

**Programa de Especializaciones Médicas
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina**



Título del trabajo: Estudio de validación de una prueba de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real para el diagnóstico de neumonía por *Pneumocystis jirovecii*

Presenta

Alumna: Dra. Yamile Giovanna Serrano Pinto

Para obtener el grado de Especialista en Infectología

Tutor: Dra. María Fernanda González Lara

Recepcional escrito

Ciudad de México, 21 de Febrero de 2023



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.


**ESTUDIO DE VALIDACIÓN DE UNA PRUEBA DE REACCIÓN EN CADENA DE
LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONÍA
POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI***



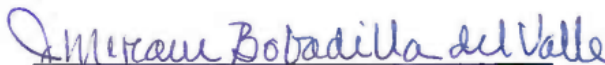
Dr. Jose Alberto Avila Funes
Jefe de Enseñanza del INCMNSZ



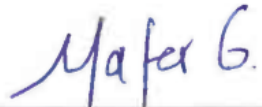
Dr. Guillermo Ruiz-Palacios y Santos
Profesor Adscrito al Servicio de Infectología del INCMNSZ
Profesor Titular del curso de Infectología



Dr. Luis Alfredo Ponce de León Garduño
Profesor Adscrito al Servicio de Infectología del INCMNSZ
Jefe del Departamento de Infectología



Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle
Profesor Adscrito al Servicio de Infectología del INCMNSZ
Tutora de tesis



Dra. María Fernanda Gonzalez Lara
Profesor Adscrito al Servicio de Infectología del INCMNSZ
Tutora de tesis

Investigadores participantes:

Dra. Judith Miriam Bobadilla del Valle. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Dr. Alfredo Ponce de León Garduño. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Qmc. Verónica Esteban Kenel. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

INDICE

1.	Marco Teórico y antecedentes.....	5
2.	Planteamiento del problema.....	10
	Justificación.....	10
3.	Metodología	
	3.1 Hipótesis.....	11
	3.2 Objetivos principal y secundarios.....	11
	3.3 Diseño del estudio.....	12
	3.4 Población en estudio.....	12
	3.5 Recopilación de la información.....	12
	3.6 Definición de variables	
	Definiciones operacionales.....	14
	3.7 Análisis estadístico.....	18
	3.8 Procedimientos de laboratorio	
	3.8.1 Lavado Bronquioalveolar.....	19
	3.8.2 Traslado y procesamiento de muestras respiratorias.....	19
	3.8.3 Muestras para RT- PCR.....	20
	3.8.4 Pneumocystis Elite MGB® Kit	20
	3.8.5 Extracción de DNA.....	21
	3.8.6 Interpretación de resultados.....	21
4.	Aspectos éticos.....	21
5.	Resultados.....	22
5.1	Análisis descriptivos de las características demográficas y clínicas.....	22
5.2	Pruebas diagnósticas.....	27
5.3	Rendimiento diagnóstico del ensayo PCR Elite MGB® Kit por grupos.....	27
5.3.1.	Casos (Confirmados y probables).....	29
5.3.2.	Casos Confirmados.....	31
5.3.3.	Casos Probables.....	32
5.4	Análisis por subgrupos con diferentes puntos de corte.....	34
	5.4.1 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 - 1000 copias/ml para casos (confirmados y probables).....	34
	5.4.2 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 - 1000 copias/ml para casos confirmados.....	36
	5.4.3 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 - 2999 copias/ml para Casos (confirmados y probable.....	38
	5.4.4 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 - 2999 copias/ml para casos confirmados.....	39
	5.4.5 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos (Confirmados y Probables).....	41
	5.4.6 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos confirmados.....	42
5.5	Análisis de factores relacionados una baja sensibilidad de PCR.....	44
6.	Discusión.....	45
7.	Conclusión	47
8.	Referencias bibliográficas	48

Índice de Figuras

Figura 1. Clasificación de pacientes que cumplieron definición de caso sospechoso

Figura 2. Diagrama de flujo de pacientes desde evaluación de elegibilidad hasta análisis primario

Figura 3. Curva de ROC para casos (confirmados y probables)

Figura 4. Curva de ROC para casos confirmados con PCR positiva de *P. jirovecii*.

Figura 5. Curva de ROC para casos probables con PCR positiva de *P. jirovecii*.

Figura 6. Curva de ROC para casos (confirmados y probables) con PCR positiva de *P. jirovecii*.

Figura 7. Curva de ROC para casos confirmados con un punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml

Figura 8. Curva de ROC para casos confirmados con un punto de corte entre 1001 – 2999 copias/ml

Figura 9. Curva de ROC para casos confirmados con un punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml

Figura 10. Curva de ROC para casos (confirmados y probables) con un punto de corte mayor a 3000 copias/ml

Figura 11. Curva de ROC para casos confirmados con un punto de corte mayor a 3000 copias/ml

Índice de Tablas

Tabla 1. Características de pacientes con neumonía por *P. jirovecii* en casos y controles

Tabla 2. Otras causas de neumonía en pacientes con definición de casos sospechosos

Tabla 3. Rendimiento de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit.

Tabla 4. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos (confirmados y probables)

Tabla 5. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos (confirmados y probables)

Tabla 6. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos confirmados

Tabla 7. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos

Tabla 8. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos probables

Tabla 9. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos probables

Tabla 10. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml para casos (confirmados y probables)

Tabla 11. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml para casos (confirmados y probables)

Tabla 12. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml para casos confirmados

Tabla 13. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml para casos confirmados

Tabla 14. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 – 2999 copias/ml para casos (confirmados y probables)

Tabla 15. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 – 2999 copias/ml para casos (confirmados y probables)

Tabla 16. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 – 2999 copias/ml para casos confirmados

Tabla 17. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte 1001 – 2999 copias/ml para casos confirmados

Tabla 18. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos (confirmados y probables)

Tabla 19. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos (confirmados y probables)

Tabla 20. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos confirmados

Tabla 21. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos confirmados

1. Marco teórico y antecedentes.

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PCP) es una infección potencialmente mortal que se produce en personas inmunodeprimidas. (1,2) Los pacientes con infección por VIH y un recuento de CD4 <200 tienen el mayor riesgo de PCP. Otra población en riesgo incluye a los receptores de trasplante de células hematopoyéticas y órganos sólidos, aquellos pacientes con cáncer (particularmente neoplasias malignas hematológicas) y aquellos que reciben glucocorticoides, agentes quimioterapéuticos y otros medicamentos inmunosupresores. La incidencia de PCP aumenta a medida que aumenta el número de personas que reciben medicamentos inmunosupresores (3).

Se debe considerar el diagnóstico de PCP en pacientes con factores de riesgo que presentan neumonía y hallazgos radiográficos sugestivos. La evaluación inmediata está particularmente justificada en pacientes que tienen condiciones inmunocomprometidas o que están siendo tratados con una terapia inmunosupresora combinada (p. ej., glucocorticoides con Ciclofosfamida y que no han recibido profilaxis de *P. jirovecii*).

Debido a que *P. jirovecii* es extremadamente difícil de cultivar, el diagnóstico presuntivo se ha basado tradicionalmente en los síntomas clínicos y los hallazgos radiográficos y de laboratorio como insuficiencia respiratoria y elevación de DHL. La confirmación del diagnóstico se hace al visualizar las formas quísticas y tróficas del microorganismo en tinciones de muestras respiratorias. Las tinciones que se consideran el estándar de referencia para el diagnóstico son Metenamina plata (Tinción de Grocott) y tinciones de inmunofluorescencia en secreciones respiratorias. Los tipos de muestra preferidos para realizar el diagnóstico son el líquido de lavado broncoalveolar obtenido mediante broncoscopia o esputo inducido con nebulización de solución salina hipertónica. (4)

En casos con alta sospecha y las pruebas anteriores negativas, puede ser necesario realizar una biopsia pulmonar. La biopsia pulmonar generalmente se reserva para

pacientes en los que existe una alta sospecha de neumonía por *P. jirovecii* y en quienes la prueba de LBA ha sido negativa o en aquellos que tienen otra razón para proceder a la biopsia pulmonar para el diagnóstico de un proceso pulmonar. (5)

La tinción de anticuerpos fluorescentes directa con un anticuerpo monoclonal conjugado con fluoresceína puede visualizar formas tróficas y quistes y es la técnica más común utilizada. Las formas tróficas también se pueden ver con tinciones como la de Gram-Weigert, Wright-Giemsa o Papanicolaou modificada. La pared celular de los quistes se puede visualizar con blanco de calcoflúor, violeta de cresilo, plata de metenamina de Gomori o azul de toluidina, sin embargo, esta prueba no se encuentra disponible en nuestro medio. (6)

El diagnóstico de PCP se basaba, hasta hace poco, en la visualización de quistes y/o formas tróficas con tinción de *Pneumocystis* en muestras respiratorias (7,8,9). La microscopía carece de sensibilidad en pacientes con baja carga de organismos, hoy en día los pacientes tienen una menor carga de organismos debido a los diversos tratamientos disponibles para las enfermedades subyacentes (10).

La principal limitación de las técnicas diagnósticas basadas en tinciones es la baja sensibilidad para la detección de *P. jirovecii*, por ello, se han desarrollado nuevos métodos moleculares que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación isotérmica mediada por bucle (LAMP).

Se han desarrollado varios ensayos de PCR para la detección de *P. jirovecii* en esputo inducido o líquido de LBA, sangre o aspirados nasofaríngeos. Estos ensayos pueden ser de particular utilidad en pacientes sin VIH, en quienes la sensibilidad de la microscopía con tinción es sustancialmente menor que en los pacientes que viven con VIH.

El método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificación de ADN fue aplicado por primera vez para la detección de *P. jirovecii* por Wakefield et

al. (11) A lo largo del tiempo se han analizado diferentes ensayos de PCR en cuanto a su precisión para la detección de *P. jirovecii* y se han obtenido resultados variables.

La sensibilidad informada de la PCR anidada oscila entre el 72,2 % y el 96,0 %, mientras que la especificidad oscila entre el 58 % y el 100 %. (12,13,14)

La sensibilidad notificada de la PCR convencional oscila entre el 88,2 % y el 100 %, y la especificidad oscila entre el 68 % y el 87 %, mientras que la sensibilidad de la PCR en tiempo real oscila entre 82 % y 100 % con especificidad de 64% y 100%. (15 - 17)

En un metaanálisis realizado de 1990 a 2010 en donde se revisaron 10 estudios, se recopilaron datos sobre el uso de PCR en tiempo real en el diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii* en pacientes inmunocomprometidos, se obtuvo que la sensibilidad global de la PCR en tiempo real fue del 97 % (IC del 95 %: 93 %-99 %), especificidad del 94% (IC 95%; 90%-96%). Considerando algunos grupos en particular como son los pacientes que viven con VIH, la sensibilidad y la especificidad de la PCR en tiempo real fue del 97 % (IC del 95 %; 93% - 99 %) y del 93 % (IC del 95%; 89% - 96 %) respectivamente. (18)

En este mismo metaanálisis, los estudios que utilizaron únicamente muestras de lavado broncoalveolar (LBA), obtuvieron sensibilidad del 98 % (IC del 95 %; 94 %-99 %) con especificidad del 93 % (IC del 95 %:89% - 96 %), en tanto que aquellos estudios que utilizaron la microscopía como estándar de referencia, se obtuvo una sensibilidad igual al 97% (IC 95%: 92%-99%); con una especificidad igual al 93% (IC 95%:88% -96%).

Cabe mencionar que es este metaanálisis se observó una alta heterogeneidad estadística entre los estudios. (18)

En otro metaanálisis realizado en 2011, que incluyó 20 estudios, de pacientes con y sin VIH, se evaluó la precisión general de los ensayos de PCR de muestras respiratorias para diagnosticar neumonía por *P. jirovecii*. En este metaanálisis se

obtuvo sensibilidad de 99% (IC del 95 %, 0,96 a 1,00) y especificidad del 90% (0,87 a 0,93).

Al hacer el análisis por subgrupos de las distintas PCR utilizadas en los estudios, se demostró que la PCR dirigida al espaciador transcrito interno (ITS) tuvo la sensibilidad más alta, del 100% (1,00 a 1,00) y especificidad de 86% (0,76 a 0,95). La sensibilidad y la especificidad de la PCR dirigida a la glicoproteína de superficie principal (MSG) fue de 98% (0,94 a 1,00) y 93% (0,89 a 0,98) respectivamente, mientras que la PCR dirigida al ARNr mitocondrial (ARNmt) de la subunidad grande tuvo sensibilidad del 98% (0,96 a 1,00) con especificidad del 90%. (0,87 a 0,94). En este estudio se concluyó que el ensayo de PCR de muestras respiratorias es muy sensible para descartar o confirmar neumonía por *P. jirovecii* en pacientes de alto riesgo. (19)

En otra revisión sistemática, se incluyeron 16 estudios publicados entre 1994 a 2012 e incluyeron a pacientes con VIH, trasplante de órgano sólido, neoplasias malignas de órganos sólidos, pacientes con LES y otras enfermedades autoinmunes y se obtuvo que la sensibilidad y especificidad de la PCR en lavado bronquioalveolar para el diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii* fue del 98,3 % (91,3 %–99,7 %) y 91,0 % (82,7 %–95,5 %), respectivamente. Con unos valores predictivos positivos y negativos de 10,894 (5,569–21,309) y 0,018 (0,003–0,099), respectivamente.

La PCR cuantitativa tuvo sensibilidad más alta llegando al 100% (IC del 95 %, 92 %–100 %) y especificidad del 93% (IC del 95 %, 77–98 %), mientras que la sensibilidad de la PCR única fue relativamente baja, del 92 % (IC 95 %, 54 %–99 %), con especificidad del 97 % (IC 95 %, 88–99 %) (20)

En otro estudio realizado en Francia donde se recolectaron muestras respiratorias desde agosto de 2009 a abril de 2011, se probó una qPCR de *P. jirovecii* dirigida a la glicoproteína de superficie principal (MSG) del gen de *P. jirovecii*. En este estudio estratificaron a los pacientes en 4 grupos:

- **PCP definitivo:** cuando tenían signos clínicos de neumonía progresiva, anomalías en la TAC de tórax o identificación microscópica de *P. jirovecii*.
- **PCP probable:** cuando tenían signos clínicos de neumonía progresiva, anomalías en la TAC de tórax, mostraban una resolución completa posterior al tratamiento con TMP/SMX o ausencia de identificación microscópica de *P. jirovecii*.
- **Posible PCP:** cuando tenían signos clínicos de neumonía progresiva, signos radiológicos compatibles o resolución completa al tratamiento con TMP/SMX o ausencia de identificación microscópica de *P. jirovecii*.
- **Otro diagnóstico:** cuando no cumplían ninguno de los anteriores.

Los resultados se expresaron como el número de copias de MSG/ml de fluido de lavado bronquioalveolar y se determinó que existía variabilidad en el número de copias de qPCR y que esta fue significativamente mayor en el grupo definitivo (mediana de 465 000 copias/mL, rango de 99 900 a 750 290 000) que en el grupo probable (mediana de 38 600 copias/mL, rango de 7 750 a 148 982) y el grupo posible (mediana de 1 032 copias/mL, rango 731-13.000) o el otro grupo diagnóstico (mediana 390 copias/mL, rango 145-2.833). La diferencia fue significativa entre los cuatro grupos ($p < 0,0001$).

Este estudio concluyó que la qPCR dirigida al gen MSG en muestras respiratorias puede ayudar a discriminar la neumonía por *P. jirovecii* de la colonización por *P. jirovecii* en pacientes inmunocomprometidos, utilizando dos valores de corte de 3160 y 31 600 copias/mL y que los valores de esta corte deben determinarse para cada laboratorio y cada población de pacientes. (21)

Recientemente, se desarrolló un kit comercial de PCR «Pneumocystis ELITE MGB® Kit» para diagnóstico de PCP. Se trata de un ensayo de PCR múltiple, que utiliza un sistema automatizado para la extracción, amplificación y la detección de ácidos nucleicos. El blanco de este ensayo es la subunidad mitocondrial grande del gen ARNr (mtLSU) específica de *P. jirovecii* marcada con un fluoróforo que se activa en presencia de amplificación del DNA blanco.

Este ensayo fue validado con muestras clínicas con resultados conocidos, reportado en el inserto del fabricante con sensibilidad diagnóstica de 100 % en el caso de las muestras de Lavado bronquioalveolar y de 84,2 % en muestras de esputo. La especificidad diagnóstica fue igual a 96,6 % en el caso de las muestras de LBA y del 97,1 % en muestras de esputo.

Hasta el momento no existen estudios que validen el uso del «Pneumocystis ELITE MGB® Kit» en muestras respiratorias de pacientes con sospecha de neumonía por *P. jirovecii*, por lo que antes de utilizarlo como estudio de rutina es necesario conocer su rendimiento diagnóstico, previo a implementarlo en la práctica clínica y es el propósito de dicha investigación.

2. Planteamiento del problema

La neumonía por *P. jirovecii* tiene alta morbimortalidad en pacientes inmunosuprimidos

El estándar de referencia para el diagnóstico son las tinciones argénticas de muestras respiratorias o análisis histopatológico, sin embargo, estos tienen una sensibilidad limitada, sobre todo en pacientes sin VIH. Por ello se han diseñado diversos ensayos de PCR para facilitar el diagnóstico. Sin embargo, no se encuentran estandarizados para su uso en la práctica clínica. Recientemente se introdujo un ensayo de PCR en tiempo real: Pneumocystis ELITE MGB® Kit, sin embargo, no se cuenta con estudios clínicos para su validación. Por lo anterior queremos conocer el rendimiento diagnóstico de este ensayo.

Justificación

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PCP) es una infección potencialmente mortal que se produce en personas inmunodeprimidas. Existe dificultad y demora en el diagnóstico de pacientes con neumonía por *P. jirovecii*, es necesario contar con mejores métodos diagnósticos para esta entidad, debido a las múltiples limitaciones de los métodos actuales. Dentro de las características del método diagnóstico ideal se encuentran una mayor sensibilidad con alta especificidad, que

brinden resultados de manera oportuna (menos de 24 horas) y que brinden información para realizar un tratamiento adecuado de manera oportuna.

La amplificación de DNA de *P. jirovecii* mediante RT-PCR en muestras respiratorias, podría cumplir con esas características.

Se han diseñado estudios en donde se utiliza la detección de genes mitocondriales (*mtSSU rRNA*, *mtLSU rRNA*, *NAD1* y *CYTB*) para determinar la Infección por *P. jirovecii*.

En este estudio se realizó la detección de *P. jirovecii* utilizando el gen mitocondrial *mtLSU rRNA* para establecer el diagnóstico molecular de *Pneumocystis jirovecii* utilizando el Kit «Pneumocystis ELITE MGB® Kit» que detecta el gen mitocondrial *mtLSU* a partir de RNA mitocondrial y antes de utilizarlo como estudio de rutina, es necesario conocer su rendimiento diagnóstico.

3. Metodología

3.1 Hipótesis

La PCR Pneumocystis ELITE MGB kit tendrá sensibilidad y especificidad mayor del 90% para diagnosticar neumonía por *P. jirovecii*.

3.2 Objetivos

Objetivo principal: Determinar la sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivo y negativo de la PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii* en comparación con la tinción de Grocott.

Objetivos secundarios:

1. Identificar el punto de corte óptimo para identificar los casos de neumonía por *P. jirovecii*
2. Evaluar la utilidad de la PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para identificar casos de neumonía por *P. jirovecii* con resultado negativo en la tinción de Grocott

3. Describir las características clínicas y desenlace de los individuos con neumonía por *P. jirovecii* en el INCMNSZ.

3.3 Diseño del estudio

Estudio de prueba diagnóstica, prospectivo, doble ciego, unicéntrico.

3.4 Población en estudio

Se incluyó a pacientes con los siguientes criterios de inclusión:

- Mayores de 18 años.
- Hospitalizados en áreas críticas o médicas del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ).
- Que cumplieron con la definición establecida de sospecha de neumonía por *P.jirovecii*.
- Que tuvieran una muestra de LBA.

Los criterios de exclusión fueron los siguientes:

- Pacientes sin información clínica en el expediente para evaluar el riesgo de *P. jirovecii* o el desenlace.
- Pacientes que recibieron tratamiento con Trimetoprim/ Sulfametoxazol durante más de 72 horas en la semana previa a la toma del LBA.

3.5 Recopilación de la información

Se realizó una búsqueda sistemática de pacientes con sospecha de neumonía por *P.jirovecii* entre los pacientes hospitalizados en el INCMNSZ revisando semanalmente las muestras obtenidas de LBA provenientes de pacientes de áreas críticas y pisos de hospitalización.

A partir de las muestras de LBA de pacientes con sospecha clínica de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* que llegaron al Laboratorio de Microbiología, se consultó el expediente electrónico para verificar si el paciente cumplía con la definición

preestablecida de sospecha de neumonía por *P. jirovecii* y se obtuvieron los datos demográficos, clínicos y sobre el tratamiento de esos pacientes.

Las muestras de LBA se procesaron de acuerdo al protocolo de rutina del Laboratorio de Microbiología incluyendo tinción de Grocott para la búsqueda de *P. jirovecii*.

En aquellos pacientes que cumplieron con la definición de sospecha de neumonía por *P. jirovecii* se separó el sobrante de la muestra de LBA para realizar la PCR Pneumocystis ELITE MGB kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

La muestra se rotuló con un código individualizado para evitar ser identificado y poder interpretar la PCR de manera ciega al resultado de la tinción de Grocott. De igual manera el resultado de la tinción de Grocott se reportó de manera ciega al resultado de la PCR.

La información se registró en un formato estandarizado de reporte de caso. Se le dio seguimiento a cada paciente de manera prospectiva hasta completar 30 días. En ese momento se clasificó al paciente como caso de neumonía por *P. jirovecii* confirmada, probable o control. Esta clasificación se realizó de manera ciega al resultado de PCR.

Los resultados del LBA y la tinción de Grocott se informaron al médico tratante de manera oportuna por la vía habitual, mientras que los resultados de la PCR Pneumocystis ELITE MGB kit no fueron informados ni alteraron el tratamiento implementado.

El tratamiento de los pacientes se estableció de acuerdo al criterio del médico tratante.

3.6 Definición de variables.

Definiciones operacionales:

Paciente con sospecha de *P. jirovecii*: Se consideró cuando se cumplieran los siguientes criterios: Factor predisponente, clínico e imagenológico.

El criterio de factor predisponente se cumplió con la presencia de uno de los siguientes:

- Infección por VIH con CD4 <200 cel/mm³.
- Pacientes con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas ó trasplante de órgano sólido.
- Leucemia o síndrome linfoproliferativo,
- Quimioterapia con Ciclofosfamida, Metotrexate, Fludarabina, Vincristina, Rituximab, Alentuzumab.
- Paciente con alguna enfermedad autoinmune que recibe esteroides >20mg ó Ciclofosfamida, Rituximab o antagonistas TNF-a por más de 1 mes.

El criterio clínico se cumplió con la presencia de uno de los siguiente:

- Síntomas respiratorios agudos o subagudos:
- Disnea progresiva, tos seca, fiebre, insuficiencia respiratoria y DHL alta (2 ó más de esos anteriores)

El criterio imagenológico se cumplió con la presencia de un radiografía de tórax con infiltrados intersticiales perihiliares ó Tomografía Axial Computarizada con infiltrado en vidrio deslustrado, más 1 de los siguientes:

- Nódulos
- Quistes
- Consolidaciones ó neumatocele.

Caso confirmado: Se consideró cuando un paciente con factores de riesgo y cuadro clínico compatible presentó un LBA con resultado positivo en la tinción de Grocott.

Caso probable: Paciente con diagnóstico presuntivo que resulte con PCR Pneumocystis ELITE MGB kit positiva y tinción de Grocott negativa en quien se haya descartado otra causa de neumonía o que haya presentado mejoría clínica con Trimetoprim/sulfametoxazol.

También se considerará un caso probable a aquel que no recibió tratamiento con Trimetoprim/sulfametoxazol, que no tuvo otro diagnóstico alternativo y presentó deterioro o progresión del cuadro neumónico con PCR Pneumocystis ELITE MGB kit positiva.

Mejoría clínica: Se consideró criterio de mejoría clínica a los pacientes que después de 14 días del inicio de antimicrobiano empírico presentaron resolución de los signos y síntomas sospechosos de neumonía por *P. jirovecii*. Es decir, mejoría de los infiltrados en estudio de imagen (mejoría imagenológica) o en caso de no tener imagen, se consideró la resolución de la respuesta inflamatoria sistémica y disminución de requerimientos de oxígeno y/o alta por mejoría.

Progresión Clínica: Progresión de la neumonía en caso con incremento de los requerimientos de oxígeno, progresión de los infiltrados, necesidad de ventilación mecánica (sin otra causa) o defunción atribuible al proceso neumónico.

Caso (verdadero positivo): Se consideró como caso a aquellos pacientes que fueron incluidos por sospecha de neumonía por *P. jirovecii* y en la evolución cumplieron la definición de caso confirmado o probable.

Control (verdadero negativo): Se consideró como pacientes controles a aquellos que fueron incluidos por sospecha de neumonía por *P. jirovecii*, en quienes se descartó esta posibilidad por haber presentado un diagnóstico alternativo

Variable dependiente:

PCR Pneumocystis ELITE MGB kit positiva.

Variables independientes:

Nombre variable	Descripción	Forma de reporte	Tipo de variable
Género	Sexo establecido desde el nacimiento	Femenino ó masculino	Cualitativa
Edad	Número de años cumplidos hasta la fecha desde el nacimiento	Números ordinales	Cuantitativa
Factores predisponentes			
Infección por VIH	Infección por el Virus de Inmunodeficiencia Humana	Presente o Ausente	Cualitativa
Cuenta de linfocitos T CD4+ al momento del diagnóstico de neumonía por PCP	Cantidad de linfocitos CD4 al momento de diagnóstico de VIH	Numérica	Cuantitativa
Trasplante de células hematopoyéticas u órgano sólido	Pacientes con trasplante de células progenitoras hematopoyéticas o trasplante de órgano sólido	Presente o ausente	Cualitativa
Leucemia o síndrome linfoproliferativo	Pacientes con diagnóstico de Leucemia o	Presente o ausente	Cualitativa

	Síndrome Mieloproliferativo		
Quimioterapia	Pacientes con cáncer que reciben quimioterapia en base a Ciclofosfamida, Metotrexate, Fludarabina, Vincristina, Rituximab, Alentuzumab.	Presente o ausente	Cualitativa
Cáncer	Término que describe las enfermedades en las que hay proliferación de células anormales.	Presente o ausente	Cualitativa
Enfermedad autoinmune	Estado patológico en el que el sistema inmune deja vulnerable al organismo frente a procesos infecciosos	Presente o ausente	Cualitativa

3.7 Análisis estadístico

El tamaño de la muestra se calculó con la siguiente fórmula para sensibilidad y especificidad adecuada (22):

$$N = \frac{Z^2 * P * (1-P)}{\Delta^2}$$

Δ^2

Prevalencia esperada de infección en pacientes con inmunosupresión del 28% considerando la reportada en los estudios de validación (11).

Estimamos una sensibilidad del ensayo de PCR en 90%, especificidad en 90% y una precisión del 5%, de tal manera que se incluirán a 138 pacientes que presenten un cuadro de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* para el análisis.

Se calculó la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo y valor predictivo negativo para los distintos subgrupos: Neumonía confirmada por *P.jirovecii* e infección probable por *P. jirovecii*.

Se definió la **sensibilidad** como la capacidad de la PCR para identificar casos con diagnóstico definitivo o probable de neumonía por *P. jirovecii*.

Se definió **especificidad** como la capacidad de la PCR para identificar a los casos controles.

Se analizó el punto de corte óptimo para definir neumonía por *P. jirovecii* mediante análisis de curva ROC y determinación del índice de Youden, que permitió discriminar casos de colonización.

Se realizó el análisis descriptivo de las variables demográficas, clínicas y el desenlace de mortalidad a 30 días. Se utilizaron porcentajes, media, desviación

estándar, mediana, percentiles y rangos intercuantiles de acuerdo al tipo de variable.

3.8 Procedimientos de laboratorio

3.8.1. Lavado Bronquioalveolar:

La técnica fue realizada por un especialista con experiencia (médico fibro-broncoscopista o intensivista entrenado).

Si el paciente estaba intubado, antes de realizar LBA se aspiraron las secreciones traqueales del paciente.

La técnica no está definitivamente estandarizada lo cual dificulta la comparación de resultados entre los distintos autores, pero consiste en la instilación a través del bronco-fibroscopio o sonda de aspiración, de un volumen total de total de 120-200 mL.

El líquido para el lavado se instila en alícuotas de 20 a 50 mL con una jeringa, cada instilación se sigue inmediatamente de una aspiración manual mediante la propia jeringa o bien con aspiración mecánica suave. El líquido recuperado debe ser alrededor de 40-50% del volumen instilado.

Es importante desechar la primera porción del líquido aspirado (contaminada con secreciones del tracto respiratorio superior) y no se debe enviar para estudio microbiológico.

El volumen mínimo debe de ser 30% del volumen instilado

3.8.2. Traslado y procesamiento de muestras respiratorias

Las muestras respiratorias obtenidas de LBA se trasladaron de forma inmediata al Laboratorio de Microbiología siguiendo las normas de Bioseguridad y Manejo de muestras respiratorias.

En el laboratorio de Microbiología, una vez que se recibieron las muestras, se corroboró la correcta identificación de las mismas y posteriormente, se realizó el método de dilución seriada para enviar las muestras a las distintas áreas de Bacteriología y al área de Micología.

Las muestras respiratorias de un lavado bronquioalveolar se siembran en Agar Gelosa de Carnero, Agar MacConkey y Agar Chocolate.

Se le realizó las Tinciones correspondientes: Tinción de Gram, KoH al 15%, Zhiel-Nelsen, Auramina Rodamina y Tinción de Grocott.

Si en la Histología se identifican formas tróficas y quistes, se reportó como Positiva. Una alícuota de la muestra fué enviada al área de Biología Molecular para procesar la PCR en tiempo real. (PCR Pneumocystis ELITe MGB Kit).

3.8.3. Muestras para RT- PCR

Las muestras de LBA, concebidas para la extracción de ADN, se recogieron en una solución fisiológica estéril o en una solución tamponada de fosfato, de acuerdo con las directrices del laboratorio, así como el transporte y conservación a +2/+8 °C durante un máximo de una semana. De lo contrario, las muestras se congelaron y conservaron a -20 °C durante un máximo de 30 días o a -70 °C durante un año, de acuerdo con las prácticas del laboratorio.

Se recomienda dividir las muestras en porciones antes de la congelación para evitar ciclos repetidos de congelación/descongelación para evitar una posible degradación de los ácidos nucleicos.

Las muestras de esputo deben licuarse con reactivos que contengan N-acetil cisteína o ditiotreitól (como Sputasol, Oxoid, Thermo Fisher Scientific), de acuerdo con las instrucciones del laboratorio.

3.8.4. Pneumocystis ELITe MGB® Kit

El producto «Pneumocystis ELITe MGB® Kit» forma parte de un ensayo cuantitativo de amplificación de ácidos nucleicos para la detección y la cuantificación del ADN de *Pneumocystis jirovecii* (PJ) en muestras de ADN extraídas de muestras clínicas. El producto se utiliza para el diagnóstico *in vitro* como ayuda en el diagnóstico y el control de infecciones por *Pneumocystis jirovecii* junto con los datos clínicos y los resultados de otras pruebas analíticas del paciente.

3.8.5. Extracción de DNA

El ácido nucleico de las muestras del paciente y del control interno exógeno añadido (secuencia artificial IC2) se extrajeron de forma simultánea. La amplificación selectiva del ácido nucleico diana a partir de la muestra se logró utilizando primers específicos para la subunidad mitocondrial grande del gen del ARNr (mtLSU) de PJ. En la mezcla de reacción se incluye los primers específicos para el gen mtLSU y el control interno.

Las sondas de PJ y del control interno se diseñan conforme a la tecnología ELITE MGB®. La sonda específica de PJ está marcada con el fluoróforo FAM y se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación de PJ. La sonda específica del control interno se marca con el fluoróforo AP525 y se activa cuando se hibrida con el producto específico de la reacción de amplificación del control interno. A medida que aumenta el producto específico de la reacción, la emisión de fluorescencia aumenta y el equipo la mide y la registra. El procesamiento de los datos permitió detectar la presencia y el título del ADN de PJ en la muestra.

3.8.6. Interpretación de resultados

El resultado de la PCR se reportó como positivo o negativo según el inserto proporcionado por el fabricante. El resultado fue interpretado como positivo cuando se detectó una carga mayor o igual a 97 copias/mL, el resultado fue interpretado como negativo, cuando se detectó una carga menor a 97 copias (rango de referencia: 60 – 275 copias/ml (IC: 95%)).

4. Aspectos éticos.

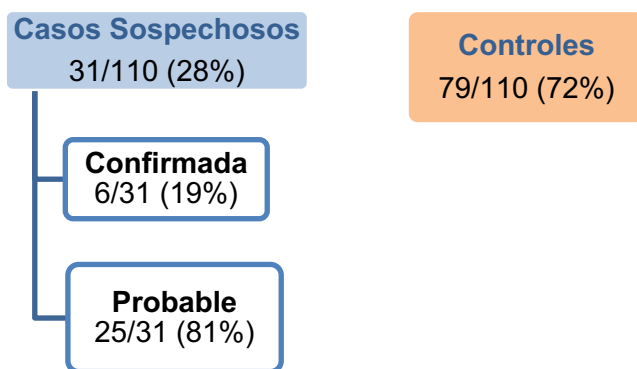
El protocolo fue aprobado de los comités de Ética e Investigación del INCMNSZ. (Ref. INF-4249-22-23-1)

Se obtuvo una aprobación de exención del consentimiento informado, ya que se utilizaron los sobrantes de muestra tomadas durante la atención rutinaria de los pacientes y la evaluación no modificó el tratamiento o atención clínica.

5. Resultados

Durante el proceso de selección, se revisaron 200 expedientes de pacientes que tenían una muestra de lavado bronquioalveolar, de los cuales 110 muestras de pacientes cumplieron definición de caso sospechoso por clínica, laboratorio e imagen. (Figura 1).

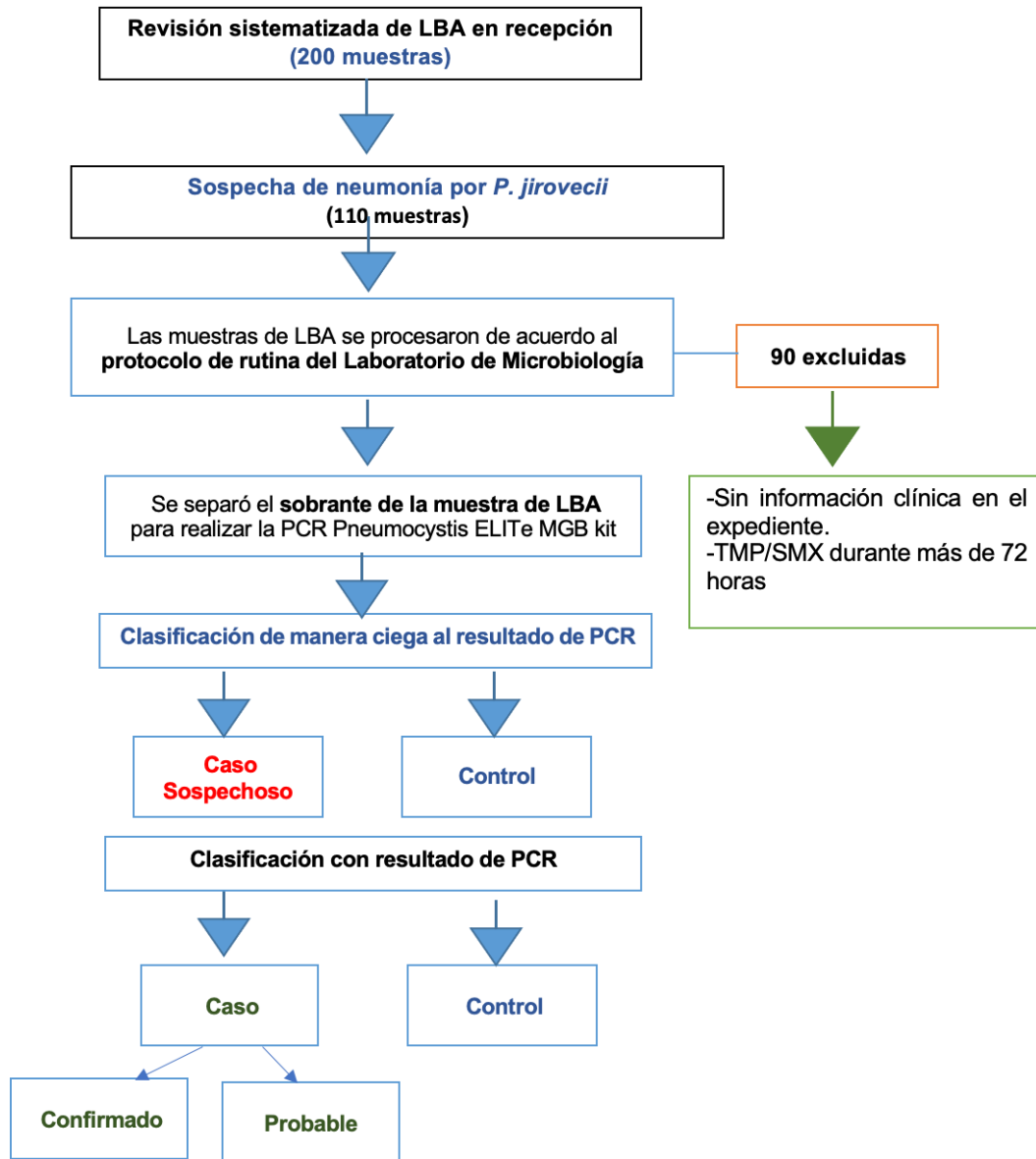
Figura 1. Clasificación de pacientes que cumplieron definición de caso sospechoso



5.1 Análisis descriptivo de las características demográficas y clínicas

Entre el 1º de marzo de 2022 al 1º de marzo de 2023 se recolectaron 110 muestras de lavados bronquioalveolares de pacientes con sospecha de neumonía por *P. jirovecii*. En la Figura 2, se muestra el flujograma de los pacientes incluidos al estudio.

Figura 2. Diagrama de flujo de pacientes desde evaluación de elegibilidad hasta el análisis primario.



Las características demográficas de los pacientes incluidos en el estudio se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de pacientes con neumonía por *P. jirovecii* en casos y controles.

Característica N (%)	Total N: 110 (100%)	Casos confirmados y probables N: 31 (28%)	Controles N: 79 (72%)	P
Edad, mediana (RIC)	47 (38-61)	47 (39-60)	47 (35-62)	0.623
Sexo femenino	52 (47)	13 (52)	39 (49)	0.482
Infección por VIH	15 (14)	13 (42)	2 (2.5)	0.0001
CD4 cel/mm ³	49	49	-	
TCPH	-	-	-	-
Trasplante de órgano sólido	6 (5.5)	2 (6.5)	4 (5.1)	0.773
Leucemia	16 (14.5)	3 (9.7)	13 (16.5)	0.364
Linfoproliferativo	11 (10)	5 (16.1)	6 (7.6)	0.180
Linfoma	8 (7.3)	-	7 (8.9)	0.306
AR	4 (3.6)	3 (9.7)	1 (1.3)	0.034
LES	11 (10)	4 (12.9)	7 (8.9)	0.525
SAF	6 (5.5)	2 (6.5)	4 (5.1)	0.773
Mieloma	3 (2.7)	3 (3.8)	-	0,271
Infección por SARS-COV-2	28 (25.5)	3 (9.7)	25 (31.6)	0,017
Tratamiento inmunosupresor				
Esteroides	54 (49)	11 (35.5)	43 (54.4)	0.074
<5 mg	17 (15.5)	-	17 (21.5)	0.005
10 – 20 mg	21 (19.1)	7 (22.6)	14 (17.7)	0.560
>20 mg	17 (15.5)	4 (12.9)	13 (16.5)	0.643
Ciclofosfamida	2 (1.8)	-	2 (1.8)	0.371
Rituximab	11 (10)	3 (9.7)	8 (10.1)	0.944
Antag TNF-a	1 (0.9)	-	1 (1.3)	0.529
Azatioprina	4 (3.6)	-	4 (5.1)	0.202

Síntomas				
Síntomas agudos	42 (38.2)	32 (40.5)	10 (32.3)	0.423
Síntomas sub-agudos	61 (55.1)	40 (50.6)	21 (67.7)	0.104
Disnea	77 (70)	26 (83.9)	51 (64.6)	0.047
Tos	77 (70)	26 (83.9)	51 (64.6)	0.047
Fiebre	71 (64.5)	26 (83.9)	45 (57)	0.008
Insuf. Respiratoria	70 (63.6)	22 (71)	48 (60.8)	0.317
Laboratorios				
LDH, n=85	234 (174 - 366)	310 (165 - 447)	374 (174-330)	0.197
Imagen				
Vidrio despulido	87 (79.1)	27 (87.1)	60 (75.9)	0.196
Micronódulos	76 (69.1)	21 (67.7)	55 (69.6)	0.848
Nódulos	78 (70.9)	23 (74.2)	55 (69.6)	0.635
Quistes	12 (10.9)	3 (9.7)	9 (11.4)	0.795
Consolidación	80 (72.7)	27 (87.1)	53 (67.1)	0.034
Neumatocele	6 (5.5)	4 (5.1)	2 (6.5)	0.773
Tratamiento				
TMP/SMX	40 (36.4)	27 (87.1)	13 (16.5)	0.0001
Resultado PCR PJ				
PCR cualitativa	15 (13.6)	12 (28)	3 (3.8)	0.0001
501-1000 copias/ml	-	-	-	-
1001-2999 copias/ml	4 (3.6)	1 (3.2)	3 (3.8)	0.885
>3000 copias/ml	8 (7.3)	7 (22.6)	1 (1.3)	0.0001
Mortalidad a 30 días	30 (27.3)	20 (25.3)	10 (32.3)	0.462

+ Media (Desviación estándar) ^a Mediana (rango intercuartil)

TCPH: Trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. AR: Artritis Reumatoidea. LES: Lupus Eritematoso Sistémico. SAF Síndrome Antifosfolipídico. Antag TNF- α : Antagonistas de Factor de Necrosis Tumoral alfa. LDH: Lactato Deshidrogenasa. TMP/SMX: Trimetoprim/Sulfametoxazol

Los pacientes tenían una mediana de edad de 47 años (RIC 36-61) y 47% (52/110) eran de sexo femenino. De los principales factores de riesgo para desarrollar neumonía por *P. jirovecii* fueron:

Infección por VIH en un 14% (15/110) con una mediana de CD4 de 49 cel//mm³ (15/110), enfermedad reumatológica conocida en un 19% (19/110), leucemia en 14.5% (16/110), síndrome linfoproliferativo en un 10% (11/110), trasplante de órgano sólido en un 5.5% (6/110), mieloma múltiple en 2.7% (3/110) y antecedente de infección por SARS-COV-2 en un 25.5% (28/110).

No se encontraron diferencias significativas entre edad y sexo entre los casos con neumonía por *P. jirovecii* en comparación con los controles.

En cuanto a los factores de riesgo, se encontró mayor frecuencia de infección por VIH y artritis reumatoide en los casos (52% y 9.7%, respectivamente) en comparación con los controles (2.5% y 1.3%, respectivamente, con diferencia estadísticamente significativa).

El 49% de los pacientes incluidos tenían antecedente de uso de esteroides, 35.5% de los casos y 54.4% de los controles (p=0.074).

Los otros tratamientos inmunosupresores más frecuentes fueron: Rituximab en un 10% de todos los casos, Azatioprina en un 5.1%, ciclofosfamida en un 1.8% y finalmente los antagonistas de receptor de Factor de Necrosis tumoral alfa en un 0.9%.

Dentro de las manifestaciones respiratorias al momento de la admisión, un 38% de la población presentaron síntomas respiratorios agudos y un 55% tuvieron síntomas subagudos. De las manifestaciones clínicas, al menos un 70% presentó clínica compatible con disnea, tos, fiebre e insuficiencia respiratoria al momento de la admisión. La presencia de fiebre fue más frecuente en los casos (83.9%) en comparación con los controles (57.7%, p=0.008)

Un 77% de los pacientes contaba con determinación de LDH al momento de inclusión del estudio con una media de 234 (RIC 174-366) sin diferencia entre los grupos.

En relación a las anormalidades en la imagen al momento de la admisión, se encontró vidrio despulido en un 79% (87/110), micronódulos en un 69% (76/110), nódulos en un 71% (78/110), quistes en un 11% (12/110), consolidaciones en un 73% (80/110) y la presencia de neumatocele en un 5.5% (6/110). La frecuencia de consolidaciones fue más alta en los casos en comparación con los controles (87.1%Vs 67.1%, $P=0.034$).

El 36% de los pacientes recibió tratamiento empírico con Trimetoprim/Sulfametoxazol, de ellos el 87% de los casos en comparación con 16.5% en los controles ($p=0.0001$) Todos los casos confirmados (6) recibieron tratamiento completo por 21 días y 76% (13/19) de los casos probables. Los 6 casos confirmados se trataban de pacientes que viven con VIH, que se encontraban en estadio avanzado de la enfermedad con $CD4 < 100$ células/mm³, tres pacientes tuvieron desenlaces fatales y tres presentaron mejoría clínica.

La mortalidad a 30 días de los pacientes incluidos fue de 27% (30/110), sin encontrar diferencia significativa entre casos y controles ($p=0.462$).

5.2 Pruebas diagnósticas

De las 110 muestras incluidas de LBA, 79/110 (72%) fueron considerados controles, 31/110 (28%) fueron considerados casos de neumonía por *P. jirovecii*, de los cuáles 6 fueron confirmados por tinción de Grocott y 25/31 (81%) fueron considerados casos probables. De los 31 pacientes casos probables, en 18 pacientes (58%) no se encontraron aislamientos, los otros 12 pacientes (38%) tenían infecciones concomitantes por otros agentes bacterianos como *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. maltophilia*, *B. cenocepacia* entre otros, y/o agentes fúngicos como *A.*

fumigatus, hialohifomicetos, entre otros. El otro 4% tuvieron otro tipo de aislamientos. (Tabla 2).

Tabla 2. Otras causas de neumonía en pacientes con definición de casos sospechosos

Pacientes con otras causas de n:12/31 neumonía (%) (38)	
Bacterias	
<i>E. coli</i>	2
<i>K. pneumoniae</i>	1
<i>S. aureus</i>	2
<i>S. maltophilia</i>	1
<i>B. cenocepacia</i>	1
<i>M. tuberculosis</i>	2
Hongos	
<i>Hialohifomicetos</i>	1
<i>A. Fumigatus</i>	4
<i>H. capsulatum</i>	1
<i>Especies de Fusarium</i>	1
Sin aislamiento	18
Otros	4

El resultado de la PCR fue positivo en 12/31 (38.7%) casos, y 3/79 (3.8%) controles. Cinco (83.3%) de los casos confirmados y 7/25 (28%) casos probables tuvieron PCR positiva (Tabla 3).

Tabla 3. Rendimiento de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit

	Casos confirmados N: 6 (%)	Casos Probables N: 25 (%)	Total
PCR (+)	5 (83.3)	7 (25)	12 (39)
PCR (-)	1 (16.7)	18 (75)	19 (61)
Total	6 (100)	25 (100)	31 (100)

5.3 Rendimiento diagnóstico del ensayo de PCR ELITE MGB kit por grupos

5.3.1 CASOS (CONFIRMADOS Y PROBABLES)

En los casos (confirmados y probables) se encontró una sensibilidad de 39% y una especificidad del 96 % (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos (confirmados y probables)

	Casos confirmados y probables N: 31 (%)	Controles y N: 79 (%)	Total
PCR (+)	12 (39)	3 (4)	15 (14)
PCR (-)	19 (61)	76 (96)	95 (86)
Total	31 (100)	79 (100)	110 (100)

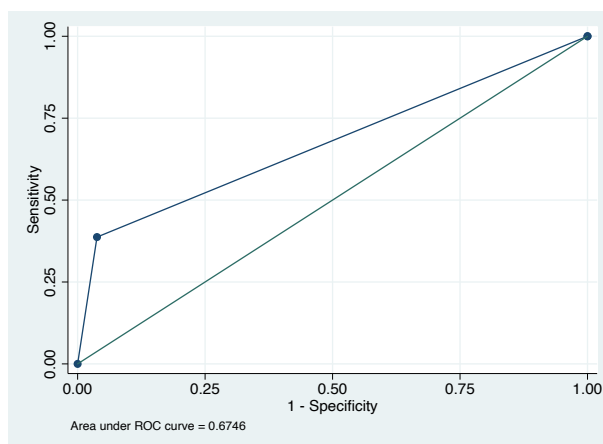
Tabla 5. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos (confirmados y probables)

	Valor (IC95%)
Sensibilidad	39 (22-58)
Especificidad	96 (89-99)
Valor predictivo negativo	80 (75-84)
Valor predictivo positivo	80 (55-93)

Para los casos (confirmados y probables) con PCR positiva de *P. jirovecci* se obtuvo un Índice de Youden de 0.35, (Figura 3), lo que traduce que la prueba no tiene buen rendimiento diagnóstico (por encontrarse un valor igual o cercano a 0).

Figura 3. Curva de ROC para casos (confirmados y probables)

Youden Index 0.35



5.3.2 CASOS CONFIRMADOS

En el grupo de casos confirmados se encontró una sensibilidad de 83.3%, especificidad de 96.2%, valor predictivo negativo de 98.7 y valor predictivo positivo de 62.5 (Tablas 6 y 7).

Tabla 6. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos confirmados

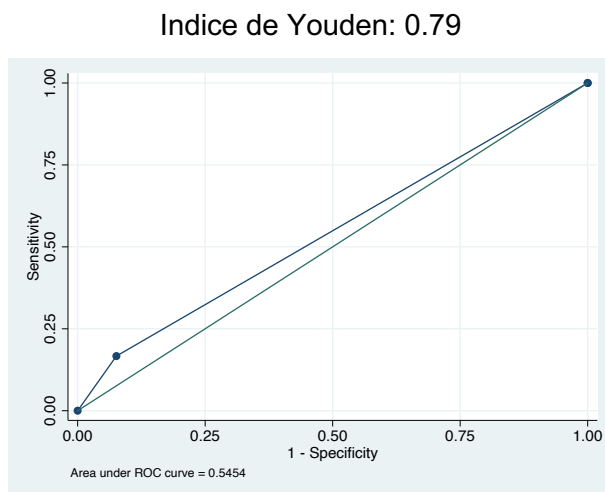
	Casos confirmados N: 6 (%)	Controles N: 79 (%)	Total
PCR (+)	5 (83)	3 (4)	8 (9)
PCR (-)	1 (17)	76 (96)	77 (91)
Total	6 (100)	79 (100)	85 (100)

Tabla 7. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos confirmados

	Valor (IC95%)
Sensibilidad	83.3 (36-99.6)
Especificidad	96.2 (89-99)
Valor predictivo negativo	98.7 (93-99.8)
Valor predictivo positivo	62.5 (34-84)

Para los casos confirmados con PCR positiva de *P. jirovecci* se obtuvo un Índice de Youden de 0.79 (Figura 4), lo que traduce que la prueba tiene buen rendimiento diagnóstico (por encontrarse un valor igual o cercano a 1).

Figura 4. Curva de ROC para casos confirmados con PCR positiva de P. jirovecii.



5.3.3 CASOS PROBABLES

En el grupo de casos probables se encontró una sensibilidad de 28%, especificidad de 96 %, valor predictivo negativo de 0.75 y valor predictivo positivo de 7.37 (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos probables

	Casos probables N: 85 (%)	Controles N: 25 (%)	Total
PCR (+)	8 (9)	7 (28)	15 (15)
PCR (-)	77 (91)	18 (72)	95 (85)
Total	85 (100)	25 (100)	110 (100)

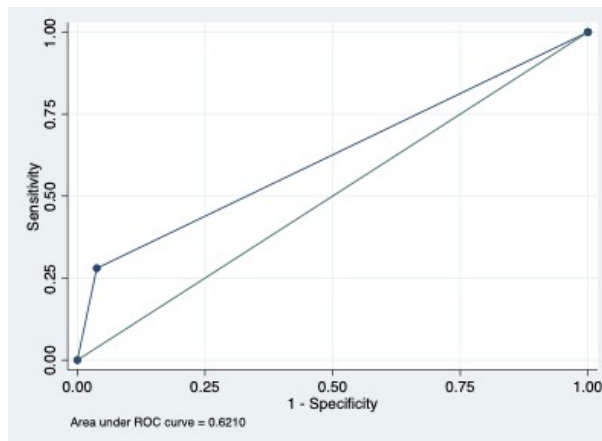
Tabla 9. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit para casos probables

	Valor (IC95%)
Sensibilidad	28 (12– 49.39%)
Especificidad	96 (89-99%)
VPN	0.75 (0.5-0.9%)
VPP	7.37 (2-26%)

Para los casos probables con PCR positiva de *P. jirovecii* se obtuvo un Índice de Youden de 0.24 (Figura 5), lo que traduce que la prueba no tiene buen rendimiento diagnóstico (por encontrarse un valor igual o cercano a 0).

Figura 5. Curva de ROC para casos probables con PCR positiva de *P. jirovecii*.

Youden Index:0.24



5.4 Análisis por subgrupos con diferentes puntos de corte.

5.4.1 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 - 1000 copias/ml para casos (confirmados y probables).

Cuando analizamos el subgrupo de pacientes con sospecha de neumonía por *P. jirovecii*, con resultado de PCR positiva entre 501 - 1000 copias/ml para los casos confirmados y probables, encontramos una sensibilidad y especificidad de 0 y 100%, respectivamente (Tablas 10 - 11).

Tabla 10. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml para casos (confirmados y probables)

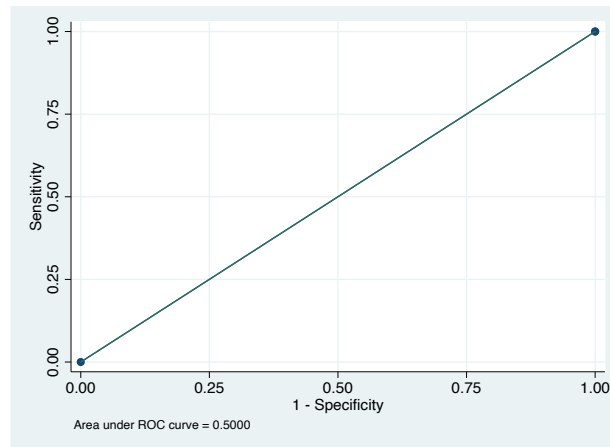
	Casos confirmados y probables N: 31(%)	Controles y N: 79 (%)	Total
PCR (+)	0	0	2 (2)
PCR (-)	31 (100)	79 (100)	108 (98)
	31 (100)	79 (100)	110 (100)

Tabla 11. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml para casos (confirmados y probables)

	Valor (IC 95%)
Sensibilidad	0 (0-11.22)
Especificidad	100 (95.44-100)
Valor predictivo negativo	71.82 (71.82-71.82)
Valor predictivo positivo	0

Para los casos (confirmados y probables) con PCR positiva de *P. jirovecii* con un punto de corte entre 501 - 1000 copias/ml se obtuvo un Índice de Youden de 0.01 (Figura 6), lo que traduce que la prueba no tiene buen rendimiento diagnóstico (por encontrarse un valor igual o cercano a 0).

**Figura 6. Curva de ROC para casos (confirmados y probables) con PCR positiva de *P. jirovecii*.
Youden Index 0.01**



5.4.2 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 - 1000 copias/ml para casos confirmados.

Cuando analizamos el subgrupo de pacientes con neumonía por *P. jirovecii*, con resultado de PCR entre 501 - 1000 copias/ml encontramos una sensibilidad y especificidad de 0 y 100%, respectivamente. (Tablas 12-13).

Tabla 12. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml para casos confirmados

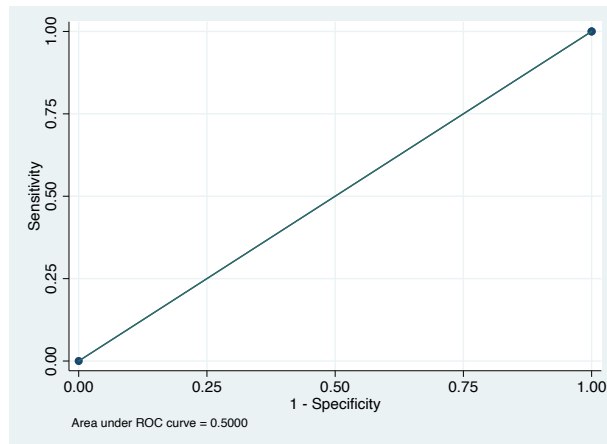
	Casos confirmados N: 6 (%)	Controles N: 79 (%)	Total
PCR (+)	0	0	0
PCR (-)	6 (100)	79 (100)	85 (100)
	6 (100)	79 (100)	85 (100)

Tabla 13. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml para casos confirmados

	Valor (IC95%)
Sensibilidad	0 (0-45.93)
Especificidad	100 (95.4-100)
Valor predictivo negativo	92.94 (92.94-92.94)
Valor predictivo positivo	0

Para los casos confirmados con PCR positiva de *P. jirovecii* con un punto de corte entre 501 - 1000 copias/ml se obtuvo un Índice de Youden de 0.01 (Figura 7), lo que traduce que la prueba no tiene buen rendimiento diagnóstico (por encontrarse un valor igual o cercano a 0).

**Figura 7. Curva de ROC para casos confirmados con un punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml
Youden Index 0.01**



5.4.3 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 - 2999 copias/ml para Casos (confirmados y probables)

Cuando analizamos el subgrupo de pacientes con sospecha de neumonía por *P. jirovecii*, con resultado de PCR entre 1001 - 2999 copias/ml para los casos (confirmados y probables), encontramos una sensibilidad y especificidad de 3 y 96%, respectivamente (Tablas 14-15).

Tabla 14. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 – 2999 copias/ml para casos (confirmados y probables)

	Casos (confirmados y probables) N: 31 (%)	Controles y N: 79 (%)	Total
PCR (+)	1 (3)	3 (4)	4 (4)
PCR (-)	30 (97)	76 (96)	106 (96)
	31 (100)	79 (100)	110 (100)

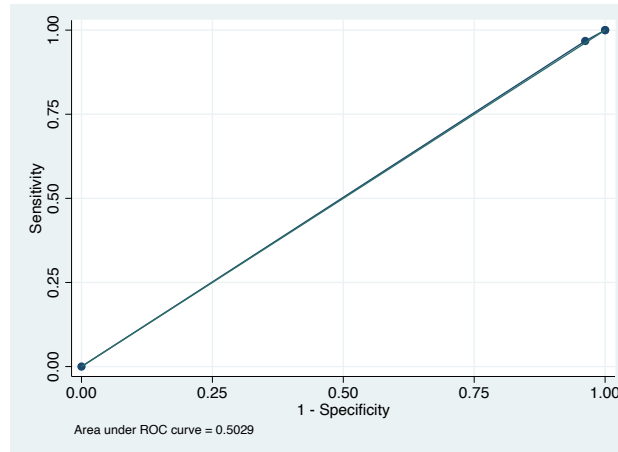
Tabla 15. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 – 2999 copias/ml para casos (confirmados y probables)

	Valor (IC95%)
Sensibilidad	3.23 (0.08-16.70)
Especificidad	96.2 (89.30-99.21)
Valor predictivo negativo	71.70 (70.09-73.25)
Valor predictivo positivo	25 (3.48-75.51)

Para los casos (confirmados y probables) con PCR positiva de *P. jirovecii* con un punto de corte entre 1001 - 2999 copias/ml se obtuvo un Índice de Youden de 0 (Figura 8), lo que traduce que la prueba no tiene buen rendimiento diagnóstico (por encontrarse un valor igual a 0).

Figura 8. Curva de ROC para casos confirmados con un punto de corte entre 1001 – 2999 copias/ml

Youden Index: 0



5.4.4 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 - 2999 copias/ml para casos confirmados

Cuando analizamos el subgrupo de pacientes con neumonía por *P. jirovecii*, con resultado de PCR entre 1001 - 2999 copias/ml encontramos una sensibilidad y especificidad de 0 y 97%, respectivamente. (Tablas 16-17).

Tabla 16. PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte entre 1001 – 2999 copias/ml para casos confirmados

	Casos confirmados N: 6 (%)	Controles N: 77 (%)	Total
PCR (+)	0	2 (3)	0
PCR (-)	6 (100)	77 (97)	85 (100)
	6 (100)	79 (100)	85 (100)

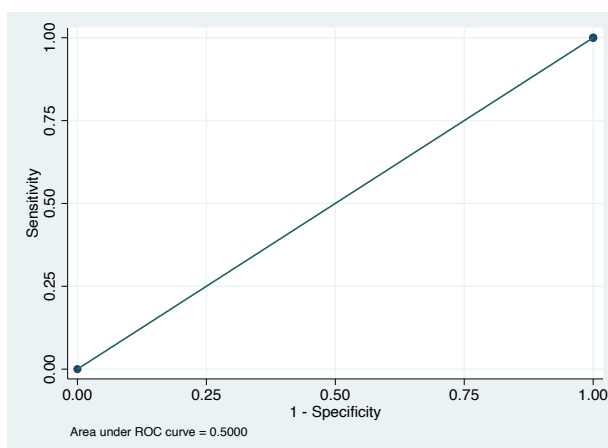
Tabla 17. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte 1001 – 2999 copias/ml para casos confirmados

	Valor (IC95%)
Sensibilidad	0 (0 - 45.93)
Especificidad	97.47 (95.15 - 99.69)
Valor predictivo negativo	92.77 (92.53 - 93.01)
Valor predictivo positivo	0

Para los casos confirmados con PCR positiva de *P. jirovecii* con un punto de corte entre 1001 - 2999 copias/ml se obtuvo un Índice de Youden de 0.01 (Figura 9), lo que traduce que la prueba no tiene buen rendimiento diagnóstico (por encontrarse un valor igual o cercano a 0).

Figura 9. Curva de ROC para casos confirmados con un punto de corte entre 501 – 1000 copias/ml

Youden Index 0.01



5.4.5 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITe MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos (Confirmados y Probables)

Cuando analizamos el subgrupo de pacientes con sospecha de neumonía por *P. jirovecii*, con resultado de PCR positiva mayor a 3000 copias/ml para los casos (confirmados y probables), encontramos una sensibilidad y especificidad de 22 y 99%, respectivamente (Tablas 18 - 19).

Tabla 18. PCR Pneumocystis ELITe MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos (confirmados y probables)

	Casos (confirmados y probables) N: 31 (%)	Controles y N: 79 (%)	Total
PCR (+)	7 (23)	1 (1)	8 (7)
PCR (-)	24 (77)	78 (99)	102 (93)
Total	31 (100)	79 (100)	110 (100)

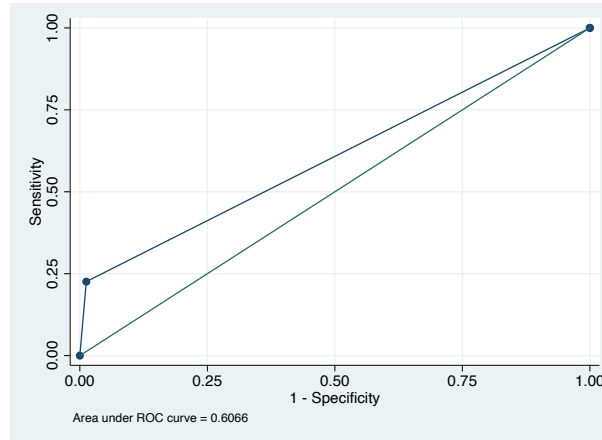
Tabla 19. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITe MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos (confirmados y probables)

	Valor (IC95%)
Sensibilidad	22.58 (9.59 - 41.10)
Especificidad	98.73 (93.15 - 99.97)
Valor predictivo negativo	76.47 (72.85 - 79.74)
Valor predictivo positivo	87.50 (47.31 - 98.20)

Para los casos (confirmados y probables) con PCR positiva de *P. jirovecii* con un punto de corte mayor a 3000 copias/ml se obtuvo un Índice de Youden de 0.22 (Figura 10), lo que traduce que la prueba no tiene buen rendimiento diagnóstico (por encontrarse un valor igual o cercano a 0).

Figura 10. Curva de ROC para casos (confirmados y probables) con un punto de corte mayor a 3000 copias/ml

Youden Index: 0.22



5.4.6 Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITe MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos confirmados

Cuando analizamos el subgrupo de pacientes con neumonía por *P. jirovecii*, con resultado de PCR positiva mayor a 3000 copias/ml encontramos una sensibilidad y especificidad de 83 y 99%, respectivamente. (Tablas 20 - 21).

Tabla 20. PCR Pneumocystis ELITe MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos confirmados

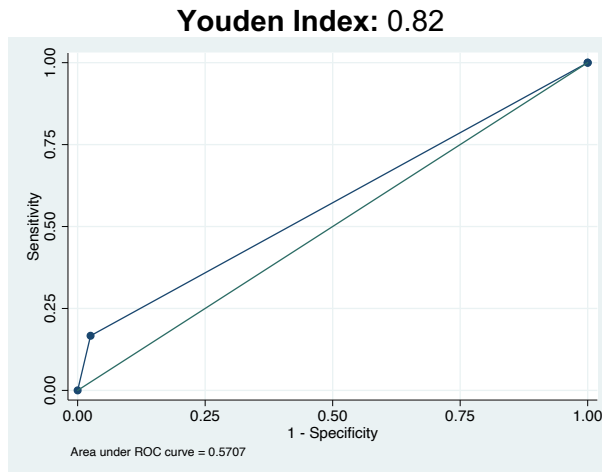
	Casos confirmados N: 6 (%)	Controles N: 79 (%)	Total
PCR (+)	5 (83)	1 (1)	0
PCR (-)	1 (17)	78 (99)	85 (100)
	6 (100)	79 (100)	85 (100)

Tabla 21. Rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit con punto de corte mayor a 3000 copias/ml para casos confirmados

	Valor (IC95%)
Sensibilidad	83.3 (35.88-99.58)
Especificidad	98.73 (93.15-99.97)
Valor predictivo negativo	98.73 (92.87-99.79)
Valor predictivo positivo	83.33 (40.84-97.31)

Para los casos confirmados con PCR positiva de *P. jirovecci* con un punto de corte mayor a 3000 copias/ml se obtuvo un Índice de Youden de 0.82 (Figura 11), lo que traduce que la prueba tiene buen rendimiento diagnóstico en este grupo (por encontrarse un valor igual o cercano a 1).

Figura 11. Curva de ROC para casos confirmados con un punto de corte mayor a 3000 copias/ml



5.5 Análisis de factores relacionados una baja sensibilidad de PCR.

Al obtener los resultados del rendimiento diagnóstico de la prueba, intentamos identificar causas por las cuáles encontramos una baja sensibilidad.

El factor que estudiamos fue que existen falsos negativos de la Tinción de Grocott, al ser una técnica operador dependiente, se corre el riesgo de omisión de alguna muestra sobre todo cuando se tiene una mínima carga fúngica de *P. jirovecci*.

Existen algunas otras coinfecciones sobre todo las virales que también podrían influir en el resultado falso negativo del Grocott.

En este estudio tuvimos 7 pacientes que eran controles y tuvieron PCR positiva para *P. jirovecci*. Uno de ellos tuvo infección por SARS-COV-2, sin ningún otro aislamiento microbiológico, otros 2 pacientes tenían la PCR positiva para *P. jirovecci* con un número considerable de copias (>1000 copias), en uno de ellos el diagnóstico final fue de poliangeitis microscópica con aislamiento de *Klebsiella pneumoniae* y *Mycobacterium simiae* y el otro paciente con aislamiento de *Aspergillus nigri*, en los otros 4 pacientes sin aislamientos microbiológicos a los cuales se podría atribuir el cuadro pero con un número considerable de copias.

Por otro lado, la PCR al ser un método automatizado, no está exenta de errores por lo cual los falsos positivos también pueden ser posibles.

6. Discusión

En este estudio intentamos validar de manera prospectiva, un ensayo de PCR para el diagnóstico de neumonía por *Pneumocystis jirovecii*.

Aunque no tuvimos muchos pacientes con neumonía por *P. Jirovecii* confirmada, la PCR demostró una sensibilidad y especificidad similar a otras PCR probadas en casos confirmados en otros estudios.

El ensayo de PCR mostró una sensibilidad y valor predictivo positivos (83% y 62% respectivamente) y una especificidad y valor predictivo negativos altos, 96 y 99%, respectivamente.

Lo anterior se traduce que es una prueba útil para la práctica clínica, aunque no podemos establecer ningún juicio de valor ya que aún no se ha logrado reunir el número de pacientes establecidos en el cálculo del tamaño de la muestra.

Hasta este momento del estudio podemos concluir que el ensayo de PCR no tuvo una sensibilidad y especificidad > 90%, como era nuestra hipótesis inicial.

Por otro lado, la sensibilidad de la PCR en casos probables es baja, lo que limita su utilidad en la práctica clínica; en nuestro estudio podría ser atribuido a que la mayoría de los casos probables recibió Trimetoprim/Sulfametoxazol de forma empírica., otro punto importante es que es poco factible incluir pacientes sospechosos sin tratamiento antes de la recolección de la muestra respiratoria.

La especificidad de la PCR es muy alta, y es por eso que es difícil que existan falsos positivos.

Al comparar los resultados entre los diferentes puntos de corte establecidos de acuerdo al número de copias que se obtuvo de la PCR, podemos concluir que el punto de corte de >3000 copias/ml tuvo una mejor sensibilidad y especificidad para los casos confirmados demostrando una sensibilidad de 83% y especificidad del 99 %, respectivamente.

Nuestro estudio tuvo varias **limitaciones**, como un número bajo de casos confirmados con neumonía por *P. jirovecii*, tuvimos algunas dificultades para clasificar a los casos probables y una imposibilidad de reclutar pacientes con sospecha de neumonía por *P. jirovecii*, sin haber iniciado tratamiento empírico.

También tiene algunas **fortalezas** como el ser un estudio con un diseño robusto de pruebas diagnósticas que controla sesgos, llevar una clasificación sistemática y estricta de pacientes; cuestiona la utilidad de métodos moleculares en la vida diaria y aporta resultados en la población que cumple criterios de caso sospechoso.

La **perspectiva** de nuestro estudio es, continuar la validación de la PCR tomando en cuenta otro tipo de muestras como el esputo inducido, que nos permita obtener una muestra valiosa antes del inicio de tratamiento empírico en estos pacientes.

7. Conclusión

En este estudio el rendimiento diagnóstico de PCR Pneumocystis ELITE MGB kit fue similar con la Tinción de Grocott en los pacientes que cumplieron definición de caso confirmado.

Este ensayo de PCR múltiple tiene la capacidad de amplificar DNA de *P.Jirovecii* en el 22% de pacientes con alta sospecha clínica.

Por otro lado, nos hace cuestionar ¿cuál es la utilidad real de la prueba?; es probable que la baja sensibilidad se deba a la baja sensibilidad analítica de la prueba se deba el inicio de tratamiento empírico y a las limitaciones que se tienen al momento de incluir a los pacientes en alguna de las definiciones del estudio.

8. Referencias Bibliográficas:

1. Thomas CF Jr, Limper AH. Pneumocystis pneumonia. *N Engl J Med*. 2004;350(24):2487.
2. Thomas CF Jr, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of Pneumocystis pneumonia. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(4):298.
3. Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Dis*. 2002;34(8):1098.
4. Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ 2nd. Pneumocystis carinii pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(5):1204.
5. Pagano L, Fianchi L, Mele L, Girmenia C, Offidani M, Ricci P, Mitra ME, Picardi M, Caramatti C, Piccaluga P, Nosari A, Buelli M, Allione B, Cortelezzi A, Fabbiano F, Milone G, Invernizzi R, Martino B, Masini L, Todeschini G, Cappucci MA, Russo D, Corvatta L, Martino P, Del Favero A. Pneumocystis carinii pneumonia in patients with malignant haematological diseases: 10 years' experience of infection in GIMEMA centres. *Br J Haematol*. 2002;117(2):379.
6. Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ 2nd. Pneumocystis carinii pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(5):1204.
7. Leigh TR, Wakefield AE, Peters SE, Hopkin JM, Collins JV. Comparison of DNA amplification and immunofluorescence for detecting Pneumocystis carinii in patients receiving immunosuppressive therapy. *Transplantation* 1992; 54: 468-470.
8. Elvin KM, Björkman A, Linder E, Heurlin N, Hjerpe A. Pneumocystis carinii pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage fluid by monoclonal antibodies. *BMJ* 1988; 297: 381-384.
9. Kovacs JA, Ng VL, Masur H, Leoung G, Hadley WK, Evans G, et al. Diagnosis of Pneumocystis carinii pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1988; 318: 589-593.
10. Ribes JA, Limper AH, Espy MJ, Smith TF. PCR detection of Pneumocystis carinii in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 830-835.

11. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 2002; 8: 891-896.
12. Torres J, Goldman M, Wheat LJ, Tang X, Bartlett MS, Smith JW, et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods. *Clin Infect Dis* 2000; 30: 141-145.
13. Alvarez-Martínez MJ, Miró JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Sole M, et al. Sensitivity and specificity of nested and realtime PCR for the detection of *Pneumocystis jiroveci* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 153-160.
14. Savoia D, Millesimo M, Cassetta I, Forno B, Caramello P. Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in human immunodeficiency virus-positive patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1997; 29: 61-65.
15. Brancart F, Rodriguez-Villalobos H, Fonteyne PA, Peres-Bota D, Liesnard C. Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis jiroveci*. *J Microbiol Methods* 2005; 61: 381-387.
16. Bandt D, Monecke S. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jiroveci*. *Transpl Infect Dis* 2007; 9: 196-202.
17. Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf JD. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by two staining methods and two quantitative PCR assays. *Infection* 2009; 37: 261-265.
18. Summah, Hanssa; Zhu, Ying-gang; Falagas, Matthew E; Vouloumanou, Evridiki K; Qu, Jie-ming. Use of real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients: a meta-analysis. *Chinese Medical Journal*: May 20, 2013 - Volume 126 - Issue 10 - p 1965-1973.
19. Yuan Lu, Guoya Ling, Chenyi Qiang, Qinshou Ming, Cong Wu, Ke Wang, and Zouxiao Ying. PCR Diagnosis of *Pneumocystis Pneumonia*: A Bivariate Meta-Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, Dec. 2011, p. 4361–4363.
20. Li-Chao Fan, Hai-Wen Lu, Ke-Bin Cheng, Hui-Ping Li, and Jin-Fu Xu. Evaluation of PCR in Bronchoalveolar Lavage Fluid for Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia: A Bivariate Meta-Analysis and Systematic Review. *PLoS One*. 2013; 8(9): e73099.

21. M Maillet , D Maubon, J P Brion, P François, L Molina, J P Stahl, O Epaulard, A Bosseray, P Pavese. Pneumocystis jirovecii (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014 Mar;33(3):331-6.
22. <https://www.questionpro.com/es/calculadora-de-muestra.html>