéril.

Para corroborar la recuperación del fragmento esperado, se corrieron 3 µl del eluido en buffer de carga IX en un gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio (10mg/ml), simultáneamente con un marcador de peso molecular de 100 pb (GeneRuler de Fermentas DNA Ladder) y visualizados en un transiluminador de luz UV (Marca UVP Modelo H-20E).

5.5 Secuenciación

Los productos purificados fueron enviados a secuenciar al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, en donde fueron secuenciados por el procedimiento de inhibición de terminación de cadena (Sanger, 1977), utilizando el BigDye Terminator Cycling Sequencing Ready Reaction v3.1 kit (Murphy *et al.* 2005) y un secuenciador 3100 Applied Biosystems de 16 capilares.

5.6 Análisis de secuencias

Identidad del fragmento amplificado. El análisis de las secuencias se realizó con la colaboración de la M. en C. Fabiola Ramírez Corona, del Taller de Sistemática y Biogeografía de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

Los electroferogramas de las secuencias “forward” y “reverse” se analizaron con el programa ChromasPro versión Lite; posteriormente se utilizó el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para buscar similitud de secuencias con otros organismos reportados en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.gov>), EMBL (The European Molecular Biology Laboratory <http://www.embl.de/>) y con la base de datos KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes <http://www.genome.jp/kegg/>). De esta forma se determinó la identidad de cada uno de los fragmentos amplificados.

Se utilizó Clustal W (programa MEGA 5) para alinear las secuencias, posteriormente se realizó la matriz de distancia genética y para la construcción de la filogenia se usó el

modelo de Kimura de 2 parámetros con Bootstrap de 1000 repeticiones y se generó un árbol de Neighbor-Joining.

Determinación de genotipos. Utilizando el programa Mega 5, cada una de las secuencias obtenidas del procedimiento anterior fue alineada y comparada con la secuencia de las regiones ITS1 e ITS2 reportadas por Lee *et al.* (1998) cuyas secuencias tipo presentan 161 pb y 192 pb respectivamente (Ver **Anexo 1**).

Lee *et al.* (1998) reportaron 15 tipos de ITS1 y 14 tipos de ITS2, así como sus respectivas claves de acceso en GenBank, de esta manera se compararon las secuencias clínicas con las secuencias publicadas para ITS1, por lo que se analizaron las posiciones 6, 12, 15, 21, 23, 24, 28, 34, 42, 53, 54, 80, 81 y 115-118. Para ITS2 se analizaron las posiciones 48, 49, 52-57, 62-70, 72, 76, 122, 160, 166-171, 173 y 178-184.

6. RESULTADOS

En el **Cuadro 5** se muestran los datos generales de los pacientes de quienes se obtuvieron las muestras procesadas en el presente estudio.

Del INER se recibieron 48 muestras que provenían de 30 pacientes, los cuales eran 23 hombres y 7 mujeres. Su edad osciló de 5 a 76 años, con un promedio de 35.7. La mayoría de las muestras correspondieron a líquido de lavado bronquio-alveolar (LLBA) (30) y de tejido obtenido por biopsia (18). En 27 (90%) de estos pacientes, el factor de oportunidad fue el VIH o VIH/SIDA.

Del Hospital Regional General “Ignacio Zaragoza” ISSSTE se recibieron 30 muestras, que correspondieron a 16 hombres y 8 mujeres (de algunos pacientes se recibió más de una muestra). La edad de estos pacientes osciló entre 1 y 86 años, con un promedio de 50.6. La mayoría de las muestras (83.3%) correspondieron a esputo. En estos pacientes los factores de oportunidad fueron diversos, predominando la tuberculosis (7 pacientes, 29.16%) probable o confirmada.

Cuadro 5. Datos generales de los pacientes de dos centros hospitalarios cuyas muestras fueron incluidos en este estudio.

| No. de paciente | Hospital | Paciente | Género | Edad | Tipo de muestra | Factor de oportunidad |
|-----------------|----------|----------|--------|------|-----------------|-----------------------|
| 1 | INER | SMU | M | - | LLBA | VIH/SIDA |
| 2 | INER | GGM | F | 28 | LLBA | VIH |
| 3 | INER | RSAJ | M | 25 | LLBA | VIH |
| 4 | INER | RSAJ | M | 25 | LLBA | VIH, TBP |
| 5 | INER | FIVJ | M | 43 | LLBA | VIH/SIDA |
| 6 | INER | FIVJ | M | 43 | Bx Pulmón | VIH/SIDA |
| 7 | INER | RRME | F | 59 | LLBA | VIH |
| 8 | INER | PGCA | M | 32 | LLBA | VIH |
| 9 | INER | PGCA | M | 32 | Bx LSI | VIH |
| 10 | INER | HHA | M | 25 | LLBA | VIH/SIDA TBP |
| 11 | INER | GGM | F | 28 | Bx TBD | VIH |
| 12 | INER | HSM | M | 26 | LLBA TBI | VIH/MAC |
| 13 | INER | MME | M | 33 | LLBA LM | VIH |
| 14 | INER | HSM | M | 26 | LLBA TBI | VIH/MAC |
| 15 | INER | MME | M | 33 | Bx LM | VIH |

| | | | | | | |
|----|--------|------|---|----|-----------------|--------------------------|
| 16 | INER | IAJ | M | 26 | Bx TBI | VIH/PCP |
| 17 | INER | IAJ | M | 26 | LLBA TBI | VIH/PCP |
| 18 | INER | COCA | M | 28 | LLBA TBD | VIH/PCP |
| 19 | INER | RBAJ | M | 25 | Bx TBI | VIH/SIDA |
| 20 | INER | RBAJ | M | 25 | LLBA Língula | VIH/SIDA |
| 21 | INER | BOMC | F | 33 | Bx Carina | VIH/PCP |
| 22 | INER | COCA | M | 28 | Bx TBD | VIH/PCP |
| 23 | INER | BOMC | F | 33 | LLBA LBD | VIH/PCP |
| 24 | INER | ZMAB | F | 57 | LLBA LSD | VIH |
| 25 | INER | PAJM | M | 76 | LLBA LSD | VIH |
| 26 | INER | SRA | M | 53 | LLBA | NAC |
| 27 | INER | PRC | F | 5 | Bx LM | Desconocido |
| 28 | INER | RAU | M | 44 | Bx Ganglio | VIH/Sarcoma de Kaposi |
| 29 | INER | RAU | M | 44 | LLBA | VIH/Sarcoma de Kaposi |
| 30 | INER | RTJC | M | 31 | Bx Pulmonar | VIH |
| 31 | INER | MED | M | 28 | LLBA | Pb VIH/PCP |
| 32 | INER | MED | M | 28 | Bx TBD | Pb VIH/PCP |
| 33 | INER | MAAA | M | 44 | LLBA | VIH/Neumonía |
| 34 | INER | CGA | F | 31 | LLBA | VIH/PCP |
| 35 | INER | CGA | F | 31 | Bx TBI | VIH/PCP |
| 36 | INER | PCP | M | 20 | LLBA | Pb VIH |
| 37 | INER | PCP | M | 20 | Bx TBI | Pb VIH |
| 38 | INER | BRJE | M | 32 | Bx Carina | TB ganglionar VIH |
| 39 | INER | BRJE | M | 32 | LLBA | TB ganglionar VIH |
| 40 | INER | NEJR | M | 24 | LLBA Língula | VIH/PCP |
| 41 | INER | MAAA | M | 44 | LLBA TBI | NAC/VIH |
| 42 | INER | LQD | M | 37 | LLBA | VIH/PCP /Aneurisma |
| 43 | INER | MVJC | M | 31 | Bx Pulmonar | VIH /Pb TBP |
| 44 | INER | KMX | F | 25 | LLBA | PCP |
| 45 | INER | GBE | M | 74 | LLBA LM | Pb FPI |
| 46 | INER | MGR | M | 42 | LLBA | VIH/TBP |
| 47 | INER | MGR | M | 42 | Bx Ganglio | VIH/+B ganglionar |
| 48 | INER | MGR | M | 42 | Bx TBD | VIH/TBP |
| 49 | ISSSTE | CGA | M | 50 | AB | Desconocido |
| 50 | ISSSTE | ANF | F | 64 | AB | Desconocido |
| 51 | ISSSTE | MHC | M | 38 | Espuito | TBP |

| | | | | | | |
|----|----------|--------|---|----|---------|--------------------------|
| 52 | ISSSTE | MPVY | F | 52 | Espuito | Desconocido |
| 53 | ISSSTE | QRA | M | 57 | Espuito | Pb TBP |
| 54 | ISSSTE | VBC | M | 37 | Espuito | Pb TBP |
| 55 | ISSSTE | VLG | F | 45 | Espuito | TBP |
| 56 | ISSSTE | MHC | M | 38 | Espuito | TBP |
| 57 | ISSSTE | GAL | M | 21 | Espuito | Pb TBP + VIH |
| 58 | ISSSTE | VLG | F | 45 | Espuito | TBP |
| 59 | ISSSTE | VBC | M | 37 | Espuito | Pb TBP |
| 60 | ISSSTE | ATA | M | 63 | Espuito | BP Neoplasia pulmonar |
| 61 | ISSSTE | ATA | M | 63 | Espuito | Hemoptisis en el estudio |
| 62 | ISSSTE | SCFA | M | 43 | Espuito | TBP |
| 63 | ISSSTE | MHC | M | 38 | Espuito | TBP |
| 64 | ISSSTE | MHC | M | 38 | Espuito | TBP |
| 65 | ISSSTE | MALA | M | 31 | Espuito | VIH |
| 66 | ISSSTE | PSM | M | 67 | Espuito | Desconocido |
| 67 | ISSSTE | RRMC | F | 50 | Espuito | Pb TBP |
| 68 | ISSSTE | MRM | M | 80 | LP | Tumor pulmonar |
| 69 | ISSSTE | VMY | F | 23 | AB | Crisis convulsivas |
| 70 | ISSSTE | FGA | M | 57 | AB | Neumonía |
| 71 | ISSSTE | FGA | M | 57 | Espuito | Choque séptico |
| 72 | ISSSTE | CPC | F | 37 | Espuito | Choque séptico |
| 73 | ISSSTE | JPF | M | 76 | Espuito | SDR |
| 74 | ISSSTE | CTMD | F | 62 | Espuito | SDR |
| 75 | ISSSTE | ZLR | M | 86 | Espuito | ERC + Neumonía |
| 76 | ISSSTE | UAE | F | 64 | Espuito | Neumonía |
| 77 | ISSSTE | DLAU | M | 1 | Espuito | Sepsis +Neumonía |
| 78 | ISSSTE | AHJ | M | 61 | Espuito | Choque séptico |
| 79 | Lab.M.M. | HHF | F | 55 | LBF | Sano |
| 80 | Lab.M.M | AMA | F | 23 | LBF | Sano |
| 81 | Lab.M.M. | JELV | F | 26 | LBF | Sano |
| 82 | Lab.M.M | A. | F | 22 | LBF | Sano |
| 83 | Lab. M.M | H.G.S. | F | 28 | LBF | Sano |
| 84 | Lab.M.M | B.M.E | F | 48 | LBF | Sano |
| 85 | Lab.M.M | CGEC | F | ¿ | LBF | Sano |
| 86 | Lab.M.M | MGP | F | 53 | LBF | Sano |
| 87 | Lab.M.M | COLR | F | 52 | LBF | Sano |
| 88 | Lab.M.M. | MHB | F | 22 | LBF | Sano |
| 89 | Lab.M.M | MCAL | F | 23 | LBF | Sano |

Abreviaturas: M= masculino; F= femenino; LLBA= líquido de lavado bronquio-alveolar; Bx pulmón= biopsia de pulmón; Bx LSI= biopsia de lóbulo superior izquierdo; Bx TBD= biopsia tronco basal derecho; LLBA TBI= lavado de tronco basal izquierdo; LLBA LM= lavado de lóbulo medio; Bx LM= biopsia de lóbulo medio; Bx TBI= biopsia de tronco basal izquierdo; LLBA TBD= lavado de tronco basal derecho; LLBA Lígula= lavado de lígula; Bx Carina= biopsia carina ; LLBA/LBD= lavado de lóbulo basal derecho; LLBA/ LSD= lavado de lóbulo superior derecho; Bx Ganglio= biopsia de ganglio; AB= aspirado bronquial; LP= Líquido pleural; LBF= lavado bucofaríngeo. VIH= virus de la inmunodeficiencia humana; SIDA = síndrome de inmunodeficiencia adquirida; TBP= tuberculosis pulmonar; MAC= complejo *Mycobacterium*; PCP= neumonía por *Pneumocystis jirovecii*; NAC= neumonía adquirida en la comunidad; TB ganglionar= tuberculosis en ganglio; Pb FPI= probable fibrosis pulmonar idiopática; SRD= síndrome de dificultad respiratoria; ERC= Enfermedad respiratoria crónica; Lab.M.M. Laboratorio de Micología Médica, UNAM.

El grupo utilizado como control negativo, consistió de 11 personas adultas, sanas, sin antecedentes de tabaquismo ni trastornos respiratorios en el momento de la toma de muestra. Ellas forman parte del personal del Laboratorio de Micología Médica quienes proporcionaron una muestra de líquido de lavado orofaríngeo.

6.1 Productos de amplificación de la región

Como resultado de las diferentes condiciones de estandarización utilizadas, se obtuvieron los fragmentos mostrados en la **Figura 7**. En la primera ronda de PCR no se observó ningún amplificado. El fragmento esperado apareció en el producto de la segunda ronda de PCR (550 pb). Las muestras pertenecientes a estos productos correspondían a un mismo paciente (LLBA) y fueron utilizadas como control positivo para el resto de las muestras.

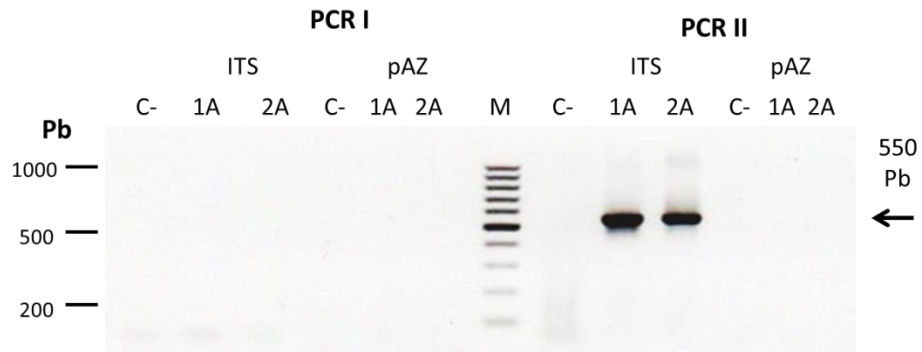


Figura 7. Productos de PCRI y PCRII (10 μ l) corridos en un gel de agarosa al 1.5 %, teñidos con bromuro de etidio. Las muestras corresponden a un solo paciente del INER, del cual se obtuvieron 2 muestras seriadas indicados como 1A y 2A. Se utilizaron los primers para las regiones ITS y el gen mtLSUrRNA (pAZ). M= marcador de 100 pb (GeneRuler de Fermentas DNA Ladder). Se observan 2 fragmentos de 550 pb en las muestras 1A y 2A con los primers para ITS (PCRII). Uno de los fragmentos fue purificado y enviado a secuenciar para corroborar su identidad con *P. jirovecii*; posteriormente fue utilizado como control positivo de PCR.

En las **Figuras 8 a 24** se muestran los gels que contienen el amplificado de las muestras restantes procesadas durante el presente estudio.

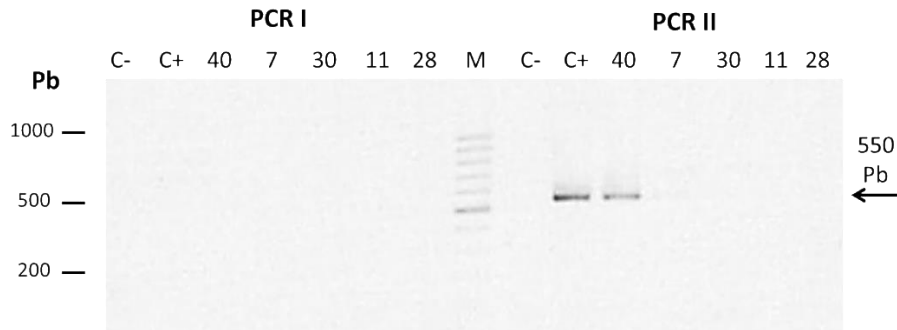


Figura 8. Productos de PCR anidada realizada con primers para la región ITS, corridos en un gel de agarosa al 1.5% y teñidos con bromuro de etidio. M= marcador de 100 pb (GeneRuler de Fermentas DNA Ladder); C- = control negativo; C+ = control positivo; 40, 7, 30, 11 y 28 = muestras provenientes de pacientes del INER. Se observa amplificación en las muestras 40 y 7 (muy tenue) que coincide con el peso molecular esperado (550pb).

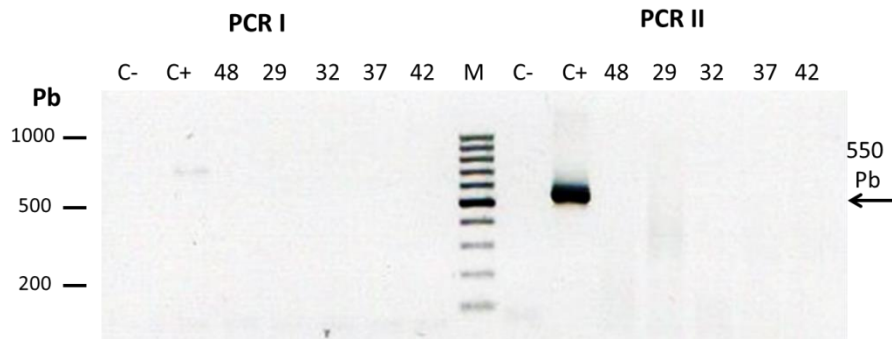


Figura 9. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. M= marcador de 100 pb (GeneRuler de Fermentas DNA Ladder); C- = control negativo; C+ = control positivo; 48, 29, 32,37 y 42= muestras provenientes de pacientes del INER. En la PCR II ninguna de las muestras problema mostró amplificación.

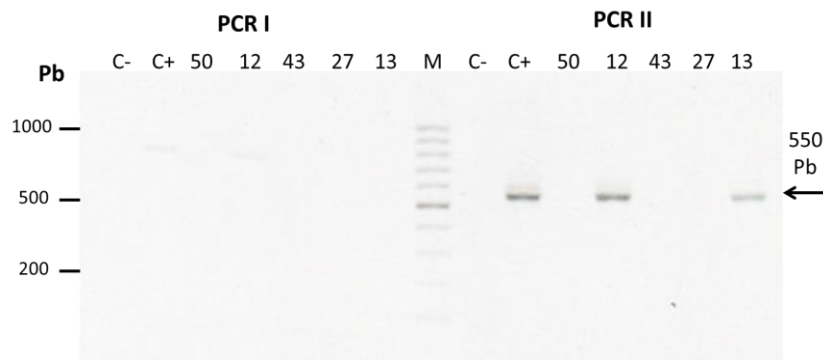


Figura 10. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. M = marcador de 100 pb (GeneRuler de Fermentas DNA Ladder); C- = control negativo; C+ = control positivo; 50, 12, 43, 27 y 13 = muestras provenientes de pacientes del INER. Amplificaron las muestras 12 y 13 en la segunda ronda de PCR.

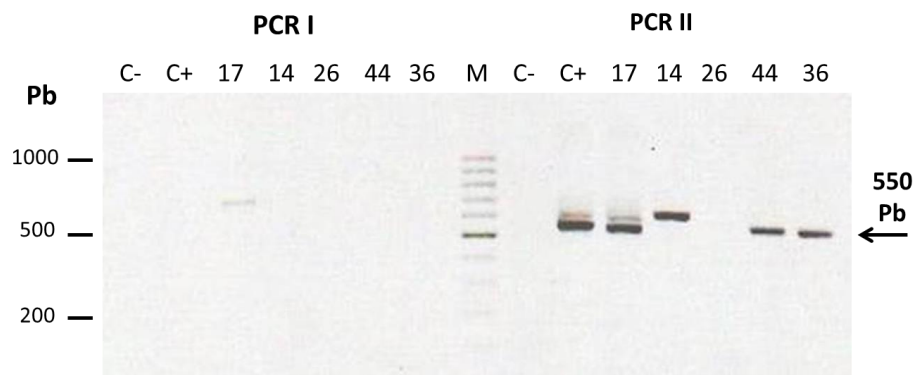


Figura 11. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden a pacientes del INER. M = marcador de 100 pb (GeneRuler de Fermentas DNA Ladder). En la PCR II amplificaron las muestras 17, 44 y 36. La muestra 14 que muestra un fragmento de mayor peso molecular que el esperado no correspondió a *P. jirovecii*.

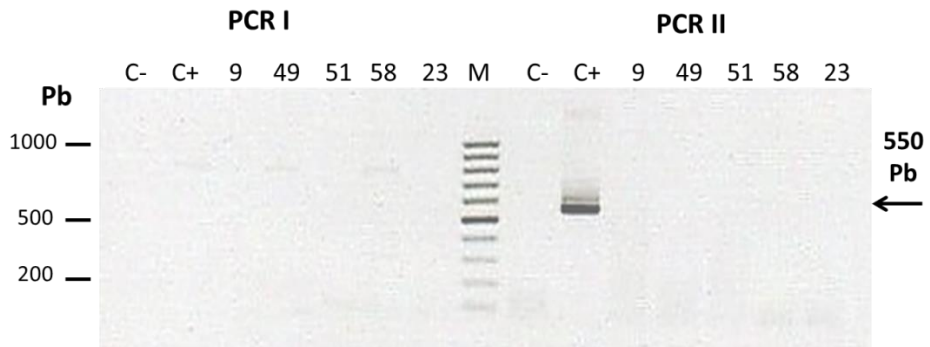


Figura 12. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden a pacientes del INER. M= marcador de 100 pb (GeneRuler de Fermentas DNA Ladder). Ninguna muestra amplificó en la PCR II.

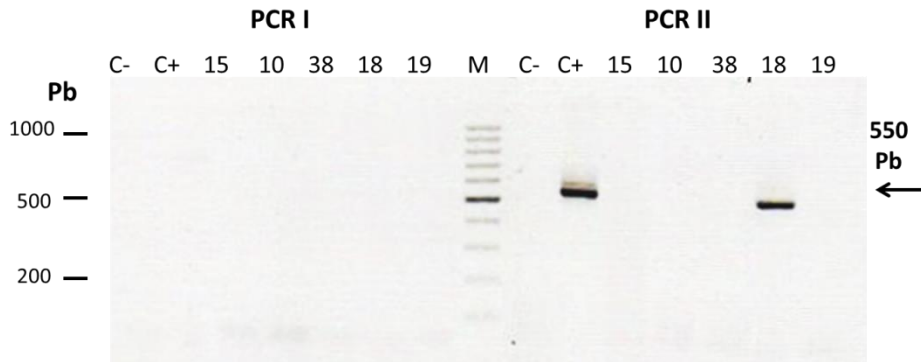


Figura 13. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden a pacientes del INER. M= marcador de 100 pb (GeneRuler de Fermentas DNA Ladder). Amplificó la muestra 18 en la PCR II.

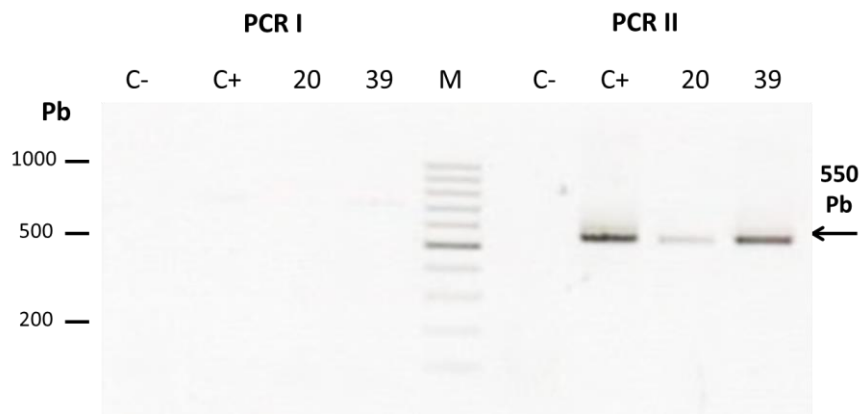


Figura 14. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. En la PCR II amplificaron las muestras 20 y 39.

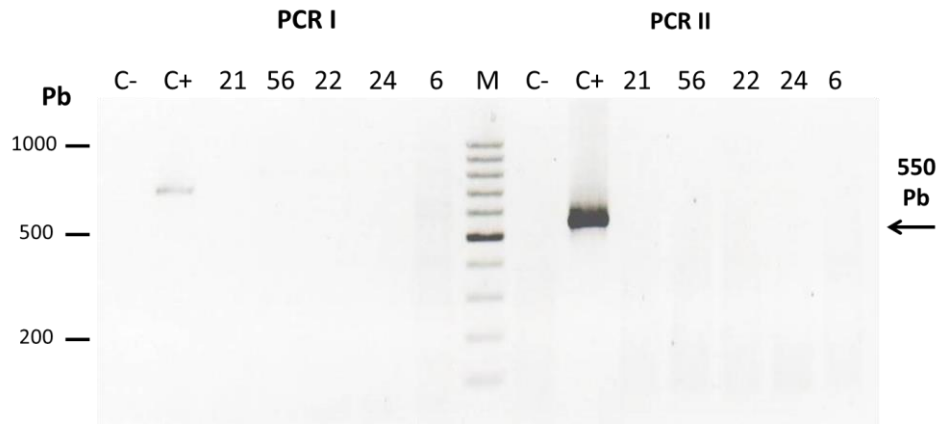


Figura 15. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. En la PCR I se observó amplificación en el control positivo C+ (muy tenue) con un peso molecular de aproximadamente 700 pb. En la PCR II ninguna muestra mostró amplificación.

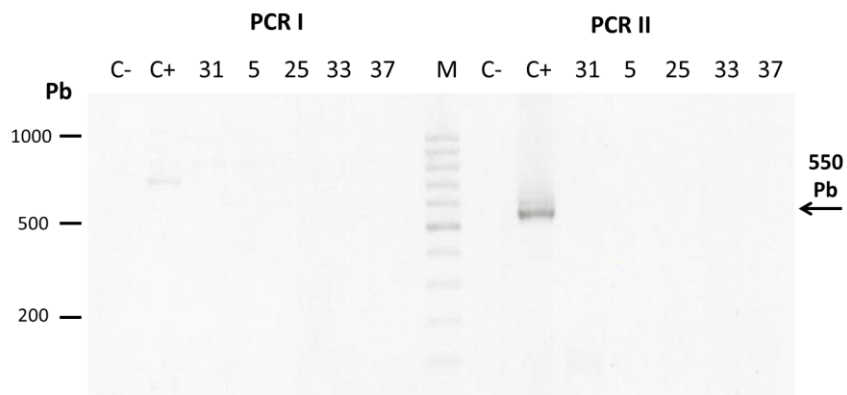


Figura 16. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. En la PCR I se observó amplificación en el control positivo C+ (muy tenue) con un peso molecular de aproximadamente 700pb en la PCR I. En la PCR II ninguna de las muestras problema depositadas mostraron amplificación.

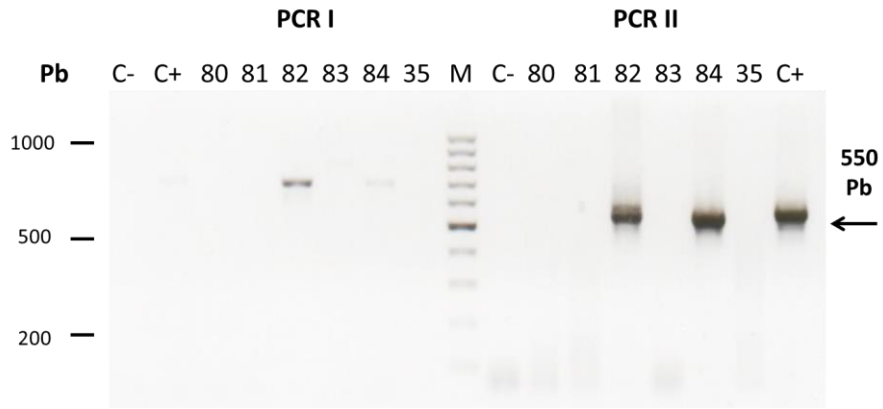


Figura 17. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. En la PCR I se observó amplificación en las muestras 82 y 84 con un peso molecular de aproximadamente 700pb. En la PCR II, las muestras 82 y 84 mostraron fragmento de amplificación.

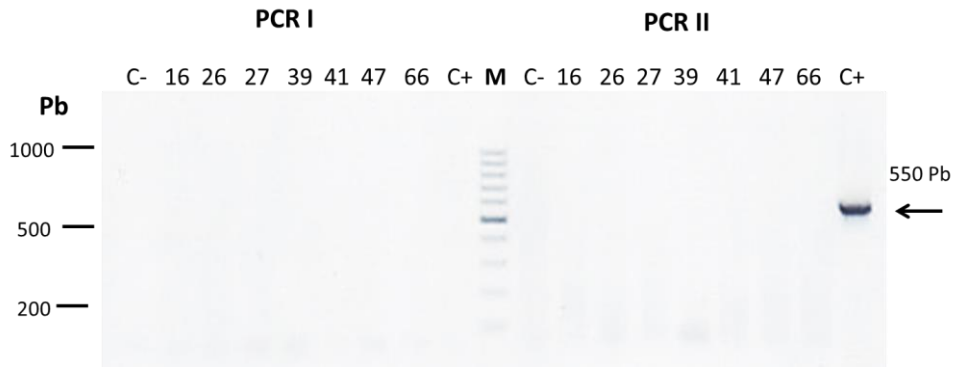


Figura 18. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden a pacientes del Hospital General Ignacio Zaragoza del ISSSTE. Ninguna muestra problema mostró amplificación.

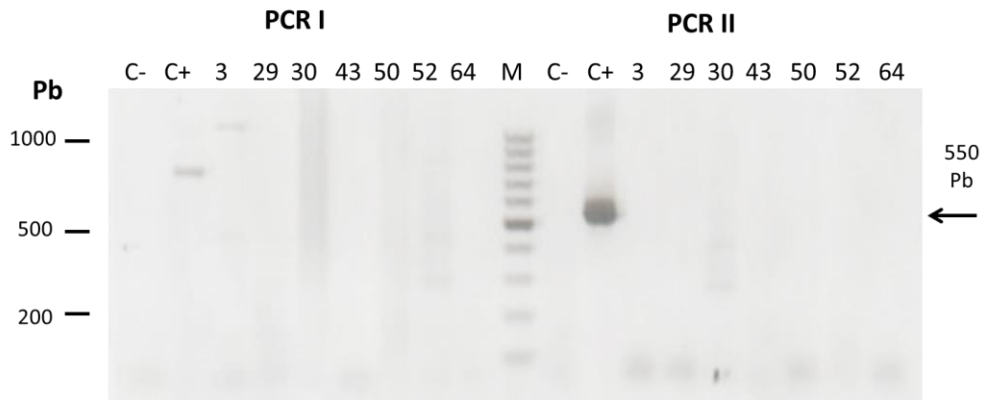


Figura 19. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden a pacientes del Hospital General Ignacio Zaragoza del ISSSTE. En la PCR II ninguna muestra mostró el fragmento esperado; solo la muestra 30 presenta tenues fragmentos inespecíficos.

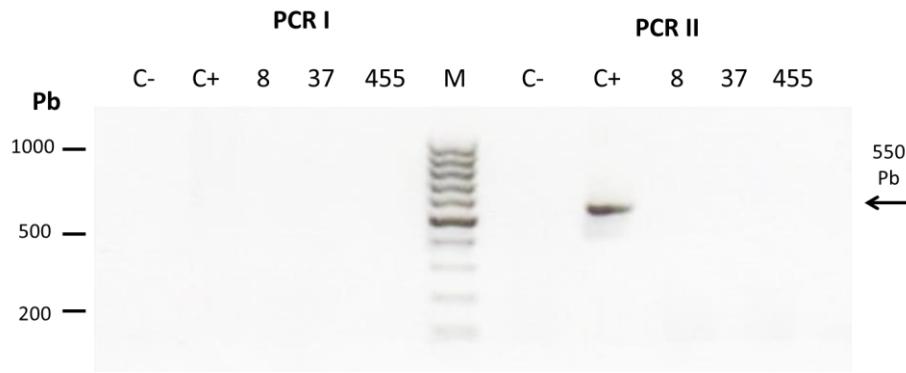


Figura 20. Productos de PCR anidada corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden a pacientes del Hospital general Ignacio Zaragoza del ISSSTE. Ninguna muestra problema amplificó.

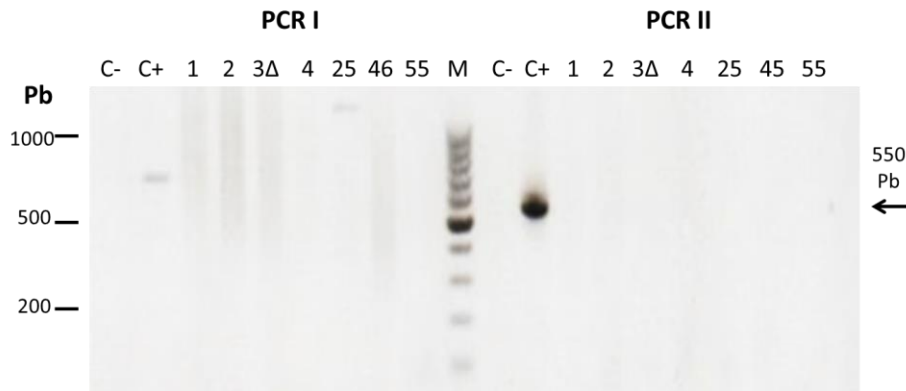


Figura 21. Productos de PCR corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden a pacientes del Hospital General Ignacio Zaragoza del ISSSTE. En la PCR II ninguna muestra problema amplificó.

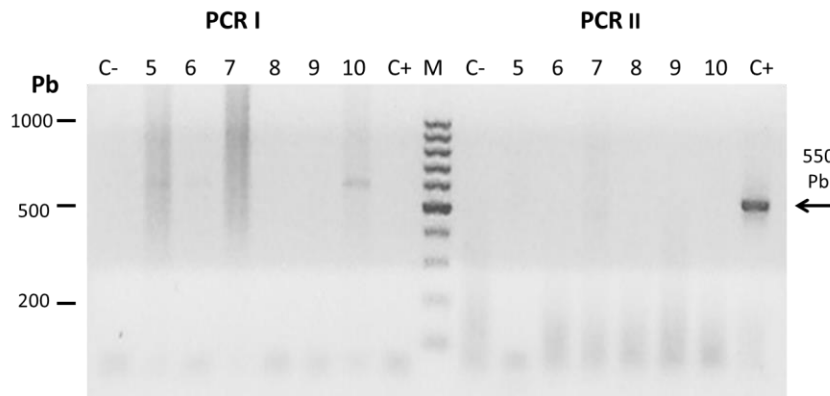


Figura 22. Productos de PCR corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden a pacientes del Hospital General Ignacio Zaragoza del ISSSTE. En la PCR II ninguna muestra problema amplificó.

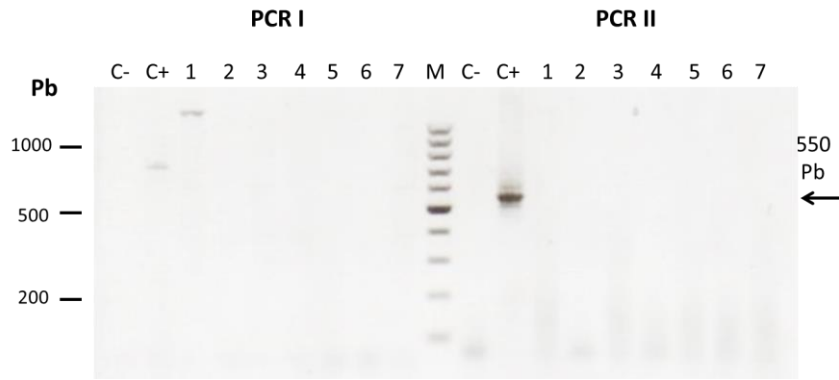


Figura 23. Productos de PCR corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden al personal del laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina (UNAM). En la PCR II ninguna muestra problema amplificó.

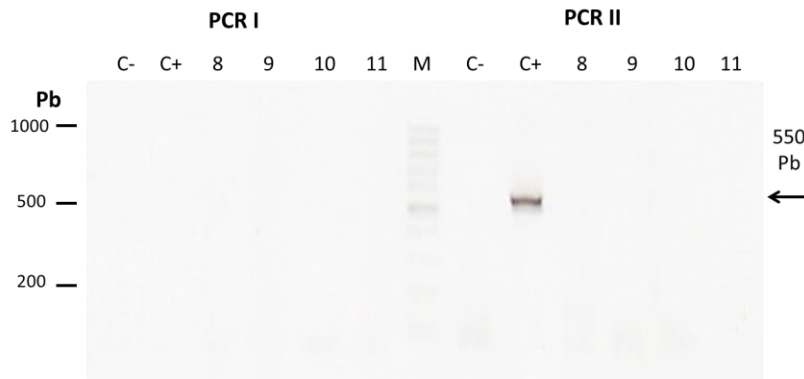


Figura 24. Productos de PCR corridos en las condiciones del gel de la Figura 2. Las muestras corresponden al personal del laboratorio de Micología Médica de la Facultad de Medicina (UNAM). Ninguna muestra problema amplificó.

En el **Cuadro 6** se muestran los datos de los 12 pacientes (14 muestras) que fueron positivos a la búsqueda de DNA de *P. jirovecii*. Todas las muestras provenían de pacientes del INER; la mayoría eran hombres (10 hombres y 2 mujeres), todos infectados con VIH y dos catalogados con SIDA. Siete pacientes habían sido diagnosticados previamente con PCP por tinción de Grocott, todos ellos confirmados por el presente estudio molecular. En resumen, independientemente del factor de oportunidad de las 89 muestras procesadas, se encontraron 14 positivas a *P. jirovecii* que corresponden al 15.73%. De las muestras de pacientes con VIH/SIDA (46 casos) se obtuvo un porcentaje de positividad a *P. jirovecii* de 30.4%. Estos porcentajes incluyen la muestra que presentó 84% de identidad.

Cuadro 6. Datos generales de los pacientes que mostraron fragmento de amplificación de 550 pb correspondientes a la región ITS de *P. jirovecii*.

| No. de paciente | Hospital | Paciente | Género | Edad | Tipo de muestra | Factor de oportunidad | Resultado |
|-----------------|----------|----------|--------|------|-----------------|-----------------------|-----------|
| 1 | INER | SMU | M | - | LLBA | VIH/SIDA | Positivo |
| 7 | INER | RRME | F | 59 | LLBA | VIH | Positivo |
| 8 | INER | PGCA | M | 32 | LLBA | VIH | Positivo |
| 13 | INER | MME | M | 33 | LLBA, LM | VIH | Positivo |
| 16 | INER | IAJ | M | 26 | Bx, TBI | VIH/PCP | Positivo |
| 17 | INER | IAJ | M | 26 | LLBA, TBI | VIH/PCP | Positivo |
| 18 | INER | COCA | M | 28 | LLBA, TBD | VIH/PCP | Positivo |
| 19 | INER | RBAJ | M | 25 | Bx, TBI | VIH/SIDA | Positivo |
| 22 | INER | COCA | M | 28 | Bx, TBD | VIH/PCP | Positivo |
| 23 | INER | BOMC | F | 33 | LLBA, LBD | VIH/PCP | Positivo |
| 29 | INER | RAU | M | 44 | LLBA | VIH/Sarcoma de Kaposi | Positivo |
| 33 | INER | MAAA | M | 44 | LLBA | VIH/Neumonía | Positivo |
| 40 | INER | NEJR | M | 24 | LLBA, llingula | VIH/PCP | Positivo |
| 42 | INER | LQD | M | 37 | LLBA | VIH/PCP /Aneurisma | Positivo |

Abreviaturas: INER, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias; M, masculino; F, femenino; LLBA, líquido de lavado bronquio-alveolar; LM, lóbulo medio; Bx, biopsia; TBI, tronco basal izquierdo; TBD, tronco basal derecho; LBD, lóbulo basal derecho; VIH, Virus de Inmunodeficiencia Humana; SIDA, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida; PCP, neumonía por *P. jirovecii*.

6.2 Purificación y análisis de similitud de secuencias de los fragmentos amplificados

Todos los fragmentos amplificados fueron comparados con las secuencias disponibles en el GenBank con el algoritmo BLAST. Todas ellas mostraron algún porcentaje de similitud con *P. jirovecii*.

En la **Figura 25** se muestra el fragmento amplificado y purificado de la muestra 1 (paciente del INER), el cual fue enviado a secuenciar. A pesar de que el análisis de la secuencia arrojó 92% de similitud con *P. jirovecii*, la imagen observadas con la tinción de Grocott fue altamente compatible con el microorganismo buscado (Figura 4). Esta muestra fue considerada como control positivo de amplificación de DNA de *P. jirovecii* para los PCR's subsecuentes.

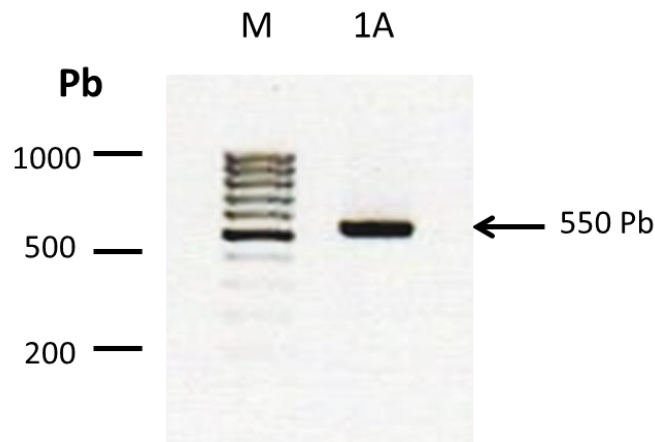


Figura 25. Fragmento purificado con el QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen, corrido en un gel de agarosa al 1.5 % y teñido con bromuro de etidio. La muestra corresponde a un paciente del INER que resultó positivo a *P. jirovecii* por tinción de Grocott, la cual fue utilizada como control positivo de PCR. M= marcador de 100 pb (GeneRuler 100bp DNA Ladder, marca Fermentas).

Durante el proceso de amplificación se detectó un fragmento de aproximadamente 620 pb (paciente 19, clave de electroforesis 14) el cual fue igualmente enviado a secuenciar (**Figura 26**). La secuencia enviada mostró un fragmento de 595 nucleótidos y su análisis en Blast, EMBL y KEGG indicaron que este fragmento corresponde a la “clona b de un hongo no cultivado” y a una “levadura basidiomiceto no cultivado”, ambos con 84% de similitud y un valor de E de $1e-156$.

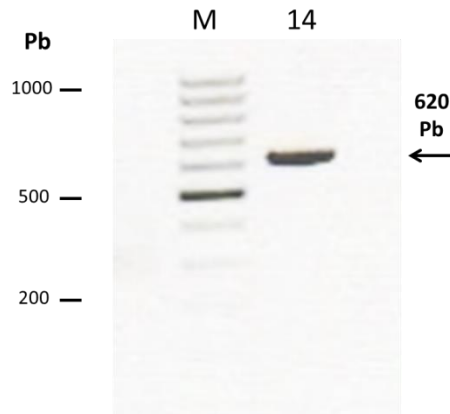


Figura 26. Fragmento purificado del espécimen 14, corrido en un gel de agarosa al 1.5 % y teñido con bromuro de etidio, que muestra un tamaño de aproximadamente 620 pb.

En la **Figura 27** se muestran los productos de PCR, de las muestras restantes, purificadas y enviadas a secuenciar.

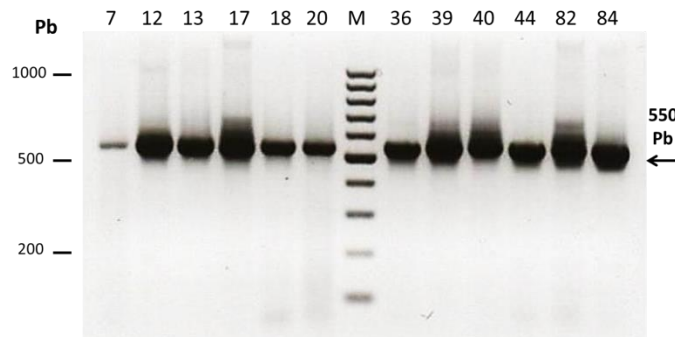


Figura 27. Fragmentos purificados de las 12 muestras que amplificaron para la región ITS de *P. jirovecii*, corridos en un gel de agarosa al 1.5 % y teñidos con bromuro de etidio, los cuales fueron secuenciados para determinar su genotipo.

En el **Cuadro 7** se muestra la identidad de los 14 productos de amplificación obtenidos de un total de 89 pacientes. Incluye el número de acceso de las secuencias que han sido reportadas por otros autores y con las que presentaron algún porcentaje de similitud (82 a 100%) con las secuencias del presente estudio. Con excepción de una (paciente 19, electroforesis 14), todas correspondieron a *P. jirovecii*.

Cuadro 7. Identidad de los aislados que por secuenciación mostraron algún porcentaje de similitud con *P. jirovecii*.

| No. de paciente | Clave de electroforesis | Especie identificada y No. de accesión | % Similitud | E-value |
|-----------------|-------------------------|--|----------------------------------|--|
| 1 | 1A,2A,C+* | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-7 JQ365713.1 | 92 | 0.0 |
| 7 | 40** | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-24 JQ365725.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-26 JQ365727.1 | 98 98 | 0.0 0.0 |
| 8 | 7** | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-3 JQ365709.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-22 JQ365723.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-28 JQ365729.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-2 JQ365708.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-32 JQ365732.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-16 JQ365719.1 | 98 98 98 98 98 98 | 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 0.0 |
| 13 | 12** | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-24 JQ365725.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-26 JQ365727.1 | 98 98 | 0.0 0.0 |
| 16 | 13* | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-18 JQ365721.1 | 90 | 0.0 |
| 17 | 39* | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-7 JQ365713.1 | 92 | 0.0 |
| 18 | 17** | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-3 JQ365709.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-32 JQ365732.1 | 100 100 | 0.0 0.0 |
| 19 | 14*** | Clona 9b de un hongo no cultivado. EU852363.1 Levadura basidiomiceto no cultivado. AJ581038.1 | 84 84 | 1e-156 1e-156 |
| 22 | 44** | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-3 JQ365709.1 <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-32 JQ365732.1 | 100 100 | 0.0 0.0 |

| | | | | |
|----|--------|---|----|--------|
| 23 | 36* ** | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-24 JQ365725.1 | 82 | 5e-121 |
| | | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-26 JQ365727.1 | 82 | 5e-121 |
| 29 | 20 | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-49 JQ365748.1 | 99 | 0.0 |
| 33 | 18** | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-3 JQ365709.1 | 99 | 0.0 |
| | | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-18 JQ365721.1 | 99 | 0.0 |
| | | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-7 JQ365713.1 | 99 | 0.0 |
| | | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-32 JQ365732.1 | 99 | 0.0 |
| 40 | 82* ** | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-2 JQ365708.1 | 97 | 0.0 |
| | | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-16 JQ365719.1 | 97 | 0.0 |
| 42 | 84 | <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pj-21 JQ365722.1 | 99 | 0.0 |

* Se observó traslapamiento de nucleótidos en los electroferogramas.

** Presentó el mismo % de similitud y cobertura con dos secuencias

*** El peso molecular no correspondió al esperado en la segunda ronda de PCR.

6.3 Reconstrucción filogenética

Los electroferogramas fueron revisados con el programa ChromasLite para verificar que los registros correspondían a las bases A, G, C, T. Posteriormente las secuencias fueron comparadas (BLAST) con tres bases de datos de genes mundiales (NCBI, KEGG, EMBL) para corroborar que los fragmentos obtenidos correspondían a las regiones ITS de *Pneumocystis jirovecii*. Se utilizó el programa Mega 5 para obtener un alineamiento múltiple con Clustal W. Se generó una matriz de distancias genéticas y finalmente se construyó un árbol filogenético de Neighbor Joining con el método de Kimura de 2 parámetros con Bootstrap de 1000 repeticiones, el cual proporcionó los valores de soporte en las ramas (Tamura *et al.*, 2004).

En la **Figura 28** se representa una matriz de distancias genéticas; en donde se indica: en color amarillo el control positivo (muestra número 1). En color rojo se resaltan los números (0.350-0.406) los cuales evidencian que la muestra 14 es diferente a las demás muestras problema, hecho que también se vio reflejado en el peso molecular obtenido en los

geles de agarosa mostrados en la **Figura 26**. En color azul se muestra el valor 0.126 que fue resultado de la comparación de las muestras 13 (Bx TBI) y 39 (LLBA TBI) las cuales provienen del mismo paciente; a pesar de ser una muestra tomada de la misma zona del pulmón, con este valor se puede deducir que se tienen dos cepas de *Pneumocystis jirovecii* diferentes.

Por otro lado la comparación del valor 0.000 de las muestras 17 (LLBA TBD) y 44 (Bx TBD) que de igual forma provienen del mismo paciente, denota que las cepas de las dos muestras son iguales.

| 1 (C+) | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| 8 (7) | 0.132 | | | | | | | | | | | | | |
| 13(12) | 0.074 | 0.076 | | | | | | | | | | | | |
| 16(13) | 0.158 | 0.144 | 0.088 | | | | | | | | | | | |
| 19(14) | 0.376 | 0.352 | 0.350 | 0.406 | | | | | | | | | | |
| 18(17) | 0.074 | 0.076 | 0.000 | 0.088 | 0.350 | | | | | | | | | |
| 33(18) | 0.074 | 0.076 | 0.000 | 0.088 | 0.350 | 0.000 | | | | | | | | |
| 29(20) | 0.080 | 0.082 | 0.006 | 0.094 | 0.350 | 0.006 | 0.006 | | | | | | | |
| 23(36) | 0.132 | 0.136 | 0.074 | 0.132 | 0.364 | 0.074 | 0.074 | 0.074 | | | | | | |
| 17(39) | 0.074 | 0.106 | 0.038 | 0.126 | 0.364 | 0.038 | 0.038 | 0.044 | 0.106 | | | | | |
| 7(40) | 0.074 | 0.076 | 0.000 | 0.088 | 0.350 | 0.000 | 0.000 | 0.006 | 0.074 | 0.038 | | | | |
| 22(44) | 0.074 | 0.076 | 0.000 | 0.088 | 0.350 | 0.000 | 0.000 | 0.006 | 0.074 | 0.038 | 0.000 | | | |
| 40(82) | 0.102 | 0.084 | 0.028 | 0.082 | 0.358 | 0.028 | 0.028 | 0.026 | 0.082 | 0.066 | 0.028 | 0.028 | | |
| 42(84) | 0.080 | 0.082 | 0.006 | 0.090 | 0.352 | 0.006 | 0.006 | 0.012 | 0.080 | 0.044 | 0.006 | 0.006 | 0.030 | |

Figura 28. Matriz de distancia genéticas. Las muestras están representadas con un número inicial que corresponde al número de paciente, y el número entre paréntesis hace referencia a la clave de electroforesis que recibió la muestra, tal como aparece en las dos primeras columnas del **Cuadro 7**

El árbol filogenético de la **figura 29**, muestra en color rojo al espécimen 19(14) agrupado en una rama aparte, esto apoya el peso superior a 550 pb que el resto de las muestras y conforme a lo reportado en la matriz de distancias genéticas. Respecto a las muestras 22(44) y 18(17) representadas en color verde, corresponden al mismo paciente, la matriz de distancia genética arrojó un valor de 0.000 y en el árbol filogenético se agruparon en la misma rama junto con otras 4 muestras de diversos pacientes.

Las muestras 17(39) y 16(13) resaltadas en color azul también pertenecen al mismo paciente; la matriz de distancia genética arrojó un valor de 0.126; al observar ambas muestras representados en el árbol filogenético, se aprecia que están en diferentes ramas, lo cual indicaría que hay diferencias entre las cepas.

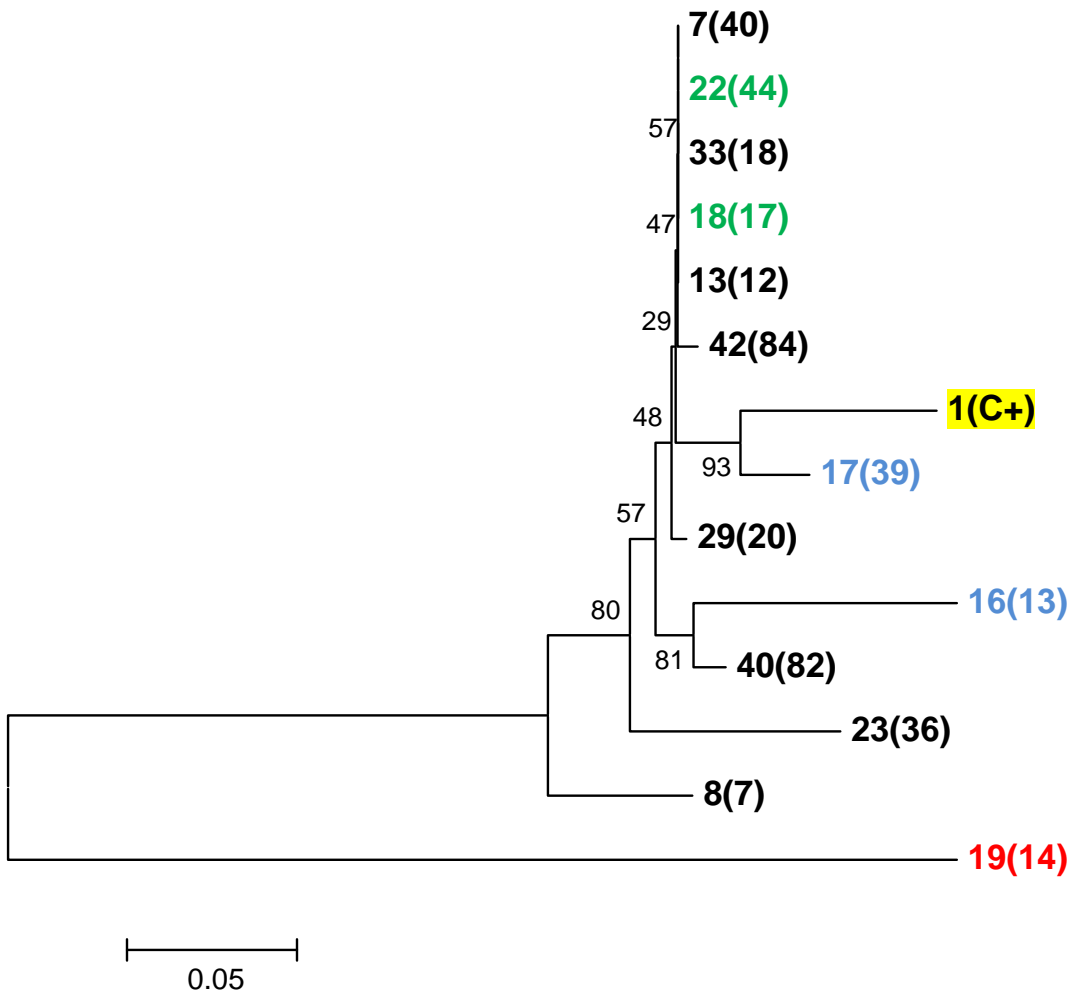


Figura 29. Árbol filogenético construido con Neighbor Joining, con el modelo Kimura de 2 parámetros y Bootstrap de 1000 repeticiones. Las muestras están representadas como: 7(40), en donde el número 7 corresponde al no. de paciente y (40) hace referencia a la clave de electroforesis que recibió la muestra; tal como aparecen en las dos primeras columnas del **cuadro 7**.

6.4 Determinación de genotipos

Para determinar a cuál de los 15 genotipos (A hasta O) hasta hoy descritos para la región ITS1, se tomaron como referencia las secuencias base mostradas en la primera línea de la **Figura 30**, reportadas por Lee *et al.* (1998). Esta línea está marcada como “Prototipo”

```

                10         20         30         40         50         60         70         80
Prototipo_ITS1_(LEE.1998)161pb GAAAATTCAG CTTTAAACAC TTTTCCTAG TGTTTAGCA TTTTCAAC ATATCTGGA ATTTTTTTT TGTGGCGA
13*(12)** .....
18*(17)** .....
33*(18)** .....
29*(20)** .....
7*(40)** .....
22*(44)** .....
42*(84)** .....C.....

                90         100        110        120        130        140        150        160
Prototipo_ITS1_(LEE.1998)161pb GGAGCTGGCT TTTTGCTTG CCTCGCCAA GGTGTTTATT TTTAAAATT TAAATTGAAT TTCAGTTTGA GAATTTTGA
13*(12)** .....
18*(17)** .....
33*(18)** .....
29*(20)** .....
7*(40)** .....
22*(44)** .....
42*(84)** .....

Prototipo_ITS1_(LEE.1998)161pb A
13*(12)** .
18*(17)** .
33*(18)** .
29*(20)** .
7*(40)** .
22*(44)** .
42*(84)** .

```

Figura 30. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región ITS1. En la primera línea se muestra el prototipo que fue tomado de Lee *et al* (1998). Las secuencias siguientes son las muestras analizadas por ejemplo: “13(12)” en el cual el primer número 13 representa el número de paciente y el 12 muestra la clave de electroforesis del espécimen. Las bases que son idénticas a la secuencia prototipo se muestran como “.”; las bases faltantes se indican con “-” y las bases que son diferentes a la secuencia prototipo se marcan con letras, las cuales representan las mutaciones encontradas y que reciben el nombre de sitios segregantes.

Para la determinación de los 14 genotipos (a hasta n) conocidos para la región ITS2, se obtuvieron las secuencias mostradas en la **Figura 31**, tomando como secuencia base la reportada por Lee *et al.* (1998).

```

                10         20         30         40         50         60         70         80
Prototipo ITS2_(LEE.1998)_192pb TTAAGTTCCT TTTTCAAGC AGAAAAAGG GGATTGGGCT TTGCAAAAT ATAATAATTA GAAATAAAT ATTTATTATG
13*(12)** .....
18*(17)** .....
33*(18)** .....
29*(20)** .....
22*(40)** .....
22*(44)** .....
42*(84)** .....

                90         100        110        120        130        140        150        160
Prototipo ITS2_(LEE.1998)_192pb CATGCTAGTC TGAAATCAA AAGTAGCTT TTTCTTTGC CCTAGTGTG TAAAAATCG CTGGGAAAG AGGAAAAAG
13*(12)** .....
18*(17)** .....
33*(18)** .....
29*(20)** .....
22*(40)** .....
22*(44)** .....
42*(84)** .....

                170        180        190        192
Prototipo ITS2_(LEE.1998)_192pb CTTTATATA TAGATACAA ATACAAGAAT TT
13*(12)** .....
18*(17)** .....
33*(18)** .....
29*(20)** .....
22*(40)** .....
22*(44)** .....
42*(84)** .....

```

Figura 31. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de la región ITS2. En la primera línea se muestra el prototipo que fue tomado de Lee *et al.* (1998). Las secuencias siguientes son las muestras analizadas por ejemplo: “13(12)” en el cual el primer número 3 representa el número de paciente y el (12) muestra la clave de electroforesis del espécimen. Las bases que son idénticas a la secuencia prototipo se muestran como “.”; las bases faltantes se indican con “-” y las bases que son diferentes a la secuencia prototipo se marcan con letras, las cuales representan las mutaciones encontradas y que reciben el nombre de sitios segregantes.

Al alinear las secuencias problema con los prototipos de ITS1 e ITS2, tal como se muestran en las figuras 30 y 31, no se observan cambios en las posiciones reportadas por Lee *et al.* (1998). Sin embargo, al alinear cada una de las secuencias problema con las secuencias específicas considerando las claves de acceso en GenBank publicadas por Lee *et al.* (1998) para ITS1 e ITS2, se determinaron los genotipos reportados en este estudio.

Para ambas regiones (ITS1 e ITS2), sólo se logró la lectura óptima en 7 secuencias. Las 7 secuencias restantes mostraron un electroferograma no claro, al parecer traslapado con dos o más genotipos. De los 7 fragmentos procesados para ITS1, 1 correspondió al genotipo N, 5 al genotipo E y 1 al genotipo B (**Figura 30**).

De los 7 fragmentos procesados para ITS2, 2 correspondieron al genotipo m, 3 al genotipo g, 1 al genotipo e y 1 al genotipo i (**Figura 31**).

En el **Cuadro 8** se muestran los genotipos de ITS1 e ITS2 encontrados:

| Secuencias | Región ITS1 | Región ITS2 | No. de acceso (GenBank) ITS1 | No. de acceso (GenBank) ITS2 | Observaciones |
|------------|-------------|-------------|------------------------------|------------------------------|---|
| 13(12) | E | m | AF013810 | AF013833 | ITS1: deleción de nucleótido posición 66 |
| 18(17) | E | g | AF013810 | AF013827 | ----- |
| 33(18) | E | g | AF013810 | AF013827 | ITS1: deleción de nucleótido posición 66 |
| 29(20) | N | e | AF013819 | AF013825 | ITS1: deleción de nucleótido posición 66 ITS2: Presenta A en posición 38 |
| 7(40) | E | m | AF013810 | AF013833 | ITS1: deleción de nucleótido posición 66 |
| 22(44) | E | g | AF013810 | AF013827 | ----- |
| 42(84) | B | i | AF013807 | AF013829 | ----- |

Cuadro 8. Genotipos encontrados en 7 fragmentos amplificados para *P. jirovecii* a partir de las muestras incluidos en el presente estudio.

De las secuencias en las que se tenía duda, se rehízo el procedimiento desde la extracción de ADN hasta la secuenciación. Los resultados no fueron mejores, ya que se siguió observando el fenómeno de “traslapamiento” (**Figura 32**). Así, las secuencias C+, 7, 13, 36, 39 y 82 no se muestran en las Figuras 30 y 31, debido a que los electroferogramas presentan traslapamiento de nucleótidos y al ser alineadas con el programa Mega5 se observan muchas inserciones y deleciones en gran parte de las secuencias.

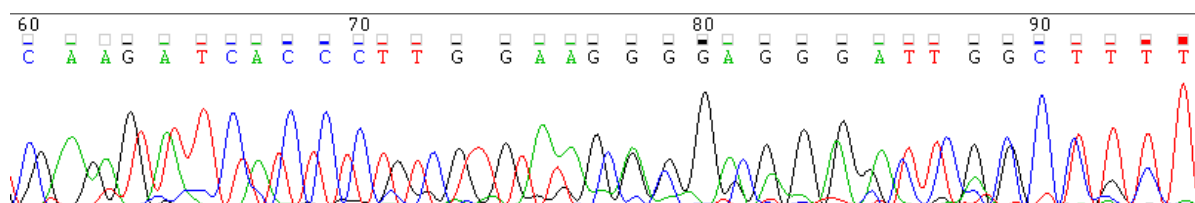


Figura 32. Electroferograma de la secuencia del espécimen 8(7). Abarca del nucleótido 60 al 94; la mayoría de picos no muestran una definición clara, como la que se observa en las posiciones 80 y 94, por lo que se infiere que en esta muestra probablemente hay traslapamiento de nucleótidos por posible co-existencia de variedades de *P. jirovecii*.

Respecto a la secuencia 14, ésta tiene una muy buena definición, pero al alinearla con las secuencias tipo reportadas por Lee *et al.* (1998), muestra diversas inserciones.

7. DISCUSIÓN

Desde hace más de 26 años, en diversos países y centros hospitalarios se han desarrollado procedimientos moleculares que permiten detectar a *P. jirovecii* en muestras biológicas de pacientes con sospecha de padecer neumocistosis (Calderón *et al.*, 2011). Los resultados han sido variables en función del tipo de espécimen, del estadio de la infección (leve a grave), del gen blanco buscado, y hasta de los reactivos y personal que realiza la técnica.

En cuanto a la efectividad de las técnicas moleculares para detectar a *P. jirovecii* Atzori *et al.* (1999) compararon el resultado de la amplificación de la región ITS con la amplificación de la región del mtLSU-rRNA, y observaron que la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 fue más sensible.

Lu *et al.* (1995) compararon la PCR dirigida a la región ITS1 e ITS2 con la PCR dirigida a otros genes como 18S rRNA, mtrRNA, TS, 5S rRNA y el DHFR; encontraron que la PCR para la región ITS es más específica que otros genes blanco, ya que las 30 muestras procesadas fueron analizadas por microscopía encontrando formas tróficas y la PCR dirigida a la región ITS fue positiva para *P. jirovecii* en las 30 muestras. En el presente estudio se encontró 15.73% de positividad en la población estudiada, incluyendo los individuos sanos. Considerando solamente el grupo de pacientes que fueron 78, la positividad fue de 17.94%. Finalmente si consideramos solamente el grupo de pacientes VIH/SIDA, la presencia de *P. jirovecii* se encontró en 30.4%. Para los pacientes VIH/SIDA, estos porcentajes de detección de *P. jirovecii* se encuentran dentro del rango de positividad encontrada por otros autores en otras partes del mundo y con el mismo gen blanco.

En otros trabajos se ha reportado una alta efectividad de otros genes blanco para identificar a *P. jirovecii* a partir de diferentes muestras; tal es el caso del gen mtLSU-rRNA (Durand-Joly *et al.*, 2005).

En el presente estudio se decidió utilizar la región ITS1 e ITS2 como gen blanco para detectar *P. jirovecii* en diversas muestras, obteniendo un fragmento de aproximadamente 550 pb. Donde el 15.73% de los pacientes incluidos en este estudio presentaron positividad. Carecemos de otros datos en la literatura con los cuales podamos hacer comparaciones con estos resultados, ya que desafortunadamente otros autores que han utilizado la región ITS

como gen blanco, no reportan el porcentaje de positividad y solamente publican el porcentaje de genotipos que observaron. (Beser *et al.*, 2011; Matos *et al.*, 2003; Robberts *et al.*, 2004).

Un estudio realizado en México por Virgen-Díaz (2010); utilizó 63 muestras de líquido de lavado bronquio-alveolar de pacientes pediátricos con diagnóstico clínico de neumonía, del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG), y comparó la sensibilidad y especificidad de 4 técnicas para detectar a *Pneumocystis jirovecii*. Esta autora consideró a la PCR anidada para las regiones ITS1 e ITS2 como el “estándar de oro”, sin especificar el porcentaje de sensibilidad y especificidad. En su estudio encontró un 20% de positividad para *P. jirovecii*. Para las otras técnicas observó una sensibilidad y especificidad respectivamente de 92% y 100% para PCR convencional, 84% y 98% para inmunofluorescencia directa y 69% y 98% para tinción con blanco de cálcofluor. En este estudio no se determinó la frecuencia de genotipos para la región ITS.

La técnica de PCR en sus diversas modalidades ha revelado una alta eficacia para amplificar DNA de *P. jirovecii* a partir de diversos tipos de muestras clínicas incluyendo LLBA, esputo inducido y líquido de enjuague bucal. Los valores de sensibilidad y especificidad para el LLBA oscilan entre 84 y 100% y 58 y 100% respectivamente (Álvarez-Martínez, 2008; Varela *et al.*, 2011). Por lo tanto, este espécimen ha sido el más confiable y utilizado.

Para el presente estudio inicialmente se solicitó LLBA; sin embargo, se incluyeron también esputo y tejidos obtenidos por biopsia. De las 14 muestras positivas a *P. jirovecii*, 11 correspondieron a LLBA y tres a tejido. En contraste con nuestro estudio, Gupta *et al.* (2008) procesó 81 muestras de LLBA y obtuvo 20 positivas; y de 50 esputos procesados, 6 fueron positivos. Dado el número irregular de muestras de cada espécimen procesado en el presente trabajo, no es posible establecer la efectividad de la amplificación para cada uno de ellos. Sin embargo, llama la atención que de todos los esputos procesados, ninguno fue positivo. En otros trabajos, esta negatividad ha sido atribuida a la presencia de inhibidores de PCR en este espécimen. (Lundgren y Wakefield, 1998).

Como se mencionó previamente, de acuerdo a la secuencia de los fragmentos amplificados de la región ITS analizados por diferentes autores, se han descrito numerosos genotipos (Wissmann *et al.*, 2010).

En este trabajo los genotipos de la región ITS encontrados fueron: Eg (3 muestras), Em (2 muestras) Ne (1 muestra) y Bi (1 muestra). Estos resultados concuerdan con el estudio publicado por Matos *et al.* (2003) quien estudió las muestras respiratorias de 43 pacientes portugueses inmunocomprometidos con PCP; reportó la presencia de 4 tipos de ITS: Eg (23.3%), Eb (11.6%), Ne (11.6%) y Bi (9.3%). Por otra parte, Beser *et al.* (2011) reportó que de 64 muestras respiratorias estudiadas, Eg fue el genotipo más común seguido por Ne, Bi, Eb, Ai, Ea, Ec y Jf. El genotipo Eg es encontrado en países de Europa, Norteamérica, Sudáfrica y Asia. En Tailandia los genotipos reportados con más frecuencia son Ir y Rp, seguidos de Bp, Er, Eq, Ic, Ip, Rc, Qb y Qq (Leelayoova *et al.*, 2005, Siripattanapipong *et al.*, 2005). Considerando que en varios trabajos se reporta a Eg como dominante, es posible que este genotipo de *P. jirovecii* sea más virulento que los otros genotipos y eso explique parcialmente su mayor frecuencia.

Uno de los hallazgos interesantes de este trabajo, fue que el espécimen 19(14) mostró un fragmento de aproximadamente 620 pb con primers que son específicos para *Pneumocystis* (Lu *et al.*, 1995). Este espécimen presentó una gran diferencia respecto a las otras muestras identificadas como *P. jirovecii*: en la matriz genética se observan valores de alrededor de 0.350 y 0.406, y en los árboles no se agrupa con las otras muestras sino que aparece como una rama independiente. Estos datos podrían sugerir que la muestra sea una cepa diferente a las otras. La secuencia del espécimen 19(14) fue alineado con la secuencia reportada de Lee *et al.* 1998, y se observaron muchas inserciones y deleciones, Al realizar el alineamiento de la secuencia de esa muestra con las bases de datos Blast, EMBL y KEGG, se observó que la única secuencia con la que presenta el más alto porcentaje de similitud (84%), es un hongo aislado de un árbol; este microorganismo no creció en medios de cultivo, lo cual podría coincidir con *P. jirovecii*. Desconocemos si este amplificado corresponde a una cepa nueva de *P. jirovecii*, ya que no fue posible alinearla con las secuencias reportadas en las bases de datos mundiales a nuestro alcance.

Las muestras 1(C+), 8(7), 16(13), 23(36), 17(39) y 40(82) mostraron traslapamiento de nucleótidos, lo cual podría indicar que existe más de un genotipo en el espécimen.

Algunos autores han utilizado la clonación como herramienta para definir si se tiene más de un genotipo (Lee *et al.*, 1998). Sin embargo, no se descarta la posibilidad de tener un amplificado de baja calidad, a pesar de haber realizado la extracción de DNA-PCR-secuenciación por duplicado.

En nuestro conocimiento, la gran mayoría de estudios en México, enfocados a la detección de *P. jirovecii* abordan procedimientos tintoriales con porcentajes de positividad variables, que oscilan del 12 al 57% (**Cuadro 4**). Hasta donde sabemos, este es el segundo trabajo enfocado a la detección de este hongo en humanos utilizando procedimientos basados en la amplificación por PCR de un fragmento de la región ITS. Los resultados positivos obtenidos en este trabajo fueron complementados con la secuenciación del fragmento amplificado, lo cual condujo a la identificación de genotipos, aspecto que no ha sido abordado por otro trabajo en México. Por lo tanto consideramos que este estudio representa un avance en el estudio epidemiológico de la neumocistosis en México a través de técnicas altamente confiables.

8. CONCLUSIONES

- De las 89 muestras procesadas se observó un porcentaje de positividad a *P. jirovecii* de 15.73%. Considerando las 46 muestras de pacientes con VIH/SIDA se obtiene 30.4% de positividad. Estos valores se encuentran dentro del rango reportado en otros países para grupos de pacientes con VIH/SIDA.
- En este trabajo se amplificó un fragmento de las regiones ITS1 e ITS2, y por primera vez determinaron los genotipos de *P. jirovecii* presentes en pacientes mexicanos con VIH/SIDA.
- Los genotipos predominantes fueron el E para la región ITS1 y el g para la región ITS2, lo cual concuerda con los genotipos predominantes descritos para países de Europa, Norteamérica, Sudáfrica y Asia.
- El análisis de secuencia mostró una posible coexistencia de variedades de especie de *Pneumocystis* ya que fue difícil determinar su genotipo debido al traslapamiento de nucleótidos.
- Con primers “*P. jirovecii* específicos”, amplificó un fragmento de mayor peso molecular al esperado. Si este amplificado corresponde al ascomiceto que se buscaba es probable que corresponda a un organismo lejano a los actualmente conocidos o que corresponda a un organismo independiente.

9. PERSPECTIVAS

- Una amplificación por PCR-tiempo real y la correlación con el historial médico del paciente, permitiría diferenciar entre una colonización o una infección de *P. jirovecii*.
- La colaboración con los centros hospitalarios ayudará a conocer con mayor precisión la epidemiología de la neumocistosis en México.
- Probablemente la purificación y clonación de los fragmentos amplificados podría mejorar el resultado de la secuenciación, para la definición de genotipos.

10 REFERENCIAS

- Aderaye G, Woldeamanuel Y, Asrat D, Lebbad M, Beser J, Worku A, Fernandez V, Lindquist L. Evaluation of Toluidine Blue O staining for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* in expectorated sputum sample and bronchoalveolar lavage from HIV-infected patients in a tertiary care referral center in Ethiopia. *Infection* 2008; 36: 237-243.
- Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, Aliouat el M, Viscogliosi E, Guillot J, Delhaes L, Dei-Cas E. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infect Genet Evol* 2008; 8: 708-726.
- Aliouat-Denis CM, Martínez A, Aliouat el M, Pottier M, Gantois N, Dei-Cas E. The *Pneumocystis* life cycle. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 419-426.
- Álvarez-Martínez Miriam. 2008. Prevalencia de *Pneumocystis jirovecii* con mutaciones asociadas a resistencia a las sulfamidas en pacientes con infección por VIH-1. Estudio de los factores de riesgo y valor pronóstico en la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PCP). Facultad de Medicina, Universitat de Barcelona, España.
- Álvarez-Martínez MJ, Miró JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Solé, Benito N, Domingo P, Muñoz C, Rivera E, Zar HJ, Wissmann G, Diehl AR, Prolla JC, de Anta MT, Gatell JM, Wilson PE, Meshnick SR, Spanish PCP Working Group. Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 153-60.
- Anaya JM, Shoenfeld Y, Correa PA, García-Carrasco M, Cervera R. Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. CIB 2005. Colombia. pp.522
- Andama AO, Cattamanchi A, Davis JL, den Boom S, Worodria W, Huang L. Modified Giemsa method for confirmation of *Pneumocystis* pneumonia in low-income countries. *BMJ Case Rep* 2009; doi 10.1136/bcr.02.2009.1580.
- Arango AM, Castañeda GE. Micosis humanas. Procedimientos Diagnósticos. Exámenes directos. 2ª Ed. Instituto Nacional de la Salud. Colombia. 2003. pp.204
- Arcenas RC, Uhl JR. Buckwalter SP, Limper AH, Crino D, Roberts GD et al. A real-time polymerase chain reactions assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54: 169-175.
- Armbruster C, Hassl A, Kriwanek S. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients. *Wien Klin Wochenschr* 1998; 17: 604 -607.

- Armbruster C, Hassl A, Kriwanek S. *Pneumocystis carinii* colonization in the absence of immunosuppression. Scand J Infect Dis 1997; 29: 591-593.
- Atzori C, Angeli E, Agostoni F, Mainini A, Micheli V, Cargnel A. Biomolecular techniques to detect *Pneumocystis carinii f.sp. hominis* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Int J Infect Dis 1998-1999 3; 2: 76-81.
- Bahamondes ML, Villar ZMJ, Orellana CC, González RJ, Montenegro UC. Características de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en adultos con SIDA con y sin terapia antiretroviral. Rev Chil Infect 2006; 23:215-219.
- Banerjee U. Progress in diagnosis of opportunistic infections in HIV/AIDS. Indian J Med Res 2005; 121: 395-406.
- Baselski VS, Robinson MK, Pifer LW, Woods DR. Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage samples by using cellufluor staining. J Clin Microbiol 1990; 28: 393-394.
- Bava AJ, Cattaneo S, Bellegarde E. Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wet mount preparations. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2002; 44: 279-282
- Bava AJ, Moreno D, Bellegarde E. Comparación de 3 técnicas para el diagnóstico de la neumocistosis pulmonar en pacientes con SIDA. Rev Argent Microbiol 2005; 37: 150-152.
- Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, Roberts JM, Hightower AW, Bens MS, Freeman AR, Lee S, Stringer JR, Duchin JS, del Rio C, Rimland D, Baughman RP, Levy DA, Dietz VJ, Simon P, Navin TR. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. Emerg Infect Dis. 2000; 3: 265-272.
- Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, Unnasch TR, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. Emerg Infect Dis 2004; 10: 1729-1735.
- Beser J, Botero-Kleiven S, Lebbad M, Hagblom P, Fernandez V. A limited number of ITS haplotypes defines the diversity of *Pneumocystis jirovecii* strains in Sweden. Infect Genet Evol 2011; 11: 948-954.
- Blanco JL, García ME. Immune response to fungal infections. Vet Immunol Immunopathol 2008; 125: 47-70.

- Borelli K, Brito A, Rivas G, Panizo MM, Roldán Y. Diagnóstico de *Pneumocystis carinii*: estudio comparativo entre la inmunofluorescencia directa y la coloración histológica de Gomori-Grocott. Rev Soc Ven Microbiol [serial online] 2000 [Cited 2013 Jan 22]; 20 (1). Available from: URL: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?pid=S1315-25562000000100010&script=sci_arttext
- Bottaro E. Neumonía por *Pneumocystis carinii* en pacientes con SIDA nuevos conceptos para un viejo problema. MED. 1999; 59: 187-194.
- Brancart F, Rodríguez-Villalobos H, Fonteyne PA, Peres-Bota D, Liesnard C. Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. J Microbiol Methods 2005; 61: 381-387.
- Burbelo PD, Ching Kh, Mattson TL, Light JS, Bishop LR, Kovacs JA. Rapid antibody quantification and generation of whole proteome antibody response profiles using LIPS (luciferase immunoprecipitation systems). Biochem Biophys Res Commun 2007; 352: 889-895.
- Calderón E, de la Horra C, Montes-Cano MA, Respaldiza N, Martín-Juan J, Varela JM. Resistencia genotípica a sulfamidas en pacientes con neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. Med Clin 2004; 122:617-619.
- Calderón SE, De Armas RY, Capó PV. *Pneumocystis jirovecii*: cien años de historia. Rev Cubana Med Trop 2011; 63: 97-116.
- Caliendo AM, Hewitt PL, Allega JM, Keen A, Ruoff KL, Ferraro MJ. Performance of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. J Clin Microbiol 1998; 36: 979-982.
- Calle J, Cardona N. Micosis más prevalentes en pacientes con VIH/SIDA, correlación con el estado inmunológico del huésped. Rev Asoc Colomb Dermatol 2009; 17: 211-220.
- Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enferm Infecc Microbiol Clin 2009; 27: 44-52.
- Cano DC, Villareal UC, Gómez CG, Estrada AJL, Orrantia GRD. Reporte de 131 casos de SIDA en el Hospital de Infectología, Centro Médico La Raza, I.M.S.S. Rev Med IMSS 1989; 27; 101-105.
- Carrada BT. Neumonitis por *Pneumocystis carinii* a propósito de un caso fatal. Rev Mex Pediatr 2004; 71: 229 -236.

- Carretero MI, Giuliano MS, Casaretto CI, Gambarotta MC, Neild DM. Evaluación del ADN espermático de llamas utilizando azul de toluidina. In Vet 2009; 11: 55-63.
- Carrillo ER, Contreras CNA, Ramírez RFJ. Neumonía por *Pneumocystis jiroveci*: Reporte de un caso y correlación clínico-radiográfica. Rev Invest Med Sur Mex 2008; 15: 35-38.
- Cartwright CP, Nelson NA, Gill VJ. Development and evaluation of a rapid and simple procedure for detection of *Pneumocystis carinii* by PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 1634-1638.
- Casanova CLJ, Barriga AG, Ruiz OI, Fuentes AJL. Frecuencia de *Pneumocystis carinii* en 128 pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida y neumonía intersticial. Diagnóstico mediante expectoración inducida. Rev Med IMSS 1992; Vol 30
- Ceccotti EL, Sforza RR, Carzoglio JL, Luberti R. El diagnóstico en clínica estomatológica. Editorial Médica Panamericana 2007. Argentina. pp. 68.
- Cermeño JR, Hernández CI, Alcalá F, Áppice M. *Pneumocystis jiroveci* en centros hospitalarios del Estado Bolívar, Venezuela. Rev Biomed 2006; 17:169-174.
- Chary-Reddy S and Graves DC. Identification of extrapulmonary *Pneumocystis carinii* in immunocompromised rats by PCR. J Clin Microbiol 1996; 34: 1660-1665.
- Córdova-Villalobos JA, Ponce de León-Rosales S, Valdespino JL. 25 años de SIDA en México, logros, desaciertos y retos. 2a ed. Instituto Nacional de Salud Pública. 2009. p.466
- Cortés-Télles A, Juárez-Hernández F, Peña-Mirabal ES. Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con VIH. Neumol Cir Torax 2011; 70: 165-171.
- Cortés-Télles Arturo. 2010. Alteraciones del equilibrio ácido-base en pacientes con VIH-SIDA y neumonía grave. Tesis de maestría con especialidad de neumología en adultos. Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F.
- Cota MJG, Gutiérrez GTJ, Lule MMS, Alejandre GA. VIH-SIDA en niños: experiencia de 10 años en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2003; 16: 145-149.
- Cuellar-Rodríguez J, Sierra-Madero JG. Infecciones en pacientes sometidos a trasplante de órgano sólido. Rev Invest Clin 2005; 57: 368-380.

- De Armas RY, Capó P, López FLX. Detección molecular de *Pneumocystis jiroveci* en tejido parafinado de fallecidos por VIH/sida. Rev Cubana Med Trop [serial online] 2008 Sept-Dec [Cited 2013 Jan 22]; 60 (3). Available from: URL: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0375-07602008000300009&script=sci_arttext
- Deresinski SC, Stevens DA. Caspofungin. Clin Infect Dis 2003; 36:1445-1457.
- Dimonte S, Berrilli F, D'Orazi C, D'Alfonso R, Placco F, Bordi E. Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. Infect Genet Evol 2013; 14: 68-72.
- Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. FEMS Immunol Med Microbiol 2005; 45: 405-410.
- Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature 1988;334:519-522.
- Fernández AN, Ballesté AR, Garre BX, Sabaño S, Mousqués YN, Gezuele E. Diagnóstico de pneumocistosis en pacientes infectados con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) a partir de lavados bronquioloalveolares. Rev Med Urug 1999; 15: 209-213.
- Flori P, Bellete B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. J Med Microbiol 2004; 53: 603-607.
- Fonseca MD, Mateus AH, Contreras BN. Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica. Editorial Universidad del Rosario. Colombia. 2010. pp.59-60.
- Forbes BA, Sahm D, Weissfeld A. Bailey & Scott Diagnóstico microbiológico. 12ª Ed. Editorial Panamericana. Argentina. 2009. pp.130.
- Frenkel JK. *Pneumocystis jirovecii* n.sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. Natl Cancer Inst Monogr 1976; 43: 13-30.
- Fulton B, Wagstaff AJ, McTavish D. Trimetrexate. A review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and therapeutic potential in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. Drugs 1995; 49: 563-576.

- Gallant JE, Masur H, Powderly WG. Profilaxis contra infecciones oportunistas. Atención Médica, Diciembre 1996. Disponible: <http://www.drscope.com/privados/revistas/atencion/dic96/profila.htm>.
- García LS, Bruckner DA. Diagnostic medical parasitology. 2ª Ed Washington, DC: American Society for Microbiology; 1993: p.588
- García SM, Pérez GLE, Franco MF, Reyes TG. Infecciones oportunistas pulmonares en pacientes con infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 1991-2001. Rev Inst Nal Enf Resp Mex 2003; 16:6-10.
- Gatell JM, Zulaica D, Del Romero J, Robledo T. Cómo promover y facilitar el diagnóstico precoz de la infección por el VIH-1. Inmunología 2009; 28: 101-104.
- Gómez CG, Villarreal UC, Robles RM, Cano DC. Hallazgos histopatológicos en 102 autopsias de pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida. Rev Med IMSS 1992; 30: 171-176.
- González A, Tobón AM. Infecciones micóticas oportunistas en pacientes con VIH/SIDA. Infection 2006; 10: 279-288.
- González-Morán MG. Técnicas de laboratorio en biología celular y molecular. AGT Editor S.A. México, D.F 2008: pp.365.
- Gupta R, Mirdha BR, Guleria R, Mohan A, Kabra SK, Kumar L, Agarwal SK, Luthra K. Use of different primer directed sequences amplification by polymerase chain reaction for identification of *Pneumocystis jirovecii* in clinical samples. Indian J Chest Dis Allied Sci 2008; 50: 321-327.
- Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill, 1996. Pp.1052-1062.
- Hermida EEC, Casanova CLJ, Peredo LVA. Evaluación del tratamiento con Pentamidina de la neumonía por *Pneumocystis carinii* en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Humana. Rev Med IMSS 1992; 30: 185-189
- Hof H, Schnülle P. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in a patient with Wegener's granulomatosis treated efficiently with caspofungin. Mycoses 2008; 51(Suppl 1):65-67.
- Hong ST, Steele PE, Cushion MT, Walzer PD, Stringer SL, Stringer JR. *Pneumocystis carinii* Karyotypes. J Clin Microbiol 1990; 28: 1785-1795.

- Huang L, Crothers K, Atzori C, Benfield T, Miller R, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 1721-1728.
- Huang SN, Fischer SH, O'Shaughnessy E, Gill VJ, Masur H, Kovacs JA. Development of a PCR assay for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia based on amplification of the multicopy major surface glycoprotein gene family. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 35: 27-32.
- Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, Evans HE, Morris-Jones S, Gant V, Novak T, Costello AM, Zumla A, Miller RF. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax* 2008; 63: 154-159.
- Hunter JA, Wakefield AE. Genetic divergence at the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene among isolates of *Pneumocystis carinii* from five mammalian host species. *J Eukaryot Microbiol* 1996; 43:24S–25S.
- Jiancheng W, Minjun H, Yi-jun A, Lan S, Zengzhu G, Jianrong S. Screening *Pneumocystis carinii* pneumonia in non –HIV-infected immunocompromised patients using polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 64: 396-401.
- Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM Y Winn WC. Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas a color, Editorial Médica Panamericana. 3ª Ed. 1997. México. pp.160.
- Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, Gill VJ, Silcott VA, Kogulan P. Development and evaluation of a quantitative, touch down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 490-494.
- Le Gal S, Damiani C, Perrot M, Rouillé A, Virmaux M, Quinio D, et al. Circulation of *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 74: 119-124.
- Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, Lu JJ, Lundgren JD, Olsson M, Lucas SB, Roux P, Cargnel A, Atzori C, Matos O, Smith JW. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. Hominis typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 734-741.
- Leelayoova S, Siripattanapipong S, Tan-Ariya P, Worapong J, Mungthin M. Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* in Thailand. *J. Med Assoc Thai* 2005; 88 (Suppl 3): S330-S338.

- Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA. Velázquez Farmacología Básica y Clínica. 17ª Ed. Editorial Médica Panamericana. España. 2005. pp.1250
- Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM, Queener SF, Smith JW, Ortiz-Rivera M, Leibowitz MJ, Lee CH. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans base on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. J Clin Microbiol 1994; 32: 2904-2912.
- Lu JJ, Bartlett MS, Smith JW, Lee CH. Typing of *Pneumocystis carinii* strains with type-specific oligonucleotide probes derived from nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. J Clin Microbiol 1995; 33: 2973-2977.
- Lundgren B, Wakefield AE. PCR for detecting *Pneumocystis carinii* in clinical or environmental samples. FEMS Immunol Med Microbiol 1998; 22: 97-101.
- Martin Del Campo Rodríguez LE, Sifuentes OJ. Infecciones Oportunistas en el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida: la historia en México a 20 años de la epidemia. Rev Invest Clin 2004; 56: 169:180.
- Matos O, Lee CH, Jin S, Li B, Costa MC, Gonçalves L, Antunes F. *Pneumocystis jirovecii* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. Infec Genet Evol 2003; 3: 281-285.
- Mensa J, Gatell J M^a, Azanza J R, Domínguez-Gil A, García JE, Jiménez de Anta MT, Prats G. Guía de terapéutica antimicrobiana. 18ª Ed. Elsevier 2008.
- Mendoza PN. Farmacología Médica. Editorial Médica Panamericana S.A. de C.V. México, D.F. 2008. pp 588.
- Metta HA, Corti M, Oliva S, Villafañe MF, Trione N, Gómez C. Neumonías cavitadas por *Pneumocystis jirovecii* (ex *carinii*): Características clínicas y diagnóstico por imágenes en tres pacientes. RAR 2006; 70: 53-58.
- Morales-Aguirre JJ, Villalobos-Acosta CP, Linares-Salas VH, Solís-Ortega AM, Gómez-Barreto D, Cashat-Cruz M. Neumonía por *Pneumocystis carinii* en niños infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Gac Med Mex 2004; 140: 59-70.
- Morris AM, Masur H. A serologic test to diagnose *pneumocystis* pneumonia: are we there yet?. Clin Infect Dis 2011; 53: 203-204.

- Mu XD, Que CL, He B, Wang GF, Li HC. Caspofungin in salvage treatment of severe *pneumocystis* pneumonia: case report and literature review. Chin Med J (Engl.) 2009; 122: 996-999.
- Muñoz C, Zuluaga A, Restrepo A, Tobón A, Cano LE, González A. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. Diagn Microbiol Infect Dis 2012; 72: 204-213.
- Murphy KM, Berg KD, Eshleman JR. Sequencing of genomic DNA by combined amplification and cycle sequencing reaction. Clin Chem 2005; 51: 35-39.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 5ª Ed. Editorial Elsevier Mosby. 2006. España. pp.163.
- Ng VL, Yajko DM, Hadley WK. Extrapulmonary pneumocystosis. Clin Microbiol Rev 1997; 10: 401-418.
- Ng VL, Yajko DM, McPhaul LW, Gartner I, Byford B, Goodman CD, Nassos PS, Sanders CA, Howes EL, Leoung G. Evaluation of an indirect fluorescent-antibody stain for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. J Clin Microbiol 1990; 28: 975-979.
- Nuevo nombre para el *Pneumocystis* del humano: *Pneumocystis jiroveci*. Rev Panam Salud Pública 2002; 12: 274.
- Opportunistic infections. BIDH with 214 cases: August 1989-December 1990 Available from: URL: http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/applications/pics/parasitic3.html
- Panizo MM, Reviakina V. *Pneumocystis carinii* y neumocistosis. Med Intern (Caracas) 2002; 18:90-106.
- Pitchenik AE, Fischl MA, Dickenson GM et al. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma among Haitians: evidence of a new acquired immunodeficiency state. Ann Intern Med 1983; 98: 277-284.
- Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods. J Clin Microbiol 2004; 42: 3333-3335.
- Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR. *Pneumocystis and Trypanosoma cruzi*: nomenclature and typifications. J Eukaryot Microbiol 2006; 53: 2-11.

- Ridaura-Sanz C, De León-Bojorge B, López-Corella E. SIDA en niños y adolescentes. Un estudio de 34 autopsias en dos décadas. *Acta Pediatr Mex* 2007; 28:270-277.
- Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Polymerase chain reaction detection of *Pneumocystis jirovecii*: evaluation of 9 assays. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 58: 385-392.
- Robberts FJ, Liebowitz LD, Chalkley LJ. Genotyping and coalescent phylogenetic analysis of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 1505-1510.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
- Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin JM. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 45: 183-184.
- Siripattanapipong S, Worapong J, Mungthin M, Leelayoova S. Genotypic study of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-positive patients in Thailand. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 2104-2110.
- Smieja M. Current indications for the use of clindamycin: A critical review. *Can J Infect Dis* 1998; 9: 22-28.
- Stratton N, Hryniewicki J, Aarnaes SL, Tan G, de la Maza LM, Peterson EM. Comparison of monoclonal antibody and calcofluor white stains for the detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 645-647.
- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 891-896.
- Stringer JR, Cushion MT. II. The genome of *Pneumocystis carinii*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1998; 22: 15-26.
- Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 11030-11035.
- Thomas CF Jr, Limper AH. *Pneumocystis* Pneumonia. *N Engl J Med* 2004; 350: 2487-2498
- Tiley SM, Marriott DJ, Harkness JL. An evaluation of four methods for the detection of *Pneumocystis carinii* in clinical specimens. *Pathology* 1994; 26: 325-328.

- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Introducción a la microbiología. 9ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2007 pp. 542-543.
- Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f.sp.hominis: high genotype similarity with contemporary isolates. J Clin Microbiol 1998; 36: 90-93.
- Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. J Infect Dis 1996; 174:141–156.
- Varela JM, Medrano FJ, Dei-Cas E, Calderón EJ. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in AIDS Patients. In: Microbes, Viruses and Parasites in AIDS Process, Vladimír Zajac (Ed.), ISBN: 978-953-307-601-0, InTech, 2011. Available from <http://www.intechopen.com/articles/show/title/pneumocystis-jirovecii-pneumonia-in-aids-patients>
- Vázquez-González Mario Alberto. 2013. Factores pronósticos en neumonía por *neumocystis jirovecii* en pacientes con VIH. Tesis de maestría con subespecialidad de neumología. Facultad de medicina, UNAM, México, D.F.
- Villasís-Keever A, Rangel-Frausto MS, Ruiz-Palacios G, Ponce de León-Rosales S. Clinical manifestations and survival trends during the first 12 years of the AIDS epidemic in Mexico. Arch Med Res 2001; 32: 62–65.
- Virgen Díaz Surid.2010. Comparación de cuatro métodos de *Pneumocystis jirovecii* en lavados bronquioalveolares de pacientes con neumonía del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Tesis de Posgrado en Patología clínica, Facultad de Medicina, UNAM, México, D.F.
- Wakefield AE, Miller RF, Guiver LA, Hopkin JM. Granulomatous *Pneumocystis carinii* pneumonia: DNA amplification studies on bronchoscopic alveolar lavage samples. J Clin Pathol 1994; 47: 664-666.
- Winn WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Procop GW, Schrenckenberger PC, Woods GL. Koneman Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas en color. 6ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Argentina. 2008. pp.143.
- Wissmann G, Morilla R, Friaiza V, Calderón E, Varela JM. El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. Enferm Infecc Microbiol Clin 2010; 28: 38–43.

11 ANEXO

ANEXO 1

Se utilizó como secuencia prototipo las regiones ITS1 e ITS2 reportadas por Lee et al (1998).

ITS1

```
      10      20      30      40      50      60      70      80
GAAAATTCAG CTTTAAACAC TTTTCCCTAG TGTTTTAGCA TTTTTC AAC ATATCTGTGA ATTTTTTTTT TGTTTGGCGA
      90     100     110     120     130     140     150     160
GGAGCTGGCT TTTTGTGCTG CCTCGCCAAA GGTGTTTATT TTTAAAATTT TAAATTGAAT TTCAGTTTTA GAATTTTTTA
```

161

A

ITS2

```
      10      20      30      40      50      60      70      80
TTAAGTTCCT TTTTCAAGC AGAAAAAAGG GGATTGGGCT TTGCAAAAAT ATAATAATTA GAAATAAAAT ATTTATTATG
      90     100     110     120     130     140     150     160
CATGCTAGTC TGAAATTCAA AAGTAGCTTT TTTTCTTTGC CCTAGTGTGC TAAAAATTTCG CTGGGAAAGA AGGAAAAAAG
      170     180     190 192
CTTTTATATA TAGATACAAA ATACAAGAAT TT
```