



**Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia
Facultat de Medicina**

**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)**

**Míriam Álvarez Martínez
2008**



**Departament d'Anatomia Patològica, Farmacologia i Microbiologia
Facultat de Medicina**

**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)**

Directores

Dra. María Teresa Jiménez de Anta Losada

Dr. José María Miró Meda

Dr. Steven R. Meshnick

Tesis Doctoral presentada por Míriam Álvarez Martínez para optar al grado de Doctora en Medicina

María Teresa Jiménez de Anta Losada, Catedrática de Microbiología del Departamento de Anatomía Patológica, Farmacología y Microbiología de la Universidad de Barcelona, y Jefe de Servicio de Microbiología, Hospital Clínic, Barcelona.

José María Miró Meda, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Barcelona, y Médico Consultor del Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Clínic, Barcelona.

Steven R. Meshnick, Professor of Epidemiology, Microbiology & Immunology Departments, University of North Carolina (UNC), Chapel Hill, NC, USA.

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada “**Prevalencia de *Pneumocystis jirovecii* con Mutaciones Asociadas a Resistencia a Sulfamidas en Pacientes con Infección por VIH-1. Estudio de los Factores de Riesgo y Valor Pronóstico en la Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PcP)**”, presentada por **Míriam Álvarez Martínez**, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos para ser leída delante del Tribunal correspondiente.

Firmado:

Dra. María Teresa Jiménez de Anta Dr. José María Miró Dr. Steven R. Meshnick

Barcelona, Septiembre 2008.

A mis padres, a mis hermanos

AGRADECIMIENTOS

A mis tres directores de tesis, la Dra. María Teresa Jiménez de Anta, el Dr. José María Miró, y el Dr. Steven Meshnick, por el entusiasmo, y constante apoyo, con el que me han acompañado y guiado a lo largo de todos estos años.

A la Dra. Asunción Moreno, investigadora principal del proyecto FIPSE que impulsó esta tesis, por ser, con su afectuosa y continua ayuda, una directora más.

A la Dra. María Eugenia Valls, por facilitar siempre el trabajo, compartir su espacio conmigo, y enseñarme a descubrir la cara positiva de la vida.

A Conxita Melción, por su acogida maternal.

Al Dr. Francesc Marco, mi tutor durante la residencia, por sus buenos consejos a navegante, y por todos los momentos de ciencia, música y literatura.

Al Dr. Jordi Mas, por compartir “su África” conmigo, hacer revivir mi sueño tropical, y contagiarme su entusiasmo docente.

A Fina Pardos y Iuse Ferré, por su imprescindible colaboración.

Al Dr. Julià González, por ser el primero en sugerir la idea de esta tesis.

A todos y cada uno de mis compañeros del Servicio de Microbiología del Hospital Clínic de Barcelona, de ayer y de hoy, por ser mi “gran familia catalana”; en especial a los Dres. Jorge Puig de la Bellacasa y Manel Almela, por su cercanía.

A todos mis compañeros del servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Clínic, sobre todo a las Dras. Paula Rivas y Nati de Benito, por impulsar este proyecto desde el principio.

A mis compañeros del *Meshnick's Lab* de la Universidad de Carolina del Norte, por acogerme y enseñarme, especialmente al Dr. Paul Wilson, sin su ayuda nunca hubiera zarpado este velero.

A Ada y Julio Cachafeiro, a la Dra. Vicenta Devesa, por ser mi “familia americana”, con ellos, la ciencia al otro lado del Atlántico, fue una deliciosa travesía.

A mis colaboradores el Profesor Prolla, el Dr. Gustavo Wissmann y la Dra. Heather Zar.

A Elisa de Lazzari, por su valiosa ayuda. A todos y cada uno de los investigadores del Grupo Español de Estudio de la Neumonía por *Pneumocystis*, y sobretodo, a nuestros pacientes.

Y para acabar, a los Dres. Álvarez, Marta y David, por ser confidentes, colegas en ciencia, y compañeros de navío, porque tenerlos como hermanos ha sido mi mejor fortuna.

A mis padres, por educarnos con amorosa inquietud intelectual, por ser siempre faro y refugio en las tempestades, por ser el viento fresco, que soplando en los días de calma, nos ha llevado invariablemente a buen puerto. Gracias.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank all the people overseas, who contributed to this thesis,

Dr. Steven Meshnick, supervisor, for accepting me as visiting investigator in his Microbiology Lab at the University of North Carolina (UNC), Chapel Hill, US, for believing in my work, for supporting, and for providing me with a huge amount of experience.

For making my stay at UNC a pleasure, I would like to thank,

Paul Wilson, always having time to help me, and for sharing his knowledge.

Jesse Kwiek and Victor Mwapasa for giving excellent feedback.

Annie Purfield, Charlotte Lanteri, Alisa Alker, and Warunee Ngrenngarmert, my dearest colleagues at the “ladies’ lab”, for always supporting and being positive, for our moments of science and coffee with M&Ms. I will never forget you “pirates”.

To my collaborators and co-authors, Dr. Heather Zar in South Africa, Professor João C. Prolla and Dr. Gustavo Wissmann in Brazil, and Dr. Joep van Oosterhout in Malawi.

To all of you, thank you so much.

I. JUSTIFICACIÓN	1
II. INTRODUCCIÓN	5
1. ORGANISMO	
1.1. Revisión Histórica.	7
1.1.1. 1908-1913. De Brasil a París.	7
1.1.2. 1913-1917. Primeros Estudios en Animales.	8
1.1.3. 1917-1942. Silencio.	8
1.1.4. 1942-1960. Neumonitis por Células Plasmáticas. Pentamidina.	8
a. Neumonitis por Células Intersticiales Plasmáticas en Niños Europeos.	
b. <i>Pneumocystis carinii</i> en Adultos.	
c. Descubrimiento del Modelo Animal y la Primera Droga Efectiva.	
1.1.5. 1960-1980. Los Primeros Inmunodeprimidos.	10
a. Cáncer. Inmunodeficiencias 1as. Transplante de Órganos. Malnutrición.	
b. Tratamiento y Prevención entre 1960 y 1980.	
c. <i>Pneumocystis carinii</i> . El Organismo entre 1960 y 1980.	
1.1.6. 1980-2008. <i>Pneumocystis</i> y SIDA.	12
a. <i>Pneumocystis carinii</i> Descubre el SIDA.	
b. Tratamiento y Profilaxis (1980-2008)	
1.1.7. <i>Pneumocystis</i> en el siglo XXI.	14
1.2. Nomenclatura y Variaciones Genéticas. Taxonomía.	15
1.3. Estructura Celular. El Ciclo Biológico.	17
1.3.1. Ciclo Biológico.	17
1.3.2. Métodos Morfológicos de Estudio de <i>Pneumocystis</i> .	19
a. Microscopía Óptica.	
b. Microscopía Electrónica. Ultraestructura.	
1.4. Transmisión y Epidemiología.	31
1.4.1. Modo de Transmisión.	31
1.4.2. Origen de la Infección.	31
a. Presencia en Neonatos.	
b. Presencia en Adultos. ¿Adquisición Activa o Latencia y Reactivación?	

2. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.	
DEFENSA E INTERACCIÓN CON EL HUÉSPED.	
2.1. Mecanismos de Patogenicidad.	35
2.1.1. Establecimiento de la Infección.	35
2.1.2. Proliferación del Microorganismo.	36
2.1.3. Cambios en el Alveolo.	37
a. Cambios Anatómicos.	
b. Cambios Fisiológicos y Bioquímicos.	
2.2. Defensa e Interacción con el Huésped.	39
2.2.1. Interacción de <i>Pneumocystis</i> con los Macrófagos Alveolares y las Células del Epitelio Alveolar.	39
2.2.2. El Papel de la Inmunidad Humoral y Celular. Aspectos Inmunológicos de la Infección en Humanos.	40
3. INFECCIÓN EN EL HOMBRE	
3.1. Presentación Clínica y Diagnóstico de la Neumonía por <i>Pneumocystis</i> (PcP) en Pacientes VIH Positivos en Países Desarrollados.	44
3.1.1. Incidencia.	44
a. Incidencia en EUA.	
b. Incidencia en Europa y España.	
3.1.2. Factores de Riesgo para la PcP.	45
a. Recuento de Linfocitos CD4.	
b. Carga Viral (ARN de VIH-1)	
c. Reservorio Natural y Transmisión Persona-Persona.	
3.1.3. Presentación Clínica.	46
a. Signos y Síntomas.	
b. Datos de Laboratorio.	
c. Radiografía de Tórax.	
d. Tomografía Computerizada de Alta Resolución (TACAR).	
e. Test de Función Pulmonar.	
f. Otros Test.	
g. Enfermedad Extrapulmonar.	

3.1.4. Complicaciones.	49
a. Fallo Respiratorio.	
b. Pneumotórax.	
c. Enfermedad Pulmonar Crónica.	
3.2. PcP en Pacientes con SIDA en Países Pobres.	52
3.2.1. Situación en los Países Pobres.	52
3.2.2. Estudios de la Primera Década de la Epidemia de SIDA.	53
a. África.	
b. América Central y del Sur.	
3.2.3. Estudios de la Segunda Década de la Epidemia de SIDA.	53
a. África.	
b. América Central y del Sur.	
c. Asia.	
3.2.4. Tendencia en la Prevalencia de PcP en Países Pobres Frente a Países Industrializados.	55
3.3. Tipificación Molecular y Epidemiología.	56
3.3.1. Introducción.	56
3.3.2. Tipificación Molecular: Genes y Métodos.	56
a. Genes Estudiados en <i>Pneumocystis</i> .	
b. Métodos de Tipificación Molecular.	
3.3.3. Contribución de la Tipificación Molecular de <i>Pneumocystis</i> a la Epidemiología y la Clínica de la PcP.	59
a. Taxonomía y Reservorio de la Enfermedad.	
b. La Fuente de Infección: Adquisición Reciente vs. Reactivación de la Infección Latente.	
c. Historia Natural de la PcP en el Hombre.	
d. Tipificación Molecular y Correlación Clínica.	

3.4. Tratamiento y Profilaxis de la PcP.	62
3.4.1. Introducción.	62
3.4.2. Tratamiento de la PcP.	62
3.4.3. Profilaxis Frente a PcP.	65
a. Profilaxis Primaria.	
b. Profilaxis Secundaria.	
c. Retirada de la Profilaxis.	
d. Reinicio de la Profilaxis.	
3.5. Dihidropteroato Sintetasa (DHPS) y Citocromo B.	
El Problema de la Resistencia Emergente.	68
3.5.1. Introducción.	68
3.5.2. Sulfamidas y los Polimorfismos de DHPS en <i>Pneumocystis jirovecii</i> .	68
3.5.3. Significado Clínico de las Mutaciones en DHPS.	71
3.5.4. Atovacuona y Polimorfismos en el Citocromo b de <i>Pneumocystis</i> .	72
III. HIPÓTESIS	77
IV. OBJETIVOS	81
V. METODOLOGÍA Y RESULTADOS	85
Artículo 1. Sensitivity and Specificity of Nested and Real-time PCR for the Detection of <i>Pneumocystis jirovecii</i> in Clinical Specimens. <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases</i> (2006) 56: 153-160.	87
Artículo 2. <i>Pneumocystis jirovecii</i> Pneumonia in Spanish HIV-Infected Patients in the Combined Antiretroviral Therapy Era: Prevalence of DHPS Mutations and Prognostic Factor of Mortality. <i>Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases</i> (2008) June 11, [Epub ahead of print].	99

Artículo 3. Influence of Combined Antiretroviral Therapy and Dihydropteroate Synthase Genotypes Outcome of <i>Pneumocystis</i> Pneumonia in HIV-Patients. <i>Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (2008) enviado a publicar.</i>	113
Artículo 4. Prevalence of Dihydropteroate Synthase Mutants in HIV-Infected South African Children with <i>Pneumocystis jiroveci</i> Pneumonia. <i>Clinical Infectious Diseases (2004) 39: 1047-51.</i>	131
Artículo 5. <i>Pneumocystis</i> Pneumonia in HIV-Positive Adults, Malawi. <i>Emerging Infectious Diseases (2007) 13(2): 325-328.</i>	141
Artículo 6. Absence of Dihydropteroate Synthase Mutations in <i>Pneumocystis jirovecii</i> from Brazilian AIDS Patients. <i>Journal of Eukaryotic Microbiology (2006) 53(4): 305-307.</i>	149
VI. DISCUSIÓN	157
VII. CONCLUSIONES	177
VIII. BIBLIOGRAFÍA	183
IX. ANEXO	213
1. Cuaderno de recogida de datos (CRD)	215
2. Factor de impacto de los artículos incluidos en la tesis.	221
3. Otras publicaciones y comunicaciones derivadas de la tesis.	222
- Cartas al Editor.	225
- Artículos de revisión.	227
- Comunicaciones a congresos.	247

ABREVIATURAS

ADN	Ácido Desoxinucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
c-ART	Terapia Antirretroviral Combinada
CDC	<i>Centres for Diseases Control</i>
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>
CV	Carga Viral
DHFR	Dihidrofolato Reductasa
DHPS	Dihidropteroato Sintetasa
DL_{CO}	Capacidad de Difusión del óxido carbónico
EI	Espujo inducido
EUA	Estados Unidos de América
FDA	<i>Federal Drug Administration</i>
FEV₁	Volumen espiratorio forzado en 1 segundo
FNT	Factor de Necrosis Tumoral
FVC	Capacidad Vital Forzada
HAART	<i>Highly Active Antiretroviral Therapy</i>
IF	Interferón
IL	Interleuquina
iv	Intravenoso
LBA	Lavado Broncoalveolar
LDH	Lactato Deshidrogenada
ME	Microscopía electrónica
MO	Microscopía óptica
MSG	Glucoproteína mayor de superficie
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pa_{o2}	Presión arterial de oxígeno
PA_{o2} - Pa_{o2}	Gradiente de presión de oxígeno alveolo-arterial
PcP	Neumonía por <i>Pneumocystis</i>
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
rT-PCR	PCR a tiempo real
RX	Radiografía
SEIMC	Sociedad Española de Microbiología y Enfermedades Infecciosas

TACAR	Tomografía Axial Computerizada de Alta Resolución
TARGA	Terapia Antirretroviral de Gran Eficacia
Th1	Linfocitos T- <i>helper</i> 1
Th2	Linfocitos T- <i>helper</i> 2
UCI	Unidad de Cuidados Intensivos
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

I. JUSTIFICACIÓN

Cien años nos separan de las primeras descripciones de *Pneumocystis*, y pocos más de veinticinco, del inicio de la pandemia del SIDA. Durante todo este tiempo el cuadro clínico producido por *Pneumocystis* ha pasado de ser un proceso anecdótico, a una infección devastadora. Los últimos veinte años han sido cruciales en el estudio e investigación del patógeno. Las peculiaridades de este microorganismo han hecho que se haya clasificado en diversos grupos taxonómicos a lo largo de su existencia. La dificultad de su cultivo ha sido un obstáculo en el conocimiento, tanto de su estructura, como de su respuesta a los antimicrobianos. El inicio de los estudios moleculares de *Pneumocystis*, a principios de los años ochenta, ayudó a clarificar su taxonomía y epidemiología, mejoró su diagnóstico, y evidenció que la resistencia a sulfamidas, utilizadas como profilaxis y tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis*, podría ser un proceso emergente.

El desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular de *Pneumocystis jirovecii*, y el conocimiento de la prevalencia de la resistencia a sulfamidas, en nuestro país, fueron el motivo que impulsó este trabajo de tesis doctoral. Una vez iniciado el trabajo, surgió la idea de completar el estudio de la resistencia a las sulfamidas en España, con el estudio de la epidemiología de la neumonía por *Pneumocystis* en países pobres, como Sudáfrica, Brasil y Malawi. Fruto de todo ello es la tesis que se presenta a continuación.

La aplicación de las técnicas moleculares supondría un notable avance en el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis* en nuestro entorno. Conocer la epidemiología de la enfermedad en nuestro país, y clarificar la controversia sobre la implicación clínica de la exposición a sulfamidas, y el posterior desarrollo de resistencias, sería de gran ayuda en el futuro manejo del cuadro. Una vez determinada la prevalencia de la resistencia a sulfamidas en España, y su influencia en el pronóstico de la enfermedad, podrían establecerse las pautas de profilaxis y tratamiento adecuadas a la situación.

El estudio de la epidemiología de la enfermedad en los países pobres, respecto a los países desarrollados, daría una idea global de la presentación de la neumonía por *Pneumocystis* en los distintos escenarios.

Con todo ello, se pretendió que este trabajo fuera una pequeña aportación al fascinante mundo del conocimiento de un patógeno centenario, pero con muchas incógnitas todavía por resolver.

II. INTRODUCCIÓN

1. ORGANISMO

1.1. Revisión Histórica.

La historia de *Pneumocystis* se inicia con una serie de hallazgos ocasionales en los albores del siglo XX, hace ahora exactamente 100 años (*Hughes, 1998*). Las primeras observaciones lo relacionaron con una oscura e insignificante causa de infección en roedores, pero con el paso de unas décadas, apareció asociado a un extraño y letal cuadro neumónico que afectaba a un grupo de hombres de San Francisco, y que acabaría descubriendo el SIDA. Durante esta centuria, el microorganismo parece haber evolucionado poco, sin embargo, los principales cambios han tenido lugar en el hospedador humano y en sus circunstancias. Los sencillos estudios microscópicos, en tejido pulmonar animal y humano, que precedieron al descubrimiento de *Pneumocystis*, dejaron la puerta abierta a la investigación de su estructura, patogénesis, epidemiología, clínica, y al desarrollo de agentes profilácticos y terapéuticos.

1.1.1. 1908-1913. De Brasil a París.

La historia de *Pneumocystis* comienza en 1908 en Brasil. El joven Carlos **Chagas** acaba de iniciar su carrera investigadora en el Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro y es enviado a la región de Minas Gerais, a combatir la epidemia de malaria que afecta a los trabajadores de la construcción de la nueva línea del ferrocarril. Allí descubre un nuevo patógeno, el *Trypanosoma cruzi*. Durante el estudio de este nuevo patógeno y su clínica, Chagas es capaz de reproducir la enfermedad inyectando el parásito en ratas y cobayas. De este modo, identifica en los pulmones de los animales de laboratorio, unas formas quísticas, un poco más pequeñas que un hematíe, que en su interior contienen hasta 8 “células hijas”. Del mismo modo, las aísla en el líquido espumoso que llena el tejido pulmonar necrótico de un pequeño de 4 años. Dichos hallazgos hicieron pensar a Chagas que estos quistes formaban parte del ciclo biológico de un *Trypanosoma*, conocido como *Schizotrypanum lewisi* (*Chagas, 1909*).

Dos años más tarde, en 1910, el italiano Antonio **Carini**, en el Instituto Pasteur de São Paulo, continúa el estudio de las nuevas formas quísticas descritas por Chagas. Sin embargo, pone en duda que formen parte del ciclo biológico de *T. cruzi*, al no encontrarlas en ratones con tripanosomiasis.

Chagas contacta entonces con sus colegas del Instituto Pasteur de París, a los que comunica sus sospechas, y les envía muestras del tejido pulmonar de estas ratas, para que confirmen el origen de estas formas (Carini, 1910).

En 1912, en el Pasteur de París, Pierre y Mme. **Delanoë** demuestran que el organismo se encuentra en los pulmones de ratones parisinos sin tripanosomiasis, por lo tanto no debe ser parte del ciclo biológico de *T. cruzi*, sino un nuevo parásito. Sugieren darle el nombre de ***Pneumocystis carinii***, a estas formas quísticas, encontradas sólo en tejido pulmonar, y que Antonio Carini ya había intuido como una nueva especie (Delanoë y Delanoë, 1914).

1.1.2. 1913-1917. Primeros Estudios en Animales.

Fue descrito en ratas, cobayas, monos, y conejos, en Brasil (Aregao, 1913); en ratas (Coles, 1915), y ratones (Porter, 1915), en Gran Bretaña, y en ratas, en Suiza (Galli, 1917).

1.1.3. 1917-1942. Silencio.

Durante las tres décadas que siguieron a su descubrimiento no se publicó nada al respecto, *Pneumocystis* quedó perdido en la oscuridad. Carini vuelve a Italia, tras pasar 40 años en Brasil y muere en 1950 a los 78 años. Ningún investigador de la época supo discernir la importancia de aquellos pequeños quistes, si eran algo más que parásitos de los roedores. No tuvieron la curiosidad de averiguar la naturaleza del *Pneumocystis*, si causaba patología, si era contagioso, si afectaba a otros animales y, cuál podía ser su prevalencia en sitios tan distantes como Brasil y Francia.

1.1.4. 1942-1960. Neumonitis por Células Intersticiales Plasmáticas. Pentamidina.

a. Neumonitis por Células Intersticiales Plasmáticas en Niños Europeos.

Alrededor de la 2ª Guerra Mundial un nuevo y misterioso tipo de neumonitis apareció en Europa afectando a niños entre 2 y 8 meses, fundamentalmente a los prematuros y desnutridos (Gajdusek, 1957). Especialmente afectados resultaron los orfanatos. El inicio del cuadro era solapado, con disminución del apetito, inquietud, pérdida de peso y diarrea. A ello se añadía dificultad respiratoria, tos débil, retracción intercostal, tensión en la musculatura del cuello y aleteo nasal. Con el paso de los días aparecía el abdomen distendido y la coloración de los pequeños se tornaba azulada. La condición empeoraba en 1 ó 2 semanas y muchos de ellos morían exhaustos.

Ningún tratamiento resultaba efectivo, tan sólo el oxígeno parecía aliviar, aunque no curar. Las primeras descripciones de la neumonitis intersticial se hicieron en Berlín en 1938 (*Ammich, 1938*), pero poco a poco conocieron más casos de este síndrome en el centro, norte y oeste de Europa. El cuadro fue descrito en Suiza, Checoslovaquia, Italia, Hungría, Yugoslavia, Austria, Dinamarca, Suecia, Francia y Finlandia. Desde el principio se pensó en un agente causal contagioso, pero la búsqueda de una bacteria, virus u hongo fue infructuosa. Hasta que en 1951, **Vanek**, en Checoslovaquia, descubrió la existencia de *Pneumocystis carinii* en los pulmones de 16 niños que habían fallecido a consecuencia de la misteriosa neumonitis (*Vanek, 1951*). El más joven de ellos tan sólo tenía 4 meses, 10 eran prematuros y 6 con alguna malformación. El cuidadoso examen microscópico de Vanek y sus colaboradores descubrió cientos de miles de quistes de *Pneumocystis carinii* relleno de los alveolos de estos niños. Sus descubrimientos corroboraron las descripciones que **Van der Meer** y **Brug** habían hecho una década antes en Holanda, y que habían pasado desapercibidas (*Van der Meer & Brug, 1942*).

Los resultados de **Vanek**, **Jirovec** y **Lukes** fueron publicados tanto en Checoslovaquia como en Alemania y arrojaron luz en la etiología de la epidemia de neumonitis intersticial (*Vanek, et al., 1953*).

b. *Pneumocystis carinii* en Adultos.

Hasta 1956 se creía que la infección por *P. carinii* estaba limitada a los niños. A partir de esta fecha se hacen las primeras descripciones en adultos inmunodeprimidos (*Rubis & Zak, 1960*). En aquella época la población adulta inmunodeprimida era muy escasa, la terapia inmunosupresora antineoplásica estaba en sus inicios, el uso de los corticoides era muy limitado, los pacientes diagnosticados de cáncer fallecían en estadíos iniciales, y el trasplante de órganos no se había instaurado.

c. Descubrimiento del Modelo Animal y la Primera Droga Efectiva.

En 1955, Weller en Alemania y Sheldon en Atlanta, ponen en marcha los primeros estudios en modelo animal, en ratas y conejos, respectivamente (*Weller, 1955; Sheldon, 1959*). Inoculan *P. carinii* a animales tratados y no tratados con corticoides, y ambos grupos se infectan, demostrando que el organismo puede ser adquirido o reactivado desde un estado de latencia en el hospedador inmunodeprimido.

El modelo animal establecido fue de gran utilidad en los posteriores estudios en humanos, por su gran similitud al cuadro en el hombre.

El primer fármaco que se mostró eficaz frente a la neumonitis por *Pneumocystis* fue la pentamidina. Su elección en 1958 fue debida a que era activa frente a *Trypanosoma*, y si se tenía que tratar “algo similar al *Trypanosoma*” podría ser una opción adecuada. Se mantuvo como tratamiento estándar hasta mediados de los setenta (*Ivady et al., 1960*).

1.1.5. 1960-1980. Los primeros Inmunodeprimidos.

La PcP resurge de nuevo en 1960 con la aparición de los primeros pacientes inmunodeprimidos. Los casos se describen principalmente en grandes hospitales norteamericanos, sólo en pacientes en los que su sistema inmunológico ha sido dañado por quimioterapia y radiación post-neoplásica, o por un defecto congénito de la inmunidad. La depresión inmunitaria causada por los trasplantes de órganos, que se inician en aquella época, también se asociará a neumonitis por *P. carinii*.

a. Cáncer. Inmunodeficiencias Primarias. Trasplante de Órganos. Malnutrición

Debido a que la neumonitis por *P. carinii* no era una enfermedad de declaración obligatoria, en aquel momento, no se tenía una idea aproximada de su magnitud. Fue en 1974 al publicar Walzer un estudio retrospectivo en colaboración con el CDC, entonces único centro dispensador de pentamidina, cuando se empieza a tener información real de los casos que existían (*Walzer et al., 1974*). Entre 1967 y 1970, el CDC había recibido 579 peticiones de pentamidina, de ellas se confirmó el diagnóstico de *P. carinii* en 194. La enfermedad de base que presentaban estos pacientes era por orden de frecuencia, una leucemia, un linfoma, un tumor sólido, una inmunodeficiencia primaria (agammaglobulinemia, hipogammaglobulinemia y el síndrome de la inmunodeficiencia severa combinada (SCIDS), o habían recibido un órgano transplantado (hígado, riñón, bazo, corazón y médula ósea). Así mismo, se identificó la malnutrición como factor favorecedor de la aparición de la enfermedad, lo que justificaría los múltiples casos que se habían producido en décadas anteriores en los orfanatos europeos. Estudios animales demostraron, *a posteriori*, que la malnutrición provoca una disminución de proteínas que son necesarias para la eliminación del *Pneumocystis* (*Hughes et al., 1974*).

De este modo, quedaron identificados los pacientes en riesgo de padecer una pneumocystosis, entre el 15% y 20 % de los pacientes con leucemia, más del 45% de los niños con SCIDS y el 9% de los transplantados de órgano sólido. De los pacientes tratados por *P. carinii*, al menos un tercio de ellos desarrollarían un nuevo episodio (Hughes et al., 1977).

b. Tratamiento y Prevención entre 1960 y 1980.

En la búsqueda de una droga eficaz para el tratamiento y profilaxis de la PCP se iniciaron una serie de estudios ensayo-error en humanos y animales (Ivady, 1967). La pentamidina a principios de los sesenta era el único tratamiento efectivo. Aunque no se habían realizado ensayos controlados con ella, los resultados hablaban por sí solos, el 100% de los pacientes sin tratamiento fallecían, frente al 50% que sobrevivía tras su administración (Hughes, 1973). Sin embargo, sólo se disponía de la forma de administración parenteral que provocaba muchos efectos adversos. Además, no era eficaz como profilaxis. Su distribución también era complicada, todavía no estaba aprobada por la FDA y se distribuía desde Inglaterra al resto del mundo, así muchas veces cuando llegaba a su destino, era demasiado tarde, y el paciente había fallecido. A mediados de los sesenta se prueban las combinaciones de pirimetamina con sulfadiacina y pirimetamina con sulfadoxina (Fansidar), con resultados que parecen ser prometedores. Pero no fue hasta 1974 cuando se ensaya la combinación del trimetoprim con sulfametoxazol (cotrimoxazol), y se comprueba que es tan efectivo como la pentamidina, y además carece de sus efectos adversos. Se administra tanto por vía oral como parenteral, y al ser seguro y eficaz, reemplaza a la pentamidina como droga de elección en el tratamiento, y también en la profilaxis de la neumonitis por *P. carinii* (Hughes et al., 1974-b).

c. *Pneumocystis carinii*. El Organismo entre 1960 y 1980.

Hasta 1960 el principal conocimiento que se tenía de *Pneumocystis* era morfológico, gracias a los estudios histológicos realizados mediante tinciones colorimétricas como la plata metenamina de Gomori, y el Giemsa, con microscopía óptica. Entre 1960 y 1980, con la aparición del microscopio electrónico se desarrollan los estudios ultraestructurales del organismo, conociéndose al detalle las organelas, y la pared celular de las diferentes formas del ciclo de *Pneumocystis* (Murphy et al., 1977). Las técnicas de inmunofluorescencia, que empezaron a utilizarse en los setenta, mostraron por primera vez las diferencias de especie de *Pneumocystis* procedente de ratas y de hombre. Los anticuerpos procedentes de suero de las

ratas no reaccionaban con los aislados de *P. carinii* humano, aunque lo hacían ávidamente con los derivados de rata (Kim et al., 1972). Así, en 1973 Frenkel postuló que, aunque no existían diferencias morfológicamente distinguibles, las diferencias inmunológicas determinaban la existencia de especies diferentes en el hombre y la rata. Sugiere por primera vez que, si tal diferencia es real, el organismo que produce patología en el hombre debería denominarse de otra forma. Propone el nombre de *Pneumocystis jirovecii*, en honor del parasitólogo checo Otto Jirovec, que en los cincuenta había identificado *Pneumocystis* como la causa de la neumonitis de células plasmáticas, que afectaba a los niños de los orfanatos europeos (Frenkel, 1976).

1.1.6. 1980-2008. *Pneumocystis* y SIDA.

La historia de *P. carinii* puede dividirse en antes y después de 1981. Fue sin duda en este año cuando *P. carinii* pasa de ser un patógeno relativamente extraño para el hombre, a ser una de las principales causas de muerte entre los pacientes afectados en la epidemia global del SIDA. En las dos décadas posteriores a 1980, se han publicado casi 6000 artículos sobre *Pneumocystis*, frente a los 1000 publicados en las dos décadas anteriores a 1980.

a. *Pneumocystis carinii* descubre el SIDA.

Hasta 1981 se asociaba la infección por *Pneumocystis* a una causa poco frecuente de neumonitis en pacientes inmunocomprometidos. Al aparecer la enfermedad en un grupo de hombres jóvenes, sin asociarse a ninguna de las causas de depresión del sistema inmune conocidas hasta entonces, se creyó que tal vez existían otros defectos de la inmunidad subyacentes en estos pacientes. Masur, en Nueva York, y Gottlieb en California, diagnosticaron a 11 y 4 pacientes, respectivamente, de neumonitis por *P. carinii* (Masur et al., 1981; Gottlieb et al., 1981). Estos pacientes a pesar de proceder de áreas geográficas diferentes presentaban características comunes, todos eran homosexuales y/o adictos a drogas intravenosas, y tenía defectos en número o función de los linfocitos T. La voz de alarma llegó al CDC por el hecho de detectar un aumento en la demanda de suministro de pentamidina. Durante ese año, 1981, se descubrió el SIDA, comenzando una nueva era de la enfermedad humana. Y es curioso que tan sólo 15 casos bastaran para describir el SIDA tal y como lo conocemos más de dos décadas después. En realidad *P. carinii* descubrió el SIDA.

Si no fuera por que una enfermedad oportunista sacó a relucir la inmunodepresión de estos pacientes, uno se pregunta hasta cuando hubiera permanecido silencioso el VIH.

En estos primeros casos de la enfermedad aparecieron numerosas reacciones adversas al tratamiento con trimetoprim-cotrimoxazol, hecho que no había ocurrido en otros inmunodeprimidos tratados hasta entonces. Por lo que se decidió volver a la terapia con pentamidina, sin embargo de nuevo surgieron problemas en la distribución de la droga. Esta seguía produciéndose sólo en Inglaterra, y la compañía quebró. La dificultad sólo se solventó hasta que otra compañía reinició la producción, pero en este caso, a precios desorbitados.

La infección por *P. carinii* creció exponencialmente con la expansión epidémica del SIDA. De los 1000 primeros casos de SIDA, el 50% presentaron una neumonitis por *P. carinii*, y casi el 45%, sufrieron reacciones adversas por el trimetoprim-cotrimoxazol. Desafortunadamente las reacciones adversas a la pentamidina no fueron menores. Otras drogas se hacían necesarias para el tratamiento y profilaxis. A mediados de 1983, se habían comunicado 2000 casos de SIDA, 743 de ellos infectados por *P. carinii* (Fauci et al., 1984).

b. Tratamiento y Profilaxis (1980-2008).

La necesidad de alternativas para el tratamiento y profilaxis de la neumonía por *Pneumocystis* en pacientes VIH impulsó la aparición de nuevos regímenes terapéuticos. Entre ellos resultaron exitosos: dapsona con y sin trimetoprim, pentamidina en aerosol, trimetexato-leucovorina, atovaquona y clindamicina más primaquina.

- 1987: se introduce el trimetexato, un derivado liposoluble de metotrexato, como potente inhibidor de la DHFR de *Pneumocystis* (Allegra et al., 1987; Queener et al., 1987).
- 1989: es aprobada por la FDA la pentamidina en aerosol como profilaxis para PCP.
- 1990: estudios en el modelo animal sugieren que la atovaquona es tan efectiva como el cotrimoxazol, pero más segura. Se aprueba su uso en 1995 (Hughes et al., 1990).
- 1990: diversos ensayos clínicos sugieren que la administración coadyuvante de corticoides reduce el riesgo de mortalidad, fallo respiratorio, o deterioro de la oxigenación, en pacientes con moderada o severa PCP. Aunque posteriores estudios han puesto en duda dichos beneficios (NIH, 1990).

- 1991: se evalúa la combinación de clindamicina y primaquina en el modelo animal, y ensayos clínicos determinan que la combinación es efectiva y segura como terapia (Smith, 1991), aunque no como profilaxis (Barber et al., 1996).

Al inicio de la epidemia del SIDA, la introducción de la profilaxis fue escalonada. Aunque estaba bien establecida la pauta con TMP-SMX en pacientes con cáncer, inmunodeficiencias y transplantados, no fue hasta 1989 cuando el CDC publicó la guía de profilaxis de PcP en pacientes infectados por VIH, estableciendo las líneas de actuación (CDC, 1989). Como consecuencia de la aplicación de dicha profilaxis en los pacientes de alto riesgo (adultos con $CD4 < 200/cm^3$), la incidencia de PCP disminuyó significativamente (Dworkin, et al., 2001).

La aparición de la terapia antirretroviral de gran eficacia (TARGA o HAART, del inglés *highly active antiretroviral therapy*, o c-ART, terapia antirretroviral combinada), en 1996, cambió el espectro clínico-epidemiológico de la enfermedad. Mejoró la supervivencia y el estado inmunológico de los pacientes con SIDA, permitiendo la retirada segura de la profilaxis en pacientes con el número de linfocitos CD4 reestablecido. De este modo, la combinación de TARGA y la profilaxis han permitido una supervivencia a largo plazo, con cargas virales controladas y reconstitución inmune, en los pacientes con un pronóstico previo sombrío (López Bernardo de Quirós et al., 2001).

1.1.7. *Pneumocystis* en el Siglo XXI.

El siglo XXI se ha iniciado lleno de expectativas para elucidar la naturaleza de *Pneumocystis* y su patología asociada. Parece lógico esperar que dentro del espectro clínico aparezcan nuevas formas de presentación de la enfermedad, como afectación autolimitada en personas sanas; que se determine el hábitat natural de *Pneumocystis*; que se desarrollen nuevos fármacos para la terapia y profilaxis; y que se establezca un sistema de cultivo *in vitro* que permita el estudio detallado del ciclo biológico del agente. De este modo, cien años después de las primeras descripciones de *Pneumocystis*, queda la puerta abierta para seguir avanzando en el estudio de este fascinante organismo.

1.2. Nomenclatura y Variaciones Genéticas. Taxonomía.

Pneumocystis describe un género de hongos unicelulares de baja virulencia y muy relacionados, que se encuentran en los pulmones del ser humano y diversos mamíferos. La situación taxonómica del género se resolvió al final de la década de los 80 cuando los análisis de la secuencia 18s del ARNr sugirieron que dicho microorganismo está relacionado de forma más cercana con los hongos que con los protozoos (*Wakefield, et al. 2002*). Esta conclusión se ha reforzado mediante el análisis de la secuencia genómica de los genes que codifican la dihidrofolato reductasa, la timidilato sintetasa, la tubulina y las actinas, así como mediante la demostración de la presencia del factor de elongación 3, un elemento necesario para la síntesis de proteínas, que se encuentra en los hongos, pero no en los protozoos. Los estudios filogenéticos han sugerido que el organismo está relacionado de forma más estrecha con los **ascomicetos** como una rama basal profunda entre los **arquiascomicetos**. Aunque los estudios fenotípicos de *Pneumocystis* demuestran que es poco común entre los hongos, por su incapacidad de crecer en cultivo, y por carecer de ergosterol en su membrana plasmática, que lo hacen resistente a los fármacos antifúngicos que actúan sobre la biosíntesis de este lípido. Las especies incluidas en el género demuestran discrepancias genotípicas y fenotípicas que se manifiestan mediante diferencias antigénicas y morfológicas ultraestructurales, así como por su especificidad hacia el huésped (*Wakefield, 2002*). Los estudios genéticos han demostrado diferencias entre las especies de *Pneumocystis* a un nivel cariotípico, en la organización y estructura de las familias de genes dentro de los genes individuales. *Pneumocystis* no sólo presenta diferencias genéticas entre los distintos huéspedes animales, sino que también las hay entre las especies, y/o cepas en los microorganismos del mismo huésped. Las variaciones morfológicas ultraestructurales sólo son evidentes con microscopía electrónica, mientras que otras diferencias fenotípicas interespecíficas requieren la caracterización antigénica, o la realización de electroforesis enzimática multilocus.

Los modelos experimentales han demostrado que una cepa de *Pneumocystis* tomada de un huésped determinado parece incapaz de proliferar en otras especies de huésped. El mejor conocimiento de la especificidad del huésped, y de las diferencias genéticas entre los miembros del género *Pneumocystis*, ha hecho necesario individualizar las especies dentro del género.

En reconocimiento a las descripciones del microorganismo que el matrimonio Delanoë aisló en ratas infectadas, la taxonómica oficial ha mantenido el nombre de *Pneumocystis carinii* para las especies derivadas de las ratas (Stringer, et al., 2002). Los microorganismos aislados a partir de seres humanos se han descrito de forma oficial como *Pneumocystis jirovec(i)* en reconocimiento al parasicólogo checo Otto Jirovec, cuyo grupo identificó por primera vez a *Pneumocystis* como patógeno humano, y como el agente causal de la neumonía intersticial de células plasmáticas. Después el vocablo latino fue corregido al término *jirovec(ii)*. Actualmente, una segunda especie identificada en ratas se ha denominado *Pneumocystis wakefieldiae*, en honor a la investigadora británica recientemente fallecida Ann Wakefield, iniciadora de los estudios moleculares de *Pneumocystis*.

A pesar de arduos esfuerzos de numerosos grupos investigadores, la falta de un sistema de cultivo in vitro fiable permanece como un problema insalvable. Se ha conseguido la replicación limitada (hasta 10 veces) de los microorganismos derivados de la rata, en diferentes líneas celulares, y en medios axénicos. Se ha descrito un sistema de cultivo continuo para el *Pneumocystis* derivado de la rata y del ser humano, aunque se ha constado la dificultad para reproducirlo y mantenerlo. El cultivo a corto plazo se ha usado sólo para estudiar el metabolismo de *Pneumocystis*, y la susceptibilidad a agentes antimicrobianos, aunque no se ha conseguido su normalización y reproducibilidad entre los laboratorios (Cushion, 1998).

1.3. Estructura Celular. El Ciclo Biológico.

1.3.1. Ciclo Biológico.

Los estudios sobre el ciclo biológico de *Pneumocystis* están basados fundamentalmente en el análisis mediante microscopía óptica y electrónica de las formas observadas en pulmones infectados o en los cultivos a corto plazo (Cushion, 1998). Se suelen observar tres estadios de desarrollo del microorganismo junto a formas intermedias. La denominación de los estadios combina la antigua clasificación de *Pneumocystis* como protozoo, así como su nueva consideración como hongo. De este modo, mencionaremos ambas, el primer nombre corresponde a la antigua denominación y el segundo a la nueva. El **trofozoíto o forma trófica** es pequeño (1-4 μm), pleomórfico, y por lo general aparece en acúmulos. Este estadio puede identificarse en la tinción de Giemsa por su núcleo rojizo y su citoplasma azul. En el ciclo biológico de *Pneumocystis* se distinguen dos fases de reproducción, la asexual y la sexual (**Figura 1**). En la fase asexual, las formas tróficas se multiplican mediante fisión binaria. En la fase sexual, las formas tróficas haploides se conjugan para formar un cigoto diploide que se transforma en un **prequiste o esporocito** de 4-6 μm . Esta forma es difícil de distinguir de los otros estadios del desarrollo mediante microscopía óptica. El prequiste sufre un proceso de meiosis seguido de mitosis, lo que origina el **quiste, ascus, o caja de esporas**, que contiene ocho **cuerpos intraquísticos o esporas** haploides. El quiste de 5-8 μm tiene una pared celular gruesa que se tiñe bien con tinciones como la metenamina argéntica, o el azul de toluidina O. Los cuerpos intraquísticos de 1-2 μm están formados por la compartimentación de los núcleos y los orgánulos citoplasmáticos, muestran formas diferentes, y parecen liberarse a través de una hendidura de la pared celular. La esquistación o liberación de esporas dará lugar a los trofozoítos, o formas tróficas, que se adherirán a las paredes de los neumocitos tipo I.

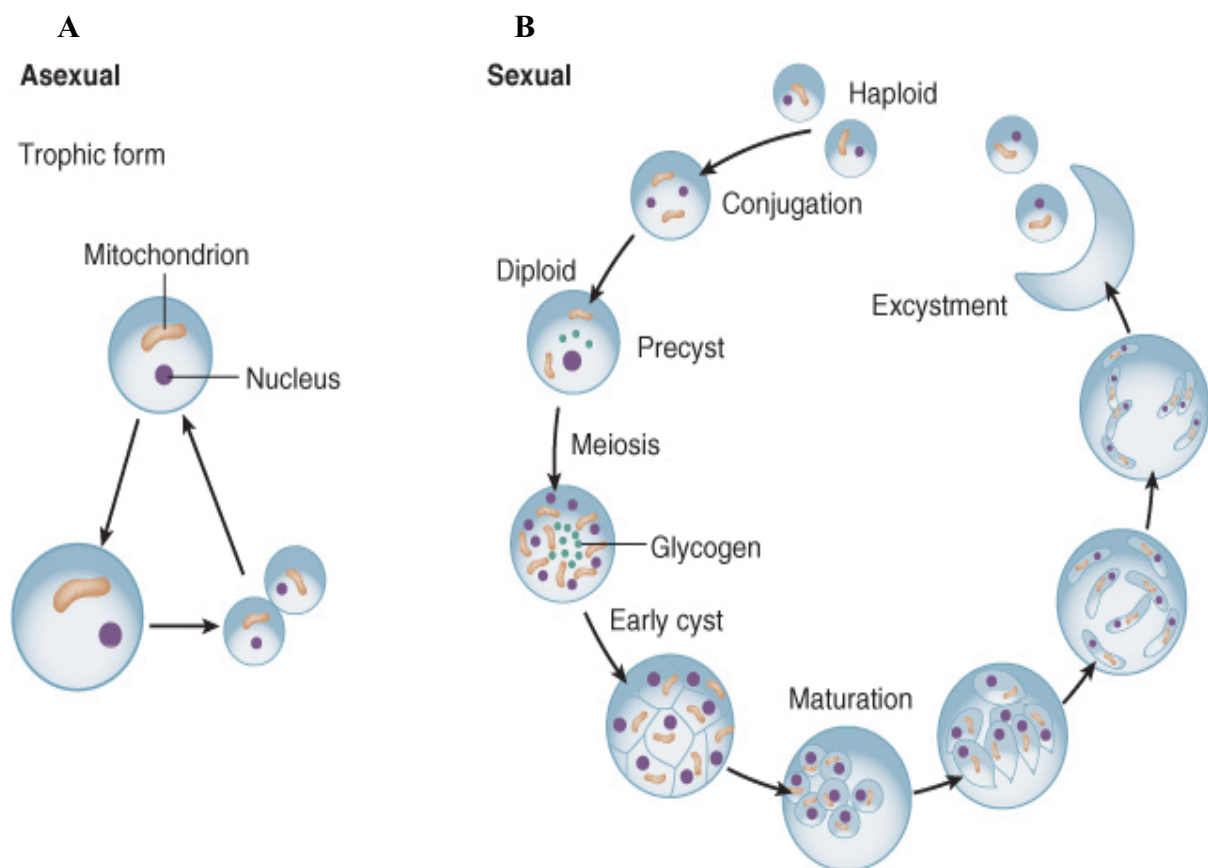


Figura 1.

Ciclo Biológico de *Pneumocystis jirovecii* (A- ciclo asexual; B- ciclo sexual).

Tomado de *Cushion, 1998*.

1.3.2. Métodos Morfológicos de Estudio de *Pneumocystis*.

a. Microscopía Óptica.

Pneumocystis jirovecii puede ser diagnosticado en LBA, esputo inducido, biopsia pulmonar y transbronquial mediante microscopía óptica, con tinciones colorimétricas e inmunofluorescentes. Las muestras se obtienen mediante un procedimiento invasivo para el paciente, en el caso del LBA se realiza una fibrobroncoscopia instilando suero salino normal; la producción del esputo inducido se estimula con la administración de suero salino hipertónico y, las biopsias pulmonar y transbronquial también se obtienen a través de broncoscopia. El LBA obtenido se procesa en una citocentrífuga y las improntas conseguidas son las que se utilizan para la tinción. Con el esputo inducido se realizan extensiones en un portaobjetos y se dejan secar al aire antes de teñir. Del material pulmonar y bronquial se preparan cortes con microtomo previamente a la tinción.

Entre las tinciones colorimétricas pueden ser utilizadas la plata metenamina de Gomori-Grocott, el Wright-Giemsa, el Papanicolaou, el azul de toluidina O, y el violeta crisol. La tinción con plata metenamina en LBA es considerada la técnica de referencia para el diagnóstico de *Pneumocystis*. Esta tinción originalmente fue desarrollada para los hongos y tiñe específicamente la pared del quiste de *Pneumocystis* de un color marrón oscuro, casi negro, permitiendo la cuantificación exacta de los mismos (**Figura 2**). El Giemsa sin embargo, no tiñe la pared del quiste, pero sí los núcleos, tanto de los quistes como de los trofozoítos, de un color rosado, frente al citoplasma que aparecerá azul (**Figura 3**). El Papanicolau y el Gram, al igual que el Giemsa, no tiñen específicamente el microorganismo individualmente, sino las masas de moco espumoso que suelen envolver a las agrupaciones de *Pneumocystis*, entre las que se distingue un claro halo periférico alrededor de los quistes (**Figura 4**). El Papanicolau es la tinción más utilizada por los citopatólogos, porque permite evaluar los cambios celulares que se producen en el caso de infecciones virales concomitantes, como el CMV. El azul de toluidina y el violeta crisol tienen buena afinidad por los componentes de la pared del quiste. El azul de toluidina los tiñe de color violeta rojizo, y es una tinción más rápida que la plata metenamina, por ello se ha utilizado como técnica de screening en algunos laboratorios. Con el violeta crisol se tiene menos experiencia clínica, aunque ha sido utilizado en estudios animales.

En la práctica diaria, se suele combinar el uso de una tinción que permita la diferenciación de los quistes incluso a pequeño aumento, como la plata metenamina, o el azul de toluidina, junto con otra tinción policrómica, como el Giemsa o el Gram, que permita la distinción de las formas tróficas características de *Pneumocystis* (Dei-Cas, et al., 2005).

Respecto a las tinciones inmunofluorescentes, suelen utilizar anticuerpos monoclonales, marcados con una molécula fluorescente, frente a antígenos de la pared y de la superficie de *Pneumocystis*.

b. Microscopía Electrónica. Ultraestructura.

Los estudios mediante microscopía electrónica han permitido conocer la ultraestructura de cada una de las diferentes formas del ciclo biológico de *Pneumocystis* (Walzer, 2006).

Las formas tróficas, o trofozoítos, y los esporocitos jóvenes, son los estadios vegetativos del ciclo biológico. El **trofozoíto** tiene una delgada pared celular, con una membrana externa y otra interna, separadas por un espacio intermembranoso. Es característico en esta fase el encontrar filopodios, o prolongaciones digitiformes, de la pared celular (**Figura 5**). Su forma es irregular o amebode, con un núcleo con cromatina difusa, un nucleolo, cisternas perinucleares que comunican con el retículo endoplasmático, y una sola mitocondria. En el **prequiste, o esporocito**, la pared celular se engruesa por la aparición de una membrana intermedia, y la mitocondria se convierte en una organela más compleja. En la fase de **quiste maduro, o caja de esporas**, presenta una porción de la membrana más gruesa que se invagina hacia el interior, es lo que se denomina estructura “en paréntesis” en la tinción del quiste con plata metenamina de Gomori, y que se ha relacionado con el fenómeno de esquistación, o liberación de esporas, ya que existen orificios en algunas secciones de esta estructura. En el interior del quiste se diferencian la matriz y hasta ocho **cuerpos intraquísticos o esporas** (**Figura 6**). La matriz contiene una mitocondria, ribosomas, vacuolas vacías y restos de membrana. Las esporas poseen, como el quiste, una doble membrana, de similar grosor, y un núcleo. Pueden presentar tres formas, esféricas, en banana, o irregulares, según su sea contenido.

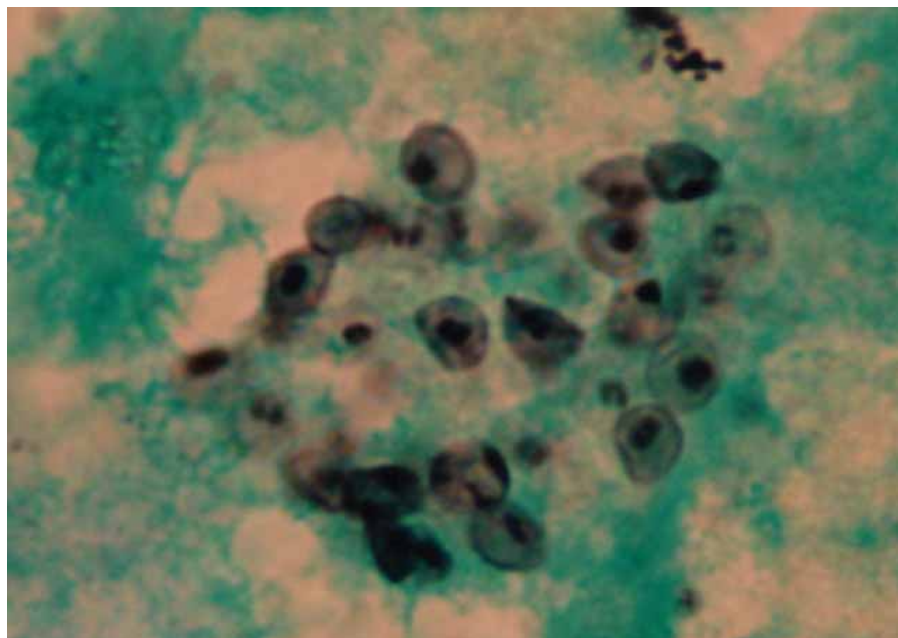
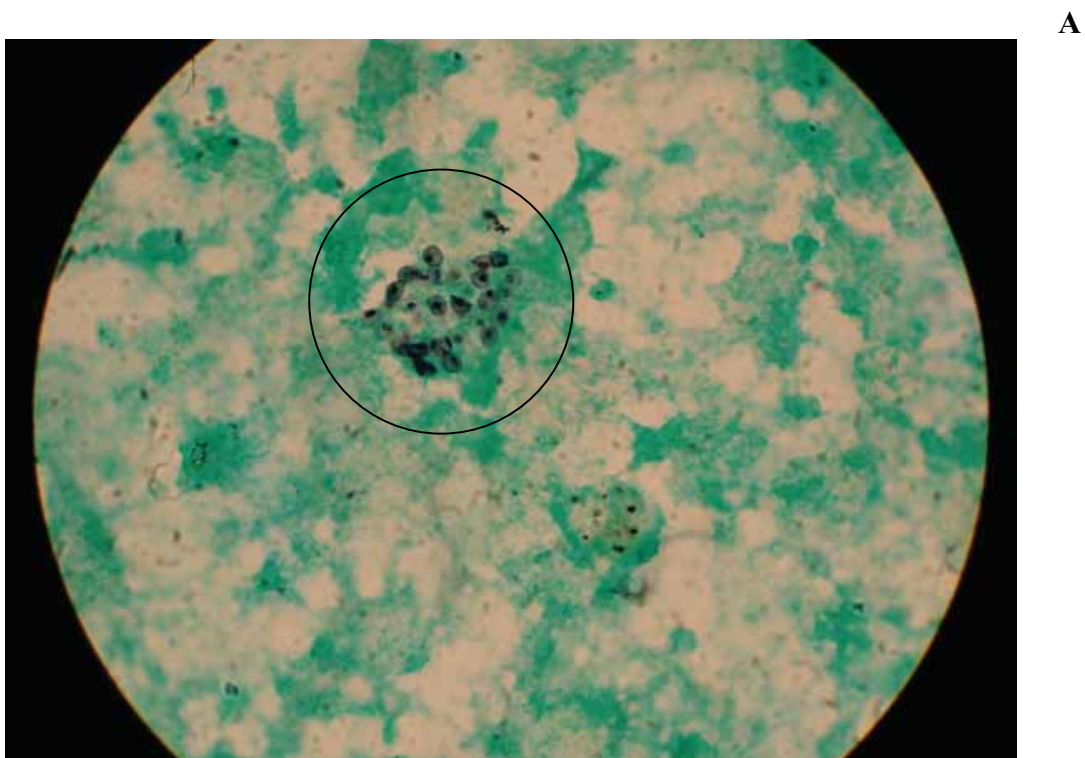
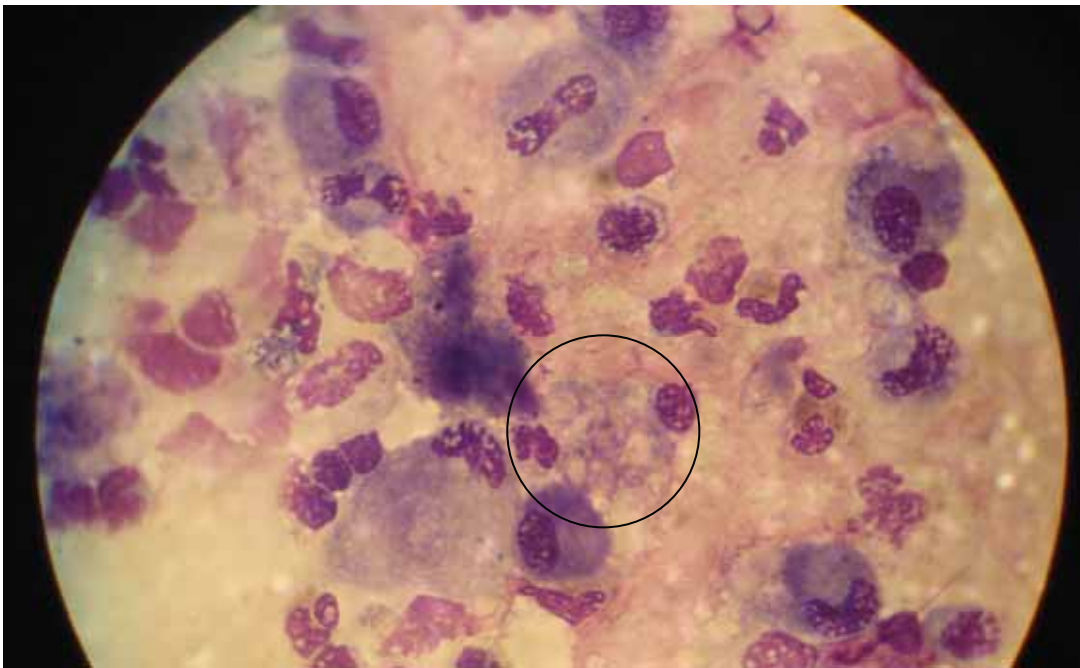


Figura 2. Microscopía óptica
Quistes o Ascus de *Pneumocystis jirovecii* tinción de **Plata Metenamina de Gomori.**
(A- Imagen a 100X; B- Detalle ampliado de imagen anterior)
Cortesía Dr. Jordi Mas

A



B

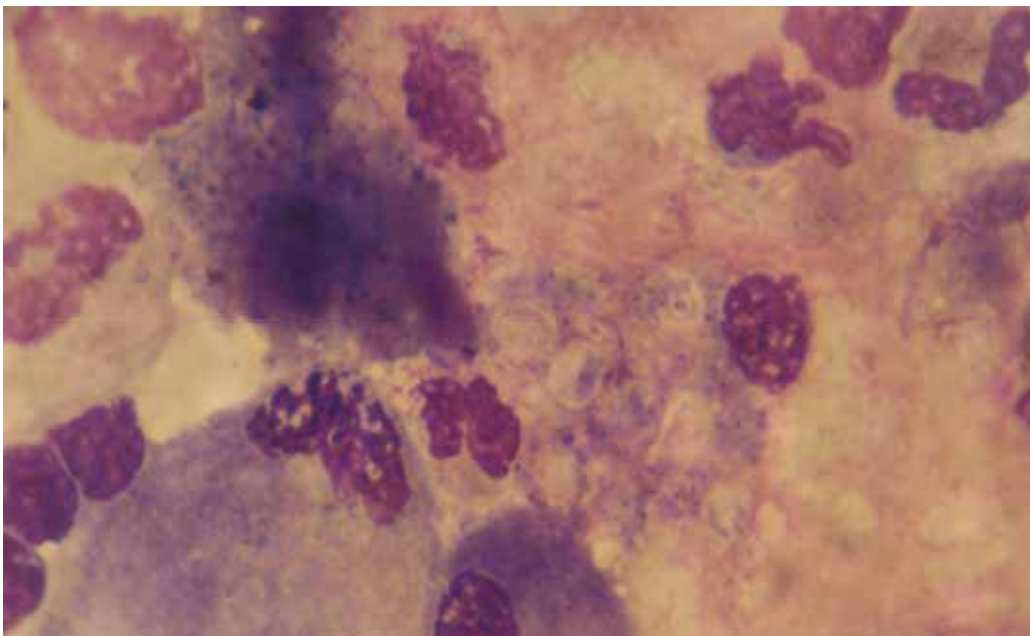


Figura 3. Microscopía óptica.
Quistes o Ascus de *Pneumocystis jirovecii* tinción de **Giemsa**.
(A- Imagen a 100X; B- Detalle ampliado de imagen anterior)
Cortesía Dr. Jordi Mas

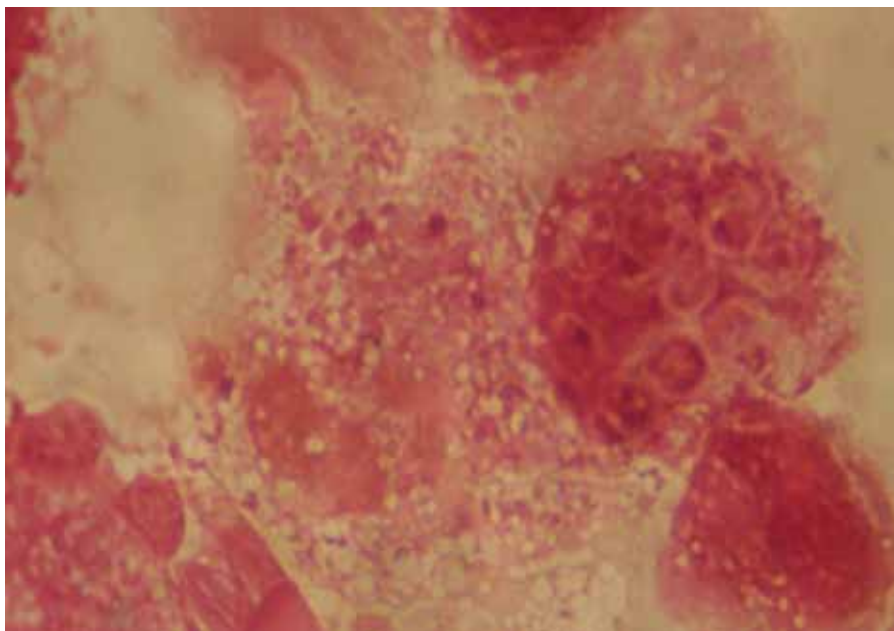
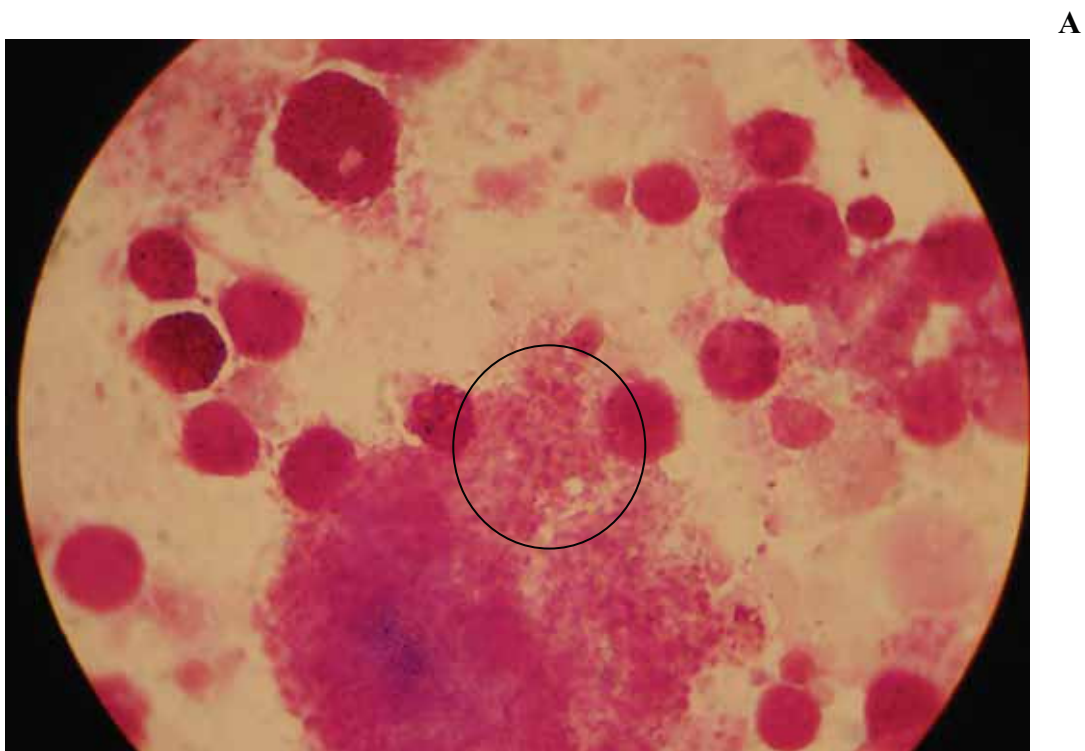


Figura 4. Microscopía óptica.
Quistes o Ascus de *Pneumocystis jirovecii*, tinción de **Gram**.
(A- Imagen a 100X; B- Detalle ampliado de imagen anterior)
Cortesía Dr. Jordi Mas

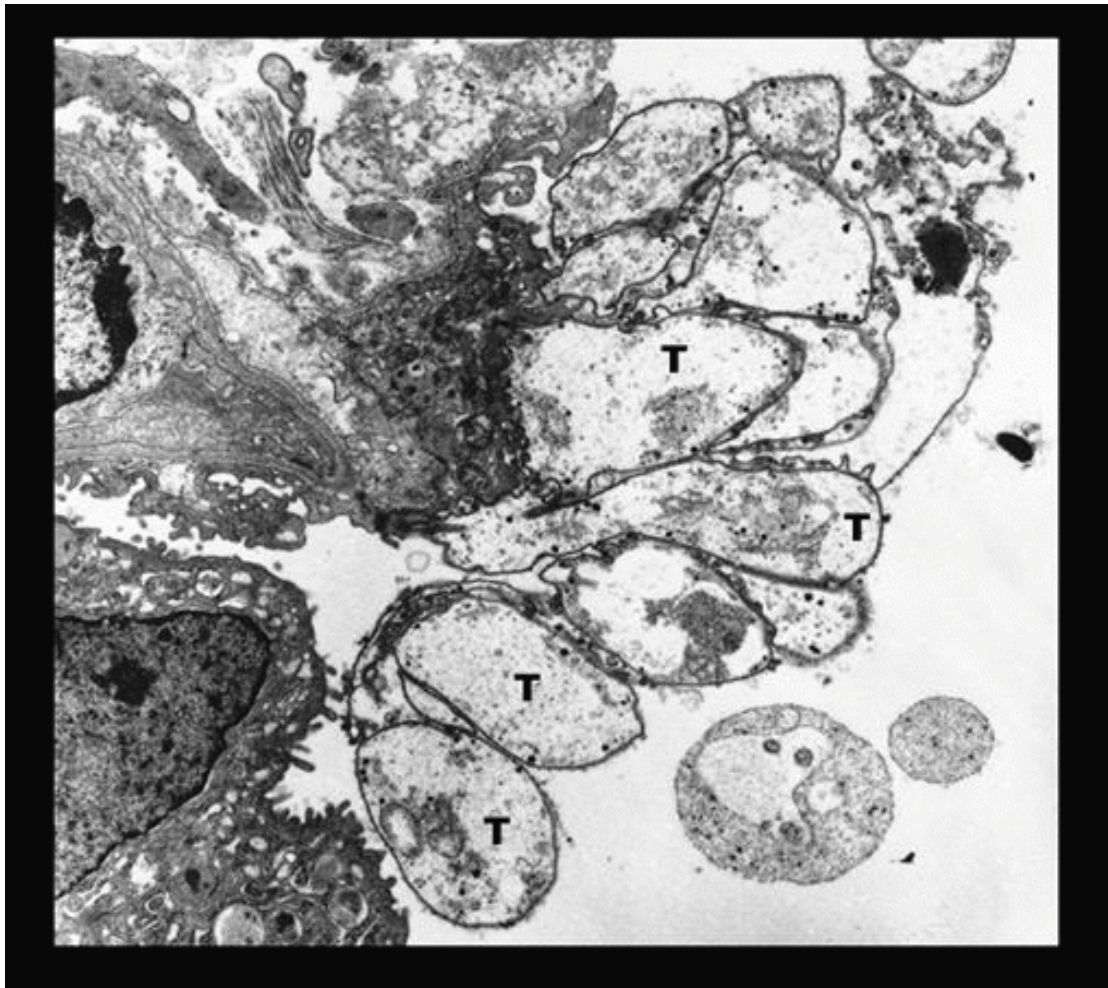


Figura 5. Microscopía Electrónica
Trofozoítos o Formas tróficas (T) de *Pneumocystis jirovecii*
adheridos a células alveolares mediante filopodios (1040X)
Tomada de www.pathologyimagesinc.com



Figura 6. Microscopía Electrónica
Quiete o Ascus (C) de *Pneumocystis jirovecii* con 6 **cuerpos intraquisticos o esporas**
en su interior. **Trofozoíto o Foma trófica (T)** adyacente (1600X).
Tomada de www.pathologyimagesinc.com

1.4. Transmisión y Epidemiología.

1.4.1. Modo de Transmisión.

La transmisión de *Pneumocystis* se produce por vía respiratoria. No se ha observado transmisión a través del agua, ni de alimentos. En el modelo animal de la rata se ha demostrado que la infección se adquiere tras un solo día de contacto con otro animal infectado (Walzer et al., 1977; Hughes et al., 1982). Considerando la forma de diseminación del bacilo tuberculoso, como modelo de transmisión de *Pneumocystis*, el individuo afecto eliminaría partículas infectivas a través de la vía respiratoria (tos, estornudos) al medio ambiente. Estas partículas, como pequeñas gotas, quedarían suspendidas en el aire durante largo periodo de tiempo, y aprovecharían las corrientes de aire, o térmicas, para pasar a un nuevo huésped.

1.4.2. Origen de la Infección.

La cuestión del origen de la infección está todavía sin resolver, después de casi 100 años del descubrimiento de *Pneumocystis*. Diversas teorías apoyan las hipótesis de la adquisición activa, frente a la de la latencia y posterior reactivación.

a. Presencia en Neonatos.

Estudios serológicos han demostrado que el *Pneumocystis* se adquiere en la más tierna infancia, aunque, el momento exacto de la adquisición no ha sido determinado (Stagno, et al., 1980; Cushion, 2000). Se ha sugerido que la madre podría ser la fuente de la infección. El modelo animal ha mostrado que la infección se adquiere casi inmediatamente después del nacimiento, pero sin que exista transmisión transplacentaria (Miller et al., 2002).

Las primeras descripciones que se hicieron de la neumonía por *Pneumocystis* fueron como una enfermedad que afectaba a lactantes desnutridos y prematuros. Quizá los lactantes sean el huésped natural para la enfermedad, y se colonicen en los primeros meses de vida, a medida que disminuyen los anticuerpos maternos. Es probable que esta infección primaria sea asintomática, aunque no se ha efectuado un análisis cuidadoso para determinar si se producen manifestaciones clínicas sutiles. Esta teoría se apoya en los estudios que determinan el hallazgo del propio microorganismo, o de su ADN, en las muestras clínicas, o de necropsias, obtenidas de lactantes. También se han realizado observaciones similares en el modelo del conejo, donde los animales jóvenes servían como el principal huésped dispersor del agente.

Estudios serológicos han demostrado que *Pneumocystis* tiene una distribución mundial, pero con diferencias en la prevalencia de anticuerpos, frente a antígenos específicos, entre las distintas regiones geográficas (Smulian, 1997). Se postulaba que la frecuencia de neumonía por *Pneumocystis* entre los pacientes infectados por el VIH en los países tropicales, y en vías de desarrollo, era mucho menor que en las naciones industrializadas, aunque estudios recientes sugieren que esto puede reflejar el infradiagnóstico de la infección por carencia de los medios adecuados en los países pobres (Russian & Kovacs, 1995). Bajo estas condiciones, la infección por *Pneumocystis* suele aparecer unida a infecciones más virulentas, como la tuberculosis. Las características demográficas de los pacientes con PCP suelen reflejar aquellas de la enfermedad subyacente. La neumonía por *Pneumocystis* también se ha reconocido con mayor frecuencia en lactantes africanos infectados por el VIH (Fisk, et al, 2003). Se ha publicado que el *Pneumocystis* puede detectarse hasta en el 80% de los lactantes con infección conocida, o sospechada por el VIH, que presentan una neumonía grave. Los intentos de comparar la frecuencia de la PcP entre los distintos grupos étnicos y raciales se han visto complicados por factores sociales y culturales (Hu et al., 1995).

b. Presencia en Adultos. ¿Adquisición Activa o Latencia y Reactivación?

El estudio en modelo animal ha demostrado que *Pneumocystis* es transmisible, y que el modo principal de transmisión es la dispersión aérea, sin embargo, se desconoce la forma infectiva de microorganismo (Wakefield, 2002; Stringer et al., 2002). Se discute cuánto tiempo permanece el patógeno en el huésped una vez que se ha adquirido la infección.

Una corriente de opinión (Walzer & Smulian, 2006) sostiene que el organismo se incorpora a la flora microbiana comensal del huésped y permanece inactivo durante periodos prolongados de tiempo. A medida que las defensas inmunitarias se deterioran, el microorganismo produce la enfermedad mediante la reactivación de una infección latente. Esta teoría se apoya por la presencia de la misma cepa genética de *Pneumocystis* en las colonias de animales durante varios años, por la especificidad de huésped que tiene *Pneumocystis*, (lo que implica la coevolución del huésped y del microorganismo), y por la variación antigénica de la proteína MSG (*major surface glucoprotein*).

La otra hipótesis (Walzer & Smulian, 2006) es que la infección por *Pneumocystis* sea transitoria, aunque la población esté expuesta con frecuencia a fuentes del microorganismo a lo largo de su vida. Un punto de apoyo para esta hipótesis proviene de la duración limitada de la situación de portador en recientes estudios del modelo animal. Los ratones adultos sanos inoculados con *Pneumocystis* aclaran la infección pulmonar en poco tiempo. Este proceso tarda un poco más en neonatos. Los animales inmunodeprimidos aclaran el microorganismo después de que se haya normalizado la función inmunitaria.

Los enfoques epidemiológico moleculares han aportado una nueva luz sobre la historia natural y la epidemiología de la infección por *Pneumocystis* (Wakefield, 2002; Stringer et al., 2002). Aunque se han examinado varias dianas moleculares, la mayor parte de la información se ha obtenido de las regiones del espaciador interno de transcripción (ITS) del gen del ARNr, de la subunidad mayor mitocondrial y de la secuencia génica de la dihidropteroato sintetasa (DHPS). Los datos indican que los microorganismos aislados de los pacientes con el VIH son similares aquellos obtenidos de los pacientes no infectados por este virus, y que los pacientes pueden portar más de una cepa del microorganismo. Tres líneas de evidencia apoyan la hipótesis de que en el ser humano se produce la transmisión activa de *Pneumocystis*. Se ha descrito que los pacientes con SIDA y con episodios recurrentes de pneumocystosis poseían genotipos de *Pneumocystis* que diferían de los observados en los episodios previos (Keely et al., 1996). Un segundo estudio evidenció la variación geográfica de los genotipos de *Pneumocystis* obtenidos de pacientes con PCP en diferentes ciudades estadounidenses (Beard et al., 2000), y se encontró, que los genotipos en el momento del episodio de neumonía por *Pneumocystis* reflejaban el lugar del diagnóstico del paciente, y no su lugar de nacimiento, lo que sugería infecciones de reciente adquisición, más que una infección latente reactivada. Un tercer estudio (Huang et al., 2000) observó que el 53% de los pacientes, con pneumocystosis como criterio de SIDA, presentaba genotipos mutantes de DHPS. Dado que estos pacientes no habían recibido tratamiento profiláctico con sulfamidas, los genotipos mutantes no podían haber resultado de la selección, sino más bien de la adquisición de una cepa mutante de *Pneumocystis*. Estos datos sugieren con fuerza que *Pneumocystis* se transmite de forma interpersonal directa, y que la mayoría de episodios de pneumocystosis en los adultos son el resultado de la **adquisición activa más que de una latencia y reactivación.**

La fuente de exposición para los neonatos, así como para los adultos, tal vez la constituyan otras personas con PcP activa, o con colonización subclínica transitoria. Con la aparición del SIDA, los pacientes infectados por el VIH han proporcionado una fuente de exposición adicional. En la era previa al VIH, la prevalencia necrópsica de la infección latente por *Pneumocystis*, en los pacientes inmunodeprimidos, variaba del 0 al 8%. La frecuencia de pneumocystosis en algunos centros se relacionaba con el tipo, o intensidad, del tratamiento inmunosupresor (Walzer et al., 1989). La infección subclínica por *Pneumocystis* se ha detectado, mediante PCR, en pacientes con VIH, meses antes de que se desarrollara la clínica. Otra prueba que sustenta esta idea es la aparición de brotes epidémicos de PcP en orfanatos, hospitales, y en pacientes inmunodeprimidos que haya estado en contacto prolongado entre sí. Además se ha documentado la agrupación geográfica de pneumocystosis en dos ciudades estadounidenses (Dohn et al., 2000; Morris et al., 2000). Sin embargo, en estudios realizados para detectar una infección subclínica en los pacientes inmunocompetentes, y en trabajadores sanitarios, han mostrado resultados contradictorios, atribuibles, quizá, a diferencias en el tamaño muestral. Diversos estudios han demostrado la presencia de microorganismos en pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva y otras neuropatías estructurales, aunque se desconoce si este hallazgo representa una colonización o una infección transitoria (Walzer & Smulian, 2006).

2. MECANISMOS DE PATOGENICIDAD.

DEFENSA E INTERACCIÓN CON EL HUÉSPED.

2.1. Mecanismos de Patogenicidad.

2.1.1. Establecimiento de la Infección.

La puerta de entrada de *Pneumocystis* en el organismo es la vía respiratoria. La exposición al microorganismo ocurre en la edad temprana de la vida. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que a los 2 ó 3 años de edad el 80% de la población posee anticuerpos frente a *Pneumocystis* (Meuwissen et al., 1977; Pifer et al., 1978; Peglow et al., 1990).

Tras la inhalación de *Pneumocystis*, el microorganismo escapa de las defensas de las vías respiratorias superiores y se deposita en los alveolos. La forma trófica se adhiere de modo preferente a la célula alveolar de tipo I, gracias a la ayuda de glucoproteínas como la vitronectina y fibronectina. Se cree que mediante este fenómeno se inicia la infección (Walzer et al., 1989). El análisis ultraestructural ha demostrado que la adhesión se caracteriza por una íntima aposición de las superficies celulares, sin fusión de las membranas, ni cambios en las partículas intramembranas.

La adhesión de *Pneumocystis* a las células epiteliales pulmonares requiere un citoesqueleto intacto y produce cambios tanto en el microorganismo como en el huésped. Dicha adhesión está mediada por:

a) Proteínas adhesinas. Una gran variedad de proteínas adhesinas celulares han sido caracterizadas. La más abundante y mejor estudiada es la fibronectina (Fn) de la matriz extracelular. La fibronectina es una molécula glicosilada de 500-kDa presente en el organismo, en forma libre o, asociada a una gran variedad de células, como células epiteliales, endoteliales, macrófagos, linfocitos y neutrófilos, a las que se une mediante unos receptores específicos de la superficie celular denominados integrinas (Ruoslahti & Pieschbacher, 1987). Actúa como un puente de unión entre la glucoproteína 120 (gp120), el principal antígeno de superficie de *Pneumocystis*, y las integrinas que se encuentran en la superficie de las células del epitelio alveolar. La amplia distribución de la fibronectina, y de sus receptores específicos, la convierten en una excelente facilitadora de los mecanismos de adherencia del patógeno.

b) Lecitinas. Son proteínas que reconocen subunidades sacáridas en la superficie de las células del huésped, a las que se unen específicamente, facilitando la adhesión de *Pneumocystis* (Nicholson, 1974).

c) Manosa. Se une a los receptores de fibronectina, permitiendo que *Pneumocystis* interactúe con los macrófagos alveolares (Stahl et al., 1978).

Se desconoce el inóculo de *Pneumocystis* necesario para infectar, y cuánto tiempo permanece el patógeno, en el huésped, una vez que se ha adquirido la infección.

Una corriente de opinión sostiene que el microorganismo se incorpora a la flora microbiana comensal del huésped y permanece inactivo durante largos periodos de tiempo (Walzer, 1991). A medida que las defensas inmunitarias se deterioran, se reactiva la infección latente produciendo la enfermedad. Esta teoría se apoya por la presencia de la misma cepa genética de *Pneumocystis* en las colonias de animales durante varios años, por la especificidad de huésped que tiene *Pneumocystis*, (lo que implica la coevolución del huésped y del microorganismo) y por la capacidad de la proteína MSG (*major surface glucoprotein*) para la variación antigénica.

La otra hipótesis es que la infección por *Pneumocystis* sea transitoria, aunque la población esté expuesta con frecuencia a fuentes del microorganismo a lo largo de su vida (Walzer, 1991). Un punto de apoyo para esta hipótesis proviene de la duración limitada de la situación de portador en recientes estudios de modelos animales. Los ratones adultos sanos inoculados con *Pneumocystis* aclaran la infección pulmonar en poco tiempo. Este proceso tarda un poco más en neonatos. Los animales inmunodeprimidos aclaran el microorganismo después de que se haya normalizado la función inmunitaria.

2.1.2. Proliferación del Microorganismo.

La proliferación de *Pneumocystis* en el huésped ha sido estudiada en el modelo animal. Tras la administración de corticoides durante 8 semanas, en ratas de laboratorio, se produce una PcP indistinguible histopatológicamente a la del hombre. Mediante MO se cuantifica el desarrollo del microorganismo en los pulmones de las ratas (Walzer et al., 1980; Kim et al., 1987). Se utiliza un sistema semicuantitativo en secciones de pulmón teñidas con plata metenamina, basado en el grado de afectación alveolar. La escala va de 0, ó negativo, (sin afectación alveolar), a 2 +, ó moderado, (afectación del 25 a 50% de los alveolos), hasta 4 (++++), muy severo, (afectación de más del 75% de los alveolos). En los animales examinados antes de la administración de los corticoides la presencia de *Pneumocystis* suele ser indetectable. Después de 1 ó 2 semanas, pequeñas agrupaciones de *Pneumocystis* se detectan a lo largo de los septos alveolares, en diversas localizaciones, sugiriendo que la infección es multifocal en origen.

En las semanas progresivas, el microorganismo continúa su multiplicación hasta llenar gradualmente la luz de los alveolos. El incremento va desde $\leq 10^5$ quistes por pulmón, al inicio de la inmunosupresión, hasta 10^8 - 10^9 quistes, por pulmón, en el pico de la infección.

Aunque los estudios de proliferación en ratas son muy consistentes, existe una variación en el número de microorganismos, en el pico de la infección, y el tiempo requerido en cada rata. Pudiendo estar influenciados por el método por el que se establece la infección, la preparación de los corticoides, la dieta, y la flora microbiana asociada.

2.1.3. Cambios en el Alveolo.

El desarrollo de la pneumocystosis va acompañado de cambios anatómicos, fisiológicos y bioquímicos en el huésped, aunque es difícil establecer la definitiva relación causa-efecto. Se discute si *Pneumocystis* es invasivo, a pesar de que tiene una fase de desarrollo intracelular en su ciclo, o si son los factores citotóxicos los causantes de la enfermedad. El modelo animal en ratas ha permitido el estudio de estos cambios.

a. Cambios Anatómicos.

El principal hallazgo en las secciones de pulmón de las ratas tratadas con corticoides es un exudado alveolar espumoso que se desarrolla con la replicación de *Pneumocystis*. Está compuesto por el microorganismo, membranas celulares degeneradas, surfactante y proteínas del huésped (Yoneda & Walzer, 1983). Los macrófagos alveolares están presentes, pero no son visibles. El septo alveolar se engrosa, con hipertrofia e hiperplasia de las células de tipo II, existe edema intersticial, y moderado infiltrado de células mononucleares.

El estudio detallado con ME demuestra un incremento de la permeabilidad alveolo-capilar, seguida de cambios degenerativos en el neumocito tipo I, y denudación de la membrana basal, donde se depositan los fluidos séricos y proteínas, como la fibrina, que formarán el citado exudado espumoso. Como respuesta reparadora al daño alveolar, se produce una hipertrofia de los neumocitos tipo II, que se diferenciarán hacia neumocitos tipo I (Yoneda & Walzer, 1981).

b. Cambios Fisiológicos y Bioquímicos.

El estudio de las alteraciones fisiológicas y bioquímicas, que tienen lugar en el pulmón de la rata (modelo animal), ha demostrado que el surfactante juega el papel más importante en la patogénesis de la enfermedad (Eijking et al., 1991).

El surfactante es una mezcla heterogénea de fosfolípidos y proteínas secretada por el epitelio pulmonar, que reduce la tensión de la interfase aire-líquido, y permite el mantenimiento de la estabilidad pulmonar. Las proteínas del surfactante se dividen en dos grupos, las proteínas B y C (SP-B y SP-C), que son lipofílicas, y están implicadas en el aumento de la absorción de fosfolípidos en la interfase aire-líquido; y las proteínas A y D (SP-A y SP-D), también llamadas colectinas, que son hidrofílicas y participan en la inmunidad innata pulmonar. El principal hallazgo de estos estudios es la alteración en el intercambio gaseoso junto con una modificación en la composición del surfactante (Sheehan, 1986). El desarrollo de los acontecimientos sería el siguiente, con la adhesión de *Pneumocystis* a las células del epitelio alveolar, fundamentalmente a las de tipo I, se establece la infección y se inicia el daño celular. Se producen mediadores de la inflamación, disminuyen los fosfolípidos del surfactante y se incrementan los niveles de la proteína A (SP-A) y proteína D (SP-D), generadas por los neumocitos tipo II y las células clara. Se inicia la respuesta de los linfocitos T, mediante la vía Th1 y Th2, y como resultado se secretan IFN- γ (Th1) e IL-4 (Th2). La SP-A se une a los residuos de manosa de la gp-120 de *Pneumocystis*, aumentando la interacción del microorganismo con el epitelio alveolar. De este modo se estimula la producción de citocinas por los macrófagos alveolares, incluido el FNT- α , favoreciendo la fagocitosis de *Pneumocystis*. Sin embargo, la SP-D crea unos agregados de *Pneumocystis* que dificultan la internalización del microorganismo por los macrófagos. El resultado de todo este proceso, en un paciente inmunocompetente, es la eliminación de *Pneumocystis* gracias al balance pro y anti inflamatorio de SP-A y SP-D, así como a la acción de los macrófagos y linfocitos. Sin embargo, en pacientes inmunocomprometidos, la inmunidad innata debida exclusivamente a las colectinas es insuficiente.

Como síntesis de los cambios que acontecen en el transcurso de la PcP, se produce una alteración del intercambio gaseoso, y un exudado alveolar espumoso. Sin tratamiento, aparece hipoxemia, incremento del gradiente alveolo-arterial y alcalosis, progresión hacia la insuficiencia respiratoria, y muerte por el daño pulmonar severo. Los hechos son resultado de los siguientes mecanismos, la lenta propagación de *Pneumocystis*, que llena los alveolos de masas de microorganismo; la adhesión de *Pneumocystis* a los neumocitos tipo I, que incrementa la permeabilidad alveolo-capilar y lesiona dichas células; la deficiencia de los fosfolípidos del surfactante, que provoca cambios en la tensión de la superficie alveolar, distensión pulmonar y anormalidades en la ventilación-perfusión.

2.2. Defensa e Interacción con el Huésped.

2.2.1. Interacción de *Pneumocystis* con los Macrófagos Alveolares y las Células del Epitelio Alveolar.

Pneumocystis interactúa con una gran variedad de células del tracto respiratorio inferior, como linfocitos, células *natural killer* (NK), macrófagos alveolares, neutrófilos y células del epitelio alveolar.

Los **macrófagos** representan las principales células fagocíticas del tracto respiratorio inferior. Actúan como frente celular que reconoce los microorganismos invasores, iniciando la respuesta inflamatoria y el aclaramiento de la infección. El mecanismo exacto por el que los macrófagos reconocen, e internalizan al *Pneumocystis*, es complejo e implica a diversos receptores, principalmente es mediado por los receptores de manosa de los macrófagos que reconocen el complejo mayor de glicoproteínas (gpA) de *Pneumocystis*, así mismo los macrófagos reconocen los β -glucanos del microorganismo. Diversas proteínas del huésped como las inmunoglobinas, la vitronectina, la fibronectina y proteínas del surfactante se unirán estrechamente al *Pneumocystis* facilitando la acción de los macrófagos alveolares. Una vez que los macrófagos contactan con el hongo, lo internalizan formando fagolisosomas, y posteriormente lo degradan mediante la liberación de citocinas, tales como el factor de necrosis tumoral α (FNT- α), los eicosanoides y los oxidantes reactivos.

Durante el curso de la neumonía por *Pneumocystis* la gran variedad de mediadores de la inflamación que son generados por los macrófagos, a pesar de que son necesarios para la eliminación del microorganismo, también pueden causar daño pulmonar en el huésped, predisponiendo a la aparición de edema alveolar y fallo respiratorio. Un exceso de FNT- α , IL-1 e IL-8 incrementa la permeabilidad endotelial, favorece el edema alveolar y promueve el infiltrado neutrofílico de los pulmones. El exceso de los neutrófilos se ha correlacionado con una peor evolución y un aumento de la mortalidad por PcP. Esta teoría se sustenta con la observación clínica de que la PcP severa responde favorablemente a la administración de antiinflamatorios, como los corticoides, junto a los antimicrobianos.

La función del macrófago alveolar está alterada en los pacientes con VIH, así como en aquellos con cáncer, y transplantados, que reciben fármacos inmunosupresores. El VIH disminuye la expresión del receptor de manosa, lo que provoca una disminución de la unión y captación de *Pneumocystis* (Kandil et al., 1994; Koziel et al., 1998).

Además el VIH modifica la respuesta de las citocinas del macrófago. El propio *Pneumocystis* afecta a la fagocitosis al estimular la pérdida del receptor de la manosa, mientras que la administración de una inmunoadhesina soluble para la manosa contrarresta este proceso.

2.2.2. El papel de la Inmunidad Humoral y Celular. Aspectos Inmunológicos de la Infección en Humanos.

Los defectos de la inmunidad del huésped que provocan una replicación descontrolada de *Pneumocystis* y, por tanto, el desarrollo de PcP, son complejos y sólo se comprenden en parte. La alteración de la inmunidad humoral es un factor predisponente para la pneumocystosis. Estudios serológicos en la población han determinado que la mayoría de individuos presentan anticuerpos frente a *Pneumocystis* y que la seroprevalencia aumenta con la edad. Sin embargo, sólo en casos de inmunodepresión se manifiesta la enfermedad. Aunque el factor protector de la inmunidad humoral ha sido discutido, hay descritos episodios de PcP en pacientes con agammaglobulinemia, inmunodeficiencia severa combinada e hipogammaglobulinemia.

Hay documentados casos de neumonía por *Pneumocystis* en pacientes y ratones con defectos de los linfocitos B (Walzer, 1999-a). Se ha encontrado un efecto terapéutico positivo en la administración pasiva de suero hiperinmunitario, o de anticuerpos monoclonales, frente a la glucoproteína principal de superficie, MSG (major surface glycoprotein), y a otros antígenos en modelos experimentales de pneumocystosis (Gigliotti, et al., 1988 & 2002; Dohn et al., 2000). La inmunización con *Pneumocystis* vivos protege a los ratones con linforreducción T contra la agresión del microorganismo y está mediada por anticuerpos que pueden producirse a partir de respuestas del tipo Th1 o Th2 (Harmsen et al., 1995; Zheng et al., 2001; Garvy et al., 1997). Los anticuerpos contribuyen a las defensas del huésped contra *Pneumocystis* al actuar como opsoninas (Walzer, 1999). A diferencia de los estudios que emplean modelos animales, el análisis de la función de los anticuerpos en el ser humano se ha complicado por la alta prevalencia de anticuerpos séricos contra *Pneumocystis* en la población, y por falta de información acerca de qué epítomos antigénicos son protectores. Los estudios serológicos de los pacientes con VIH han demostrado diversidad de respuestas, que varían entre una disminución de las concentraciones séricas de anticuerpos, antes de un periodo de pneumocystosis, hasta el desarrollo de una intensa respuesta de anticuerpos tras la recuperación (Peglow et al., 1990; Elvin et al., 1994; Lauser et al., 1998; Lundgren et al., 1992).

Los fragmentos antigénicos recombinantes de MSG, de *Pneumocystis* humano, desarrollados recientemente ofrecen una nueva herramienta para estudiar la respuesta de anticuerpos frente al microorganismo, en diferentes situaciones clínicas e inmunológicas. El fragmento carboxilo terminal se reconoce, con una frecuencia mucho mayor, en pacientes con infección por VIH que habían presentado un episodio previo de pneumocystosis documentada, que en aquellos que nunca tuvieron la enfermedad (Daly, 2002 & 2004).

La alteración de la inmunidad celular se considera un importante factor predisponente en el desarrollo de la pneumocystosis (Walzer et al., 1989).

Se han producido brotes epidémicos espontáneos de neumonía por *Pneumocystis* en animales inmunodeficientes. El papel central de los linfocitos CD4 en la defensas del huésped contra el microorganismo se ha demostrado mediante experimentos de reducción, y reconstitución linfocítica, y con ratones defectivos (Theus et al., 1998; Harmsen et al, 1990; Shellito et al., 1990). La interacción de los linfocitos T, con los de tipo B, y con otras células, mediante la vía del CD40 a CD40L, es relevante (Wiley et al., 1995; Levy et al., 1997). Los linfocitos de los tipos CD8 y T $\gamma\delta$ también contribuyen con las defensas del huésped contra *Pneumocystis*, aunque sus funciones específicas son complejas y en parte incomprendidas (Theus et al., 1995; Beck et al., 1996; Kolls et al., 1999; Steele et al., 2002). Se puede producir una pneumocystosis en roedores sanos mediante la administración de corticoides, por lo que estos modelos se han empleado durante más de tres décadas (Walzer et al., 1989). La desnutrición proteica y un sistema inmunitario inmaduro también merman las defensas del huésped con *Pneumocystis*, aunque el defecto en los ratones neonatos se relaciona más con los linfocitos T (Garvy et al., 2000; Qureshi et al., 2001)

La evidencia más clara sobre el papel del defecto de la inmunidad mediada por linfocitos T, en el desarrollo de la pneumocystosis en el ser humano, procede de personas infectadas con el VIH. La depleción de linfocitos T CD4⁺ es característica de la infección por VIH y, el riesgo de desarrollar una PcP en adultos con VIH se incrementa, en gran medida, cuando el recuento de linfocitos CD4 circulantes disminuye de 200 cel/mm³ (Phair et al., 1990).

La presencia de otras complicaciones clínicas del VIH, como la fiebre y la candidiasis oral, incrementa el riesgo de pneumocystosis con independencia de dicho recuento. Se han encontrado casos de pneumocystosis en pacientes oncológicos que recibían agentes citotóxicos, en adultos con linfopenia CD4 idiopática, y en personas sanas con defectos sutiles de los linfocitos T (Smith et al., 1993; Kulke et al., 1997).

Es conocido que la disminución del recuento de linfocitos CD4 es un factor de riesgo para la neumonía por *Pneumocystis* en pacientes inmunodeprimidos (Mansharamani et al., 2000). Algunos estudios han hallado correlación entre el número de linfocitos CD4 en la sangre periférica, o en el lavado broncoalveolar, con un pronóstico sombrío (Agostini et al., 1997).

La interacción del VIH, y de *Pneumocystis*, con los linfocitos CD4, y con otros de estirpe T, en el hombre, tiene un interés considerable. Se ha publicado que el VIH consume de forma horizontal los clones de linfocitos T específicos de *Pneumocystis*, esto es, mediante la disminución del número de células memoria en la descendencia, sin afectar al número de clones (Li Pira et al., 2002). Por otra parte, la infección por *Pneumocystis* potencia la replicación pulmonar del VIH, y quizá puede acentuar el consumo de linfocitos CD4 (Koziel et al., 1999). Los linfocitos CD8, que pueden infectarse por el VIH, aumentan en el LBA de los pacientes con VIH y pneumocystosis, aunque se desconoce el significado patogénico de este acúmulo (Semenzato et al., 1995).

Los estudios de la función inmunitaria celular han demostrado que los pacientes con VIH muestran un descenso de la respuesta linfocitaria proliferativa en la sangre periférica frente a *Pneumocystis* completo, o a la MSG, con progresión de la enfermedad y una disminución del número de linfocitos CD4 (Theus et al., 1998-b). Se produce un descenso parecido en la respuesta de citocina de tipo Th1 (IFN- α), aunque no en la de citocina de tipo Th2 (IL-4). Los pacientes que se han recuperado de una pneumocystosis exhiben una mayor respuesta proliferativa, y de IL-4, ante la MSG, que los pacientes con VIH en un estadio similar de infección y que no hayan tenido pneumocystosis. Por lo tanto, los pacientes con *Pneumocystis* conservan las suficientes células CD4 memoria como para reconocer al microorganismo, aunque muestran una variación de una respuesta Th1, a una de tipo Th2, con la progresión del VIH.

La aparición de pneumocystosis en otras poblaciones de pacientes con una alteración de la inmunidad celular ha afectado a lactantes prematuros, a niños con inmunodeficiencias primarias (Levy et al., 1997), así como a los pacientes que reciben fármacos inmunosupresores (Walzer et al., 1989). Los principales huéspedes inmunocomprometidos en situación de riesgo para padecer pneumocystosis son aquellos con neoplasias hematológicas malignas y tumores sólidos, los receptores de transplantes de órganos sólidos y de médula ósea, así como las colagenosis vasculares, como la granulomatosis de Wegener (Kulke et al., 1997; Sepkowitz et al., 1995; Yale et al., 1996; Godeau et al., 1994).

La cantidad de estos pacientes ha aumentado a lo largo de los años debido a la mejora de la supervivencia, y al empleo más extendido de los tratamientos citotóxicos e inmunosupresores. Los corticoides, ya sea en monoterapia o combinados con otras medicaciones, son los fármacos inmunosupresores implicados con más frecuencia en el desarrollo de pneumocystosis. Se han descrito casos en pacientes con Cushing y en niños que reciben corticoides como tratamiento del asma (*Graham & Tucker, 1984; Abernathy-Carver et al., 1994*). La desnutrición proteica (*Hughes et al., 1974*) es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de PcP, tanto por sí misma, como por la complicación de la enfermedad subyacente a la quimioterapia.

3. INFECCIÓN EN EL HOMBRE

3.1. Presentación Clínica y Diagnóstico de la Neumonía por *Pneumocystis* (PcP) en Pacientes VIH-positivos en Países Desarrollados.

3.1.1. Incidencia.

La epidemia de VIH/SIDA afecta en la actualidad a 42 millones de personas. La incidencia de PcP ha disminuido drásticamente en EUA y Europa occidental gracias a la terapia antiretroviral combinada (c-ART) y la profilaxis frente a *Pneumocystis*. Sin embargo, está aumentando en África, Asia y América Latina, donde más del 90% de la población estimada con VIH/SIDA vive en zonas con dificultad para el acceso a la c-ART y la profilaxis (Huang, 2005).

a. Incidencia en EUA.

En los primeros años de la epidemia, (1990-1993), la PcP era la enfermedad definitoria de SIDA más frecuente, y de aparición más precoz, se diagnosticaban 20.000 casos al año. Su incidencia ha ido descendiendo desde la introducción de la c-ART en 1996; en 1997, el número se había reducido a menos de 9500. En la actualidad, en EUA, un 25% de los casos de PcP aparecen en personas sin diagnóstico previo de VIH, un 50% en pacientes VIH conocidos pero que no siguen la c-ART, ni profilaxis frente a *Pneumocystis*, y el 25 % restante, en individuos bajo profilaxis con/sin c-ART (Palella et al., 1998).

b. Incidencia en Europa y España.

En Europa, la PcP continúa siendo la enfermedad indicativa de SIDA más frecuente. El estudio EuroSIDA reveló que la PcP se mantuvo, como tal, entre 1994 y 1998 (Mocroft et al., 2000). Sin embargo, en este estudio que incluyó 7300 pacientes VIH-positivos de 52 centros europeos, se demostró que el número de casos nuevos aparecidos entre estos años descendió de 49 en 1994, a 10 en 1998. En España, el último Boletín Epidemiológico Semanal dedicado a la vigilancia epidemiológica del SIDA (BES 30 junio 2006), sitúa la incidencia de SIDA en nuestro país en 1649 casos nuevos al año. Entre los años 2002 y 2006, la tuberculosis de cualquier localización, se ha mantenido como la enfermedad indicativa de SIDA más frecuente, afectando al 29.2% de los casos. A continuación le seguía la PcP con 22.4% de los casos. En el año 2007, la PcP volvió a ser la infección oportunista indicativa de SIDA más frecuente en nuestro país, adelantando a la tuberculosis (Caro-Murillo et al., 2007).

Respecto al número de casos por año, tenemos aproximadamente 370 casos nuevos de PcP en nuestro país. En el Hospital Clínic de Barcelona, entre los años 2002 y 2007, se han diagnosticado una media 20 casos nuevos/año.

3.1.2. Factores de Riesgo para la PcP.

Se han definido diversos factores de riesgo para la adquisición de PcP, y se ha especulado sobre otros potenciales factores. Las guías americanas para la prevención de infecciones oportunistas en pacientes VIH positivos, incluso en aquellos que están en c-ART, proponen la profilaxis primaria frente a *Pneumocystis*, en pacientes con recuento de linfocitos CD4 < 200/mm³, o con historia previa de candidiasis orofaríngea. La profilaxis secundaria se aplicará en aquellos con un episodio previo de PcP. La profilaxis se mantendrá hasta que los linfocitos CD4 permanezcan >200/mm³ durante tres meses (Kaplan *et al.*, 2002).

a. Recuento de Linfocitos CD4.

El recuento de linfocitos CD4 es el predictor más importante del riesgo de padecer PcP en los pacientes VIH positivos. Al inicio de la pandemia se realizó un estudio casos-contróles en pacientes americanos homosexuales con PcP y sarcoma de Kaposi (Jaffe *et al.*, 1983 y Rogers *et al.*, 1983). En dicho estudio, los pacientes presentaban linfopenia por deficiencia de los linfocitos T-helper. El 94% de ellos tenían un recuento de linfocitos CD4 < 200/mm³ y en el 96% de ellos, el porcentaje de linfocitos CD4 era ≤ 20%. Los pacientes que al inicio del estudio presentaban un recuento de linfocitos CD4 < 200/mm³, tenían un riesgo cinco veces mayor de desarrollar PcP, que aquellos pacientes con recuentos >200/mm³. Los resultados de este estudio fueron concluyentes para que el CDC redactara sus recomendaciones de administración de profilaxis.

b. Carga Viral (RNA de VIH-1).

La carga viral (CV), determinada por la cantidad de RNA del virus VIH-1, es un factor independiente de riesgo en la progresión del SIDA, y su evolución fatal (Mellors *et al.*, 1996 y 1997). Diversos estudios han demostrado que la CV es un predictor independiente de desarrollo de infecciones oportunistas, incluida la PcP. Con cualquier recuento de linfocitos CD4, valores crecientes de CV aumentan el riesgo de padecer una PcP (Lyles *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 1999; Yerly *et al.*, 1998; Kaplan *et al.*, 2001).

c. Reservorio Natural y Transmisión Persona-Persona.

Potencialmente el riesgo de padecer una PcP es por exposición a una fuente humana de pneumocystosis. Se han sugerido tanto reservorios ambientales como humanos, sin embargo, el reservorio natural de la enfermedad permanece desconocido. Existen diferencias geográficas documentadas en el riesgo de contraer la enfermedad, parece ser que en las ciudades del norte de Europa y EUA el riesgo es mayor. Probablemente asociado a la distribución de determinados genotipos de *Pneumocystis* (Lundgren et al., 1995; Blaxhult et al., 2000; Dohn et al., 2000; Morris et al., 2000).

La inexistencia de un medio de cultivo adecuado dificulta el estudio del ciclo biológico, su epidemiología y transmisión, como ya se ha desarrollado en capítulos anteriores. Se sugiere que la PcP puede adquirirse por reactivación de una infección latente adquirida en la infancia, o por reciente infección. Sin embargo, se desconoce cuál es el mecanismo predominante, y bajo que condiciones el microorganismo se convierte en activo (Morris et al., 2002).

3.1.3. Presentación Clínica.

a. Signos y Síntomas.

Clásicamente la PcP se presenta con fiebre, tos y disnea de esfuerzo. La tos es normalmente seca y no productiva, puede exacerbarse con la respiración profunda, y aparecer acompañada de tiraje costal que provoca respiraciones rápidas. La disnea al inicio es a esfuerzos moderados, por lo que puede pasar desapercibida, y progresa gradualmente. La fatiga es una de las principales quejas en los pacientes con PcP, mientras que el dolor torácico, los escalofríos y la sudoración nocturna son menos frecuentes (Huang, 2005).

b. Datos de Laboratorio.

No existe ninguna prueba de laboratorio que sea específica para PcP. El lactato deshidrogenasa (LDH) en suero suele estar elevado en pacientes con PcP, su sensibilidad oscila entre 82 y 100% (Boldt et al., 1997). Sin embargo, su interpretación debe ser cuidadosa. La elevación de LDH no es específica de PcP, por lo tanto no se puede considerar diagnóstica, hay casos de enfermedad con valores de LDH normales. De todos modos, a pesar de sus limitaciones diagnósticas, los niveles de LDH en suero pueden utilizarse para evaluar el pronóstico y la respuesta al tratamiento.

Múltiples estudios han correlacionado los valores de LDH y la supervivencia, valores inicialmente altos, o incrementados mientras el paciente está recibiendo tratamiento frente a la PcP, se asocian con peor pronóstico, fallo del tratamiento e incremento de la mortalidad; mientras que valores inicialmente bajos, o en descenso con el tratamiento, se asocian a mejor pronóstico, respuesta al tratamiento y menor mortalidad (*Kales et al., 1987; Zaman et al., 1988; Garay et al., 1989; Benson et al., 1991*).

Otra de las pruebas esenciales en el diagnóstico de la PcP es la determinación de gases en sangre arterial. Típicamente los pacientes presentan una disminución de la presión arterial de oxígeno (P_{aO_2}), un incremento del gradiente de oxígeno alveolo-arterial ($PA_{O_2} - P_{aO_2}$) y alcalosis respiratoria. La determinación de los gases arteriales es útil para decidir si es necesario el ingreso hospitalario del paciente, la administración de corticoides (en el caso de $P_{aO_2} \leq 70$ mmHg, o, $PA_{O_2} - P_{aO_2} \geq 35$ mmHg), y para valorar la respuesta terapéutica. Tanto la LDH, como el $PA_{O_2} - P_{aO_2}$, disminuirán hasta valores normales en pacientes con buena respuesta al tratamiento (*Garay et al., 1989*).

c. Radiografía de Tórax.

La radiografía (RX) de tórax es la piedra angular ante la sospecha de una PcP en un paciente VIH positivo. Clásicamente la PcP presenta un patrón retículo-intersticial, bilateral, difuso. Se inicia con opacidades centrales, o perihiliares, con predominio en lóbulo medio o inferior, que suelen ser bilaterales y simétricas, progresando a difusas en ausencia de diagnóstico y de tratamiento. Aunque menos clásico, también puede existir una presentación unilateral, focal o asimétrica. La PcP debe sospecharse en un paciente VIH-positivo que presenta un patrón reticular, independientemente de que sea uni o bilateral, focal o difuso, simétrico o asimétrico. Los pacientes con una PcP severa y fallo respiratorio presentarán invariablemente áreas de consolidación (*Huang, 2005*).

Los quistes con paredes finas, o pneumatoceles, aparecen entre el 5% y 34% de los casos, estando presentes en el diagnóstico de la PcP, o pudiéndose desarrollar durante el tratamiento, y persistir a pesar de la curación (*Sandhu et al., 1989*). Suelen ser múltiples y localizados en lóbulos superiores. Su importancia radica en que pueden predisponer a que aparezca un pneumotórax.

Es menos frecuente que aparezcan consolidaciones de un lóbulo o segmento, nódulos o cavitaciones. La presencia de un patrón granulomatoso apical, similar a la tuberculosis, se ha asociado a la profilaxis con pentamidina en aerosol. Las adenopatías y afectaciones pleurales son muy raras en la PcP (*Jasmer et al., 2000*).

La PcP también puede presentarse con una RX de tórax normal, entre 10-39% de los casos, asociándose entonces a un mejor pronóstico (*Opravil et al., 1994*).

Es frecuente que la RX y la clínica empeoren después de 3 a 5 días de iniciada la terapia. Y cuanto más severa sea la PcP más tiempo tarde en recuperarse la normalidad. Parece ser que hay una correlación entre el tiempo que transcurre desde el inicio de los síntomas, hasta que se empieza el tratamiento, y el que pasa desde el inicio del tratamiento hasta la recuperación (*DeLorenzo et al., 1987*).

d. Tomografía Computerizada de Alta Resolución (TACAR).

En los casos de pacientes VIH-positivos con alta sospecha de PcP y RX de tórax normal, la TACAR de tórax es una herramienta de gran utilidad. El patrón típico es de opacidades en vidrio esmerilado, bilaterales, que suelen aparecer acompañadas de múltiples pneumatoceles. Aunque no son específicas de PcP, la ausencia de dichas opacidades va en contra del diagnóstico de PcP. Hasta el momento no hay casos descritos de PcP en pacientes VIH-positivos con RX de tórax y TACAR normales (*Huang, 2005*).

e. Test de Función Pulmonar.

La medida de la capacidad de difusión del CO (DL_{CO}) es una prueba que debe ser considerada en los pacientes VIH-positivos con sospecha de PcP y RX de tórax normal. La evaluación de la función pulmonar en los pacientes con PcP suele determinar defectos ventilatorios con descenso de la capacidad pulmonar e incremento de la frecuencia respiratoria. Típicamente los pacientes con PcP presentan una disminución de la DL_{CO} , y aunque no es específico valores normales de DL_{CO} van en contra de la existencia de una PcP (*Huang et al., 1999*).

f. Otros Test.

Existen otras pruebas utilizadas en el diagnóstico de la PcP, con buena sensibilidad, pero baja especificidad, entre ellas cabe destacar:

- Oximetría no invasiva al ejercicio. Los pacientes con PcP suelen presentar un descenso de la saturación de O₂.
- Determinación del oxígeno arterial. Si es normal descarta la PcP.
- Scanner con Galio 67

g. Enfermedad Extrapulmonar.

La pneumocystosis extrapulmonar se ha descrito asociada a la profilaxis con pentamidina en aerosol, sin embargo en la mayoría de los casos la afectación es pulmonar. La frecuencia de la forma extrapulmonar es menor de 1-3% de los casos de PcP. La diseminación ocurre por vía linfática y hematogena. Se pueden afectar todos los órganos, pero es más frecuente en ganglios linfáticos, bazo, hígado y médula ósea. La implicación del oído y de la coroides se asocia a un mejor pronóstico. En pacientes VIH-positivos es posible que aparezca el cuadro extrapulmonar sin que exista una PcP previa, lo que dificulta el diagnóstico. A menudo la afectación extrapulmonar pasa desapercibida y se diagnostica *postmortem*. Los signos y síntomas suelen ser inespecíficos, para llegar a su diagnóstico se utilizan biopsias de los órganos afectados con las tinciones histológicas habituales. Respecto al tratamiento de la forma extrapulmonar aislada, no hay guías establecidas; a los pacientes con una PcP concomitante se les administra el tratamiento estándar de 21 días (*Telzak et al., 1990; Ng et al., 1997; Northfelt et al., 1990*).

3.1.4. Complicaciones.

a. Fallo Respiratorio.

El fallo respiratorio agudo, que requiere ventilación mecánica, es la complicación más frecuente de la PcP, y la que asocia a una mayor mortalidad. El porcentaje de pacientes VIH-positivos, ingresados en la UCI con fallo respiratorio y PcP ha ido decreciendo a lo largo de la epidemia, de 50-90% en los años ochenta, a 25-50 % en los años noventa. Sin embargo, a pesar de la introducción de la c-ART, todavía más del 25% de los pacientes VIH-positivos que ingresan en la UCI con fallo respiratorio agudo tienen una PcP (*Morris et al., 2002-b*).

El manejo adecuado de esta complicación requiere que esté confirmado el diagnóstico de PcP y sean excluidas otras infecciones oportunistas que puedan afectar al pulmón. El tratamiento se realizará con TMP-SMX o pentamidina, iv, a los que se asociará corticoides.

El pronóstico de estos pacientes también ha ido fluctuando a lo largo del curso de la epidemia. Según la experiencia del Hospital General de San Francisco, entre 1981 y 1985, sólo el 14% de 42 pacientes con PcP y fallo respiratorio agudo sobrevivía a la hospitalización. De 1986 a 1988 la supervivencia mejoró, siendo del 40% en 35 pacientes afectados. Se especuló que la mejoría podría ser debida al incremento del uso de corticoides, y a la mayor experiencia en el manejo de estos pacientes. Sin embargo, de 1989 a 1991 la supervivencia disminuyó al 24% de 37 pacientes. Las razones de ello no están claras, se identificaron como predictores de mortalidad el bajo recuento de linfocitos CD4 al ingreso, y el desarrollo de pneumotórax durante la ventilación mecánica. En los dos periodos más recientes, 1992-1995, y 1996-2001, la supervivencia fue de 44 y 45%, respectivamente. En este último periodo, la PcP fue la única causa de ingreso en UCI con una supervivencia menor al 50%. Por lo tanto, a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento de VIH y PcP, y en el manejo de la ventilación mecánica, los pacientes con PcP que requieren ventilación mecánica por fallo respiratorio, tienen un pronóstico sombrío (*Nickas & Wachter, 2000; Morris et al., 2002-b y 2003; Wachter et al., 1986, 1991 y 1995*).

La introducción de la c-ART parece mejorar la evolución de los pacientes con PcP y fallo respiratorio. Un estudio analizó el impacto de la c-ART en la mortalidad de los pacientes críticos con VIH, el análisis multivariado mostró que la c-ART iniciada antes, o durante, la hospitalización se asociaba a una menor mortalidad. Sin embargo, la necesidad de ventilación mecánica, el desarrollo de pneumotórax, y el retraso del ingreso en UCI, se asociaban a un aumento de mortalidad. Paradójicamente, se han descrito casos de empeoramiento del cuadro de PcP con el síndrome de reconstitución inmune que sigue a la administración c-ART. Se ha postulado, que tal vez con la reconstitución inmune, las nuevas células competentes del sistema inmunitario, y las células inflamatorias, responden de forma muy agresiva a los pocos quistes de *Pneumocystis* que puedan persistir. Por lo tanto, en un paciente crítico con PcP y fallo respiratorio agudo, que requiera ventilación mecánica, el potencial riesgo de la reconstitución inmune debe valorarse frente al beneficio que pueda aportar la c-ART (*Wislez et al., 2001; Koval et al., 2002*).

b. Pneumotórax.

La PcP asociada a pneumotórax es una de las complicaciones que requieren más atención en los pacientes VIH-positivos (*Sepkowitz et al., 1991; McClellan et al., 1991; Metersky et al., 1995*). La combinación de neumonía aguda, la frecuente presencia de pneumotoceles, y el uso de corticoides, como parte del tratamiento de la PcP, contribuyen a su difícil manejo.

La PcP con fallo respiratorio y necesidad de ventilación mecánica, y la consiguiente aparición del pneumotórax, suele presentarse como un cuadro fatal.

Si el paciente presenta un pequeño pneumotórax apical, se puede tratar de forma conservadora con oxigenoterapia, pero si el colapso es de mayor tamaño, será necesaria la inserción pulmonar de un tubo que favorezca la salida del aire y con ello la expansión pulmonar. Este procedimiento puede complicarse con la aparición de una fístula broncopleural. En algunos casos es necesaria la pleurodesis, y provocar una inflamación en el espacio pleural con talco para que se produzca la adhesión.

c. Enfermedad Pulmonar Crónica.

Después de recuperarse de una PcP el paciente puede presentar una enfermedad pulmonar crónica. Aunque es mucho menos dramática que la aparición del pneumotórax, acaba limitando la vida del paciente. Los efectos destructivos de la PcP provocan un daño permanente en la vía aérea. Se pueden presentar síntomas idénticos a los de una bronquitis crónica, con tos crónica, matutina y productiva. La sobreinfección bacteriana es frecuente, lo que aumenta la destrucción de la vía aérea. Los episodios repetidos de infección y destrucción provocan la aparición de bronquiectasias.

A pesar del tratamiento efectivo de la PcP, el paciente puede presentar una limitación al ejercicio. Se manifiesta con una disminución permanente del volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV_1), la capacidad vital forzada (FVC), el cociente FEV_1/FVC y el DL_{CO} (*Morris et al., 2000-b*).

3.2. PcP en Pacientes con SIDA en Países Pobres.

3.2.1. Situación en los Países Pobres.

Un país pobre es aquel en el que existe una imposibilidad de acceso, y/o carencia de los recursos, para satisfacer las necesidades físicas y psíquicas, básicas humanas, que inciden en un deterioro del nivel y calidad de vida de las personas, tales como, la alimentación, la vivienda, la educación, la asistencia sanitaria o el acceso al agua potable. Para estimar el porcentaje de población que vive por debajo del umbral de la pobreza, se toma como definición de este umbral la línea fijada en un dólar diario por persona, cantidad que se considera suficiente para la adquisición de productos necesarios para sobrevivir.

Durante la primera década de la pandemia del SIDA se creyó que la PcP era menos frecuente en los países pobres que en los industrializados (*Hughes, 2000; Walzer, 1999; Colebunders & Quinn, 1990*). Los informes de las autopsias de los pacientes africanos que morían por SIDA recogían entre las causas más frecuentes la tuberculosis, y las bacteriemias por *Salmonella* no tifoidea, y *Streptococo pneumoniae* (*Lucas et al, 1993; Malin et al., 1995*). Sin embargo, estudios recientes demuestran un aumento exponencial de la prevalencia de la PcP entre los pacientes VIH positivos, con sintomatología respiratoria, procedentes de países pobres. De todos modos, permanece en el terreno de la especulación si existe una clara tendencia a ir aumentando con el tiempo, o si realmente al inicio de la epidemia la enfermedad estaba infradiagnosticada en estos países. Siendo esta última teoría la que parece más probable.

Se ha descrito una gran variación en la prevalencia de la PcP en los países pobres (*Kazanjian et al., 2005*). Esta variación es, en parte, debida a diferencias en el diseño de los estudios, y la ausencia de uniformidad en la población estudiada (si estaban infectados por el VIH o no, si presentaban síntomas respiratorios o no). Además de las diferencias en el acceso a los centros de salud, y a que los pacientes recibieran, o no, profilaxis frente a *Pneumocystis*. Así mismo, la diferente sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos empleados, y el distinto grado de inmunosupresión de los pacientes, también influyen en que los resultados obtenidos sean diversos. Por otro lado, no hay evidencias que apoyen la especulación de que la pneumocystosis aparece como un estadio más temprano de la infección en los países pobres. Y a pesar de que el hábitat natural, y el modo de transmisión son desconocidos, tal vez, las diferentes tasas de ataque entre animales, y la exposición de humanos a animales domésticos y salvajes, puede influir en la diferencia de la prevalencia.

3.2.2. Estudios Realizados Durante la Primera Década de la Epidemia.

a. África.

La mayoría de los estudios realizados durante la primera década de la pandemia, en África, demostraron que *Pneumocystis* no era una causa frecuente de neumonía en los pacientes VIH-positivos. Dos estudios prospectivos realizados, uno en 1990 en Ruanda (*Batungwanayo et al., 1994*), y otro de 1989 a 1991 en Tanzania (*Atzori et al., 1993*), recogen sólo un 3 y 5%, respectivamente, de casos de PcP en pacientes con enfermedad respiratoria. Otros dos estudios conducidos en Zambia de 1988 a 1990 (*Machiels et al., 1992; Elvin et al., 1989*), y en la República Democrática del Congo (*Carme et al., 1991*), antes de 1990, mostraron porcentajes del 9% y 14%. Un quinto realizado en Zimbabwe (*McLeod et al., 1989*) presentó un 22% de pneumocystosis. Datos de las autopsias de pacientes de Costa de Marfil, fallecidos por neumonía en 1989, corroboran esta baja prevalencia de la PcP con un cifra del 12% (*Abouya, et al, 1992*).

b. América Central y del Sur.

Los estudios realizados en América Central y del Sur demuestran que la prevalencia de PcP en los pacientes con SIDA, en la primera década de la pandemia, era mayor que en África. Un estudio prospectivo conducido en Brasil en 1988 recogió un 43% de casos de PcP en los pacientes VIH-positivos con neumonía (*Weinberg et al., 1993*), y otro dirigido en Haití un 35% de casos (*Pitchenik et al., 1983*). Informes de autopsias realizadas en México entre 1984 y 1989, y en Brasil entre 1981 y 1985, recogen un 25 y un 13% de casos de muerte por PcP, respectivamente (*Mohar et al., 1992; Michalany et al., 1987*).

3.2.3. Estudios Realizados Durante la Segunda Década de la Epidemia.

a. África.

Los estudios realizados recientemente utilizando métodos diagnósticos más sensibles, demuestran que el porcentaje de pacientes VIH-positivos con PcP ha aumentado. Un estudio retrospectivo conducido en Sudáfrica, que empleó el LBA y la determinación de anticuerpos monoclonales, diagnosticó de PcP al 43% de los casos de neumonía entre 1987 y 1993 (*Mahomed et al., 1999*). Otro trabajo desarrollado en Zimbabwe entre 1992 y 1993 recogió un 33% de casos de PcP (*Lucas et al., 1993*).

La prevalencia de la enfermedad en niños muestra más variabilidad entre los estudios, en Malawi era del 9% en 1995 (*Kamiya et al., 1997*) y del 11% en 1996 (*Graham et al., 2000*); en Sudáfrica, en 1998, del 10% (*Zar et al., 2000*), mientras que otro trabajo recoge un porcentaje del 49% en el mismo año (*Ruffini et al., 2002*), este aumento podría justificarse por la utilización de técnicas diagnósticas más sensibles, como la IFI en esputo inducido.

Estudios *postmortem* también recogen cifras variables, como el que describe un porcentaje del 52% de PcP entre los niños que mueren por infiltrados pulmonares en Sudáfrica entre 1992 y 1993 (*Jeena et al., 1996*); otro en Zimbabwe presenta un 16% de afectados, entre 1991 y 1992 (*Ikeogu et al., 1997*), y un tercero realizado en Costa de Marfil un 14% (*Lucas et al., 1996*).

b. América Central y del Sur.

En América Central y del Sur también se recogen datos variables de prevalencia de PcP, debido a que tampoco hay una uniformidad en los métodos diagnósticos. En Panamá en 1995 se describió una afectación del 45% entre los pacientes VIH-positivos con síntomas respiratorios (*Rodríguez et al., 1996*), y la misma cifra, en el condado de Harris, en Texas entre 1990 y 1995 (*Serrano et al., 1997*). Un 16% era la prevalencia en México, El Salvador y Guatemala durante el mismo periodo de años. Chile mostraba una incidencia de 9.1 casos de PcP por cada 100 pacientes (*Wolff et al., 2001*). Y Brasil presentaba una prevalencia del 19% de PcP entre los años 1991 y 1995 (*Santoro-Lopes et al., 1998*).

c. Asia.

Los datos que existen de la prevalencia de PcP en países asiáticos también son variables, debido a que no todos los trabajos emplean métodos diagnósticos con la misma sensibilidad y especificidad. Los estudios de Tailandia muestran prevalencias entre 5 y 40% (*Wannamethee et al., 1998*; *Tansuphasawadikul et al., 1999*; *Lumbiganon et al., 2000*; *Mootsikapun et al., 1996*), mientras que en Filipinas varían entre un 27 y 30% (*Manaloto et al., 1998*). Un 10% hay descrito en Corea del Sur (*Oh et al., 1999*), y un 13% de diagnósticos *postmortem* en Taiwán (*Hsiao et al., 1997*).

3.2.4. Tendencia en la Prevalencia de PcP en Países Pobres Frente a Países Industrializados.

En la actualidad la PcP afecta a un notable porcentaje de pacientes VIH-positivos con síntomas respiratorios en los países pobres. Sin embargo, permanece en el terreno de la especulación si la tendencia hacia el incremento en el porcentaje de casos en África representa un verdadero incremento en la prevalencia de la PcP, o si los datos preliminares infraestimaban el valor real de la situación.

En contraste, la incidencia registrada en los países industrializados ha ido disminuyendo desde el inicio de la epidemia. Tanto el uso de la profilaxis frente a *Pneumocystis*, como la c-ART han contribuido a este descenso. Un estudio norteamericano realizado en pacientes con recuento de linfocitos CD4 < 100/mm³, mostró que la incidencia de PcP descendió de 13 casos por 100 pacientes/año en 1994, a 3 casos por 100 pacientes/año en 1997 (*Palella et al., 1998*). Durante este periodo el uso de profilaxis frente a PcP se mantuvo constante, por lo tanto se consideró que la c-ART jugó un papel fundamental en la reducción de la incidencia. Estos datos se corroboran con un estudio suizo que mostró una reducción de la incidencia en 30% entre 1995 y 1997 (de 2.35 episodios por 100 pacientes/año a 0.22 episodios por 100 pacientes/año) (*Ledergerber et al., 1999*). Sin embargo, a pesar de las terapias, la PcP se mantiene como la infección oportunista definitoria de SIDA más frecuente.

3.3. Tipificación Molecular y Epidemiología.

3.3.1. Introducción.

Los estudios moleculares, tales como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la secuenciación de ADN, y el análisis de fragmentos de restricción, han tenido un tremendo impacto en el conocimiento de la biología de las diferentes especies de *Pneumocystis*, y de la epidemiología de la PcP en humanos. Los avances en esta área han permitido determinar que *Pneumocystis* no es una sola especie de protozoo, si no un género de hongo con diferentes especies, que están adaptadas a sus diversos hospedadores mamíferos. Además, gracias a ello sabemos que *Pneumocystis jirovecii* afecta específicamente a humanos y que no hay infecciones cruzadas con otros mamíferos. A través de los estudios de epidemiología molecular hemos aprendido que el hombre es el reservorio de *P. jirovecii*, y que presumiblemente es colonizado transitoriamente durante su vida, pero que las latencias a largo plazo no explicarían la enorme afectación de los pacientes VIH-positivos.

También han aportado clara evidencia de que la transmisión es persona a persona, a través de aerosoles. Además, nos han permitido evidenciar que la resistencia a las sulfamidas aparece como un proceso emergente (Beard, et al, 2005).

3.3.2. Tipificación Molecular: Genes y Métodos.

a. Genes Estudiados en *P. jirovecii*.

Aproximadamente se han estudiado unos 15 genes de *Pneumocystis* con diferentes objetivos, incluyendo el diagnóstico, el estudio de los patrones de transmisión, la severidad de la infección y el fracaso del tratamiento y la profilaxis.

El primer gen que se identificó, y se evaluó para uso diagnóstico, fue el que codifica la subunidad grande del ARN ribosómico (**mtLSU rRNA**), (Wakefield et al., 1990). Además de su aplicación en el diagnóstico, se ha utilizado para analizar los casos de recurrencia, la transmisión persona-persona, la evaluación de la latencia y reactivación frente a la transmisión reciente, y en la investigación de portadores subclínicos. Así mismo, su determinación ha demostrado la presencia de *Pneumocystis* en exteriores rurales como huertos de manzanos y aguas estancadas, en el polvo de las casas, y en las habitaciones y vestíbulos de hospitales, así como en muestras clínicas como el lavado broncoalveolar, esputo inducido, enjuagues orales, aspirados traqueales, aspirados nasofaríngeos y biopsias de tejidos. Otro de los genes mitocondriales estudiados es el que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosómico (**mtSSU rRNA**), (Hunter et al, 1996).

Fundamentalmente se ha utilizado en la clasificación de las diferentes especies de *Pneumocystis* que afectan al resto de hospedadores mamíferos. El tercero de los genes mitocondriales estudiado es el **gen del citocromo b mitocondrial** (Walker et al., 1998; Kazanjian et al., 2001). La proteína codificada por este gen es clave en el sistema de transporte electrónico, y la diana de la atovacuona, que se utiliza como droga de segunda línea en la profilaxis y tratamiento de PcP. Las mutaciones encontradas en este gen se han asociado con la exposición previa a atovacuona en los pacientes con SIDA, y sugieren una posible emergencia de resistencia a dicho fármaco.

Respecto a los genes nucleares, los **ITS1** e **ITS2** (espaciador interno de transcripción 1 y 2 del ARN ribosómico) son los más utilizados, y los que presentan mayor número de polimorfismos. Se han descrito 21 genotipos de ITS1 y 29 de ITS2 (Lu et al., 1994; Wakefield et al., 1998; Lee et al., 1998). Son de utilidad diagnóstica, y también de aplicabilidad en estudios de epidemiología molecular, incluyendo el análisis de *clusters*, la transmisión persona-persona, las recaídas, los estudios filogenéticos y la severidad de la infección.

Entre los genes que codifican dianas específicas de fármacos, dos han sido estudiados con profundidad en los últimos años, por su implicación con la emergente resistencia a las drogas anti-*Pneumocystis*, el gen de la *Dihidrofolato reductasa* (**DHFR**) y el gen de la *Dihidropteroato sintetasa* (**DHPS**) (Meshnick et al., 1999). Ambos genes codifican enzimas claves en el metabolismo del ácido fólico. La combinación de trimetoprim (TMP) y sulfametoxazol (SMX), cotrimoxazol, es de elección en el tratamiento y profilaxis de la PcP. Aunque parece ser que tan sólo el SMX tiene actividad anti-*Pneumocystis* (Walzer et al., 1992). La DHFR es el sitio activo del TMP, y la DHPS el del SMX. El uso prolongado del TMP-SMX tanto para profilaxis, como para tratamiento, ha ejercido una gran presión sobre la DHPS de *P. jirovecii*, que se detalla ampliamente en el capítulo final de esta introducción.

La glucoproteína mayor de superficie (**MSG**), es la principal proteína antigénica de la superficie de la membrana de todas las especies de *Pneumocystis*. Desempeña un importante papel en la adherencia del organismo a las células del epitelio alveolar. La MSG está codificada por una familia de genes multicopia. Con el cambio de expresión de MSG el organismo cambia los antígenos de superficie, así escapa de la respuesta inmune del huésped. Existen estudios preliminares del multilocus de la MSG que se han utilizado para discernir entre el cuadro clínico de PcP y el estado de portador de *Pneumocystis* (Larsen et al., 2002).

b. Métodos de Tipificación Molecular.

Una gran variedad de métodos se han empleado en el estudio de la diversidad genética intra e inter especie de *Pneumocystis*.

Uno de los primeros métodos de tipificación utilizado fue el **Análisis del cariotipo** (*Hong et al., 1990*). Permite la distinción de las diferentes especies de *Pneumocystis*, mediante el aislamiento de *Pneumocystis* de los tejidos infectados, y la observación posterior de las bandas cromosómicas en un gel de agarosa separadas por electroforesis en campo pulsado (**PFGE**).

Otro de los métodos empleados es la detección de alelos específicos mediante electroforesis enzimática multilocus (**MLEE- Multilocus Enzyme Electrophoresis**) (*Mazars et al., 1994*).

La **secuenciación directa** de los fragmentos de ADN, obtenidos tras la amplificación mediante **PCR**, es el método más sensible para la detección y caracterización de *Pneumocystis*. Se considera la técnica de referencia en los estudios de epidemiología molecular. Según el número de diferentes genotipos de un gen determinado, y la complejidad de patrones observados, en ocasiones se hace necesario clonar el producto de la PCR antes de la secuenciación.

El análisis de polimorfismos en cadenas sencillas de ADN (**SSCP- Single Strand Conformation Polymorphism**) es el método de tipificación más utilizado después la secuenciación directa. Se basa en el concepto de que, los cambios específicos en la secuencia de los nucleótidos pueden afectar en la migración de los fragmentos de ADN, cuando se analiza en electroforesis en gel (*Hauser et al., 2001*).

Otro de los métodos de tipificación que se utiliza es el análisis de los polimorfismos mediante endonucleasas de restricción (**RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism**). Consiste en digerir un fragmento de ADN, obtenido tras PCR, mediante una enzima de restricción que es específica de una secuencia de nucleótidos que puede estar presente o no dentro del fragmento de ADN, dependiendo de los polimorfismos que existan entre los diferentes subtipos.

El método más novedoso es la **PCR a tiempo real (rT PCR)**, que a diferencia de la PCR convencional, permite conocer la dinámica del proceso de amplificación del ADN en el mismo momento en el que se está produciendo (*Larsen et al., 2002*). Se basa en la detección y cuantificación de una molécula fluorescente conocida como *Reporter*. El incremento de la fluorescencia es directamente proporcional a la cantidad de producto amplificado en la PCR.

Esta es la principal diferencia con la PCR convencional en la que la cantidad final de ADN no es proporcional al ADN inicial, por lo que no se determina la dinámica de la reacción.

Hay diferentes métodos para la cuantificación del amplicón:

1.- Las moléculas intercalantes como el **SYBR-GREEN**, que detectan la producción de doble cadena de ADN al insertarse entre las dos hebras. Son fáciles de optimizar, de gran sensibilidad pero de poca especificidad.

2.- Las sondas fluorescentes específicas (**TaqMan**), que son oligonucleótidos más largos que los *primers*, y que contienen un marcador fluorescente en el extremo 5', el *Reporter*, y en el extremo 3' otra molécula denominada *Quencher* que absorbe la fluorescencia del *Reporter* siempre que la sonda se encuentre intacta. Las sondas están diseñadas para unirse a una región interna del producto de la PCR. Cuando la Taq polimerasa, con su actividad exonucleasa 5'-3', amplifica la muestra a la que la sonda está unida, su extremo fluorescente 5' queda libre, separándose el *Reporter* del *Quencher*, de este modo la fluorescencia del *Reporter* se puede detectar (**Figura 7**). Su medida es equivalente a la cantidad de amplificación que se está produciendo en ese preciso momento, por lo tanto, a tiempo real.

Las sondas son más específicas aunque más difíciles de optimizar, y algunos tipos de sondas permiten detectar mutaciones.

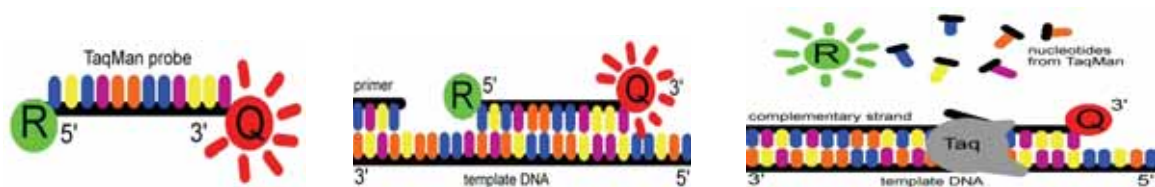


Figura 7. Sondas TaqMan (*R-Reporter*; *Q- Quencher*). Tomado de www.bio.davidson.edu

3.3.3. Contribución de la Tipificación Molecular de *Pneumocystis* a la Epidemiología y la Clínica de la PcP.

En los últimos 15 años el uso de las técnicas moleculares ha aportado una valiosa información sobre la genética de *Pneumocystis*, facilitando la comprensión de la biología del organismo y la epidemiología de la PcP en humanos. El impacto de los estudios moleculares ha tenido especial importancia en el conocimiento de la taxonomía y reservorio de la enfermedad, la fuente de la infección, la historia natural de la PcP en el hombre, y la correlación entre la tipificación molecular y la clínica (*Stringer et al., 2002; Morris et al., 2002; Wakefield et al., 2002; Hughes., 1998(b); Kovacs et al., 2001; Beard et al., 2004*).

a. Taxonomía y Reservorio de la Enfermedad.

Una de las principales aportaciones de la biología molecular ha sido la reclasificación taxonómica de *Pneumocystis* (Edman et al., 1988; Stringer et al., 1989). Hasta finales de los años 80 estaba clasificado como un protozoo, ya que respondía a las drogas antiprotozoarias y no crecía en medio de cultivo. Sin embargo, a finales de los ochenta con la secuenciación del gen que codifica la subunidad 16s y 5s del ARN ribosómico se reclasificó como un hongo. Su resistencia a los antifúngicos podría justificarse entonces por la ausencia de esteroides en su membrana celular, que sí están presentes en otros hongos. En la actualidad está incluido en la división *Ascomycota*, clase *Archiascomycetes*, género *Pneumocystis*, especie *Pneumocystis jirovecii*. Así mismo, hoy en día conocemos que las especies de *Pneumocystis* que afectan a los distintos mamíferos son distintas a la que afecta al hombre, y que no existe riesgo de infección interespecie. Por lo que el propio hombre es el único reservorio de la enfermedad que le afecta.

b. La fuente de Infección: Adquisición Reciente vs. Reactivación de la Infección

Latente.

Previamente a la aparición del SIDA, la PcP era considerada como una enfermedad que sólo afectaba a los niños desnutridos. Por tanto, parece lógico pensar que la infección se adquiría en la infancia, y que la inmunodepresión provocada por el VIH determinaba una reactivación de la infección latente desde la infancia. Sin embargo, los estudios moleculares han evidenciado que también es posible la transmisión activa de la enfermedad. Hay tres líneas de investigación que muestran la evidencia de que la adquisición reciente tiene lugar. La primera de ellas es la que demostró que episodios recurrentes de PcP eran provocados por cepas diferentes de *Pneumocystis* (Keely et al., 1995 y 1996). Con ello se confirmaba que los diferentes genotipos de *Pneumocystis* encontrados eran el resultado de la adquisición *de novo* de la enfermedad. Un segundo trabajo estudió las variaciones de genotipo de *Pneumocystis* según el área geográfica del paciente, y los patrones encontrados se asociaron con el lugar de diagnóstico del paciente, y no con su lugar de nacimiento, lo que apoyaba de nuevo la adquisición reciente frente a la reactivación (Beard et al., 2000). Una tercera línea de evidencia ha sido aportada por el estudio de los genotipos mutantes del gen DHPS, sitio activo del cotrimoxazol (Huang et al., 2000). Se ha asociado la presencia de genotipos mutantes de DHPS a la exposición previa a las sulfamidas.

Sin embargo, se ha descrito la presencia de mutaciones en pacientes que previamente nunca habían estado expuestos a las sulfamidas, por tanto, de nuevo, su presencia se justificaría por adquisición reciente de *Pneumocystis* que porta dichas mutaciones.

c. Historia Natural de la PcP en el Hombre.

Una interesante hipótesis sobre la epidemiología e historia natural de PcP ha surgido a partir de estudios moleculares (*Dei-Cas, 2000*). Probablemente el niño sea el huésped natural de *Pneumocystis*, siendo colonizado en los primeros meses de vida al disminuir los AC maternos. Cuando el niño empieza a desarrollar su propia inmunidad, la infección es controlada. Durante la vida, las exposiciones a *P. jirovecii* son frecuentes, y derivan en colonizaciones transitorias. La fuente de exposición, tanto para niños como para adultos es, probablemente, otro individuo con PcP activa, o una infección subclínica. Con la aparición del SIDA, surge una segunda forma de transmisión entre individuos VIH-positivos. Existen evidencias que el genotipo de *P. jirovecii* encontrado en estos pacientes es diferente al que presentan los niños inmunocompetentes. En los VIH-positivos la colonización ocurre de la misma manera que en otros individuos, la progresión a PcP dependerá del grado de inmunosupresión determinada por los niveles de linfocitos CD4. Si los pacientes son tratados, se recuperarán, para volver a ser colonizados más tarde. El desarrollo de la enfermedad dependerá entonces del uso de c-ART y de la profilaxis secundaria frente a *Pneumocystis*. Como consecuencia de la c-ART se elevan los linfocitos CD4, sin embargo siguen produciéndose colonizaciones por *P. jirovecii*, que la infección persista o se autolimita, dependerá del estado inmunológico del paciente.

d. Tipificación Molecular y Correlación Clínica.

Varias publicaciones han mostrado la asociación de la presencia de determinados genotipos con la virulencia de *Pneumocystis* y el fallo de la profilaxis.

Un estudio de *Miller et al., 1999*, señaló la relación entre la presencia de ITS genotipos A₂C₁ y una mayor severidad de la PcP, determinada por la medida de la Pao₂, y la necesidad de corticoterapia asociada. Así mismo, la presencia de ITS genotipo B₂a₁ se ha asociado a infecciones persistentes. Por lo tanto, además de los factores relacionados con el huésped, como el nivel de linfocitos CD4 y la CV, también las características de la cepa de *P. jirovecii*, pueden determinar la severidad de la enfermedad.

Un segundo estudio (*Hauser et al., 2001-b*) presentó la asociación del genotipo multilocus SSCP 6 con el fallo de la profilaxis. A su vez, este genotipo estaba relacionado con la presencia de ITS genotipo B_{2a1}, comentado anteriormente.

3.4. Tratamiento y Profilaxis de la PcP.

3.4.1. Introducción.

La instauración de pautas eficaces de profilaxis primaria y secundaria, frente a las principales infecciones oportunistas, supuso el primer gran avance terapéutico para los enfermos VIH-positivos, permitiendo un significativo descenso de mortalidad, incluso antes de la era de la terapia antirretroviral combinada (c-ART). Con la introducción de la c-ART se asistió a un notable cambio en la evolución de la infección por VIH, con una drástica reducción de la mortalidad y de la incidencia de enfermedades oportunistas. Sin embargo, en la actualidad se continúa, observando casos de PcP en varias situaciones: pacientes que no se sabían infectados por el VIH y que debutan con una PcP; enfermos que no reciben c-ART por mala tolerancia; fracaso de la c-ART, por falta de adherencia u otras.

En este capítulo se expone el tratamiento y profilaxis de la PcP según las recomendaciones del Grupo de Estudio de SIDA (GESIDA), y la Secretaría del Plan Nacional sobre SIDA (PNS). (*Podzamczar et al., 2008, Berenguer et al., 2004*). Para la clasificación de la fuerza y la calidad de las recomendaciones, se sigue el sistema utilizado por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) y el Servicio de Salud Pública de EUA (USPHS) **Tabla 1**.

3.4.2. Tratamiento de la PcP.

El Grupo de Estudio de SIDA (GESIDA) y la Secretaría del Plan Nacional sobre SIDA (PNS), (*Podzamczar et al., 2008*) recomiendan las siguientes pautas para el tratamiento de la PcP (**Tabla 2**). En casos de neumonía grave ($\text{PaO}_2 < 70$ mm Hg o gradiente alveolo-arterial > 35 mm/Hg) el tratamiento de elección es el cotrimoxazol (TMP-SMX) por vía intravenosa (IV) a dosis de 15-20 mg/kg/día de TMP, más 75-100 mg/kg/día de SMX, durante 21 días (**AI**, según la clasificación de la fuerza y calidad de las recomendaciones, **Tabla 1**). Está indicado además el tratamiento adyuvante con corticoides para mejorar la función respiratoria, reducir el riesgo de intubación, y disminuir la mortalidad (**AI**).

Las dosis recomendadas son: metilpredisolona 40 mg/12h, días 1-5; 40 mg/d, días 6-10; y 20 mg/d días 11-21. No parece que los corticoides aumenten el riesgo de tuberculosis u otras infecciones oportunistas graves.

De entrada, no se recomienda añadir ácido fólico para prevenir la mielotoxicidad del TMP-SMX, porque no está clara su eficacia, y existe alguna evidencia de que puede favorecer el fracaso del tratamiento (**DII**). Sin embargo, podría intentarse en pacientes que empeoren su hemograma durante el mismo (**CIII**).

En pacientes que no toleran el TMP-SMX (30-40% en algunas series) se puede tratar con pentamidina IV 3-4 mg/kg/día (**AI**). Aunque algunos estudios previos mostraban una similar eficacia del TMP-SMX y la pentamidina, un trabajo más reciente ha observado menor fallo terapéutico, mejoría más rápida de la oxigenación, y menor frecuencia de recaídas en los pacientes que recibían TMP-SMX. Además, si bien TMP-SMX causa efectos adversos con cierta frecuencia, estos suelen ser menos graves que los provocados por pentamidina intravenosa. En casos de alergia no grave al TMP-SMX se puede intentar una pauta de desensibilización. Otra alternativa es la clindamicina IV 600 mg cada 6-8 horas, más primaquina 30 mg/día vía oral (VO) (**BI**). El Trimetrexate ya no se comercializa.

En la neumonía por *P. jirovecii* leve-moderada existen varias opciones terapéuticas para pacientes que no toleran el TMP-SMX, aunque por VO es nuevamente el fármaco de primera elección (**AI**).

1) Dapsona-TMP (100 mg/d + 20 mg/kg/d, VO) (**BI**) (eficacia similar y menos toxicidad pero pauta incómoda por número de comprimidos)

2) Clindamicina-primaquina (600 mg/8 h + 30 mg/d, VO) (**BI**)

3) Atovuacuna (750 mg/12h VO) (**BI**) (menos efectivo que TMP-SMX pero mejor tolerado).

La pentamidina inhalada no se recomienda por menor eficacia y mayor frecuencia de recaídas (**DI**). En los pacientes que presentan fracaso al tratamiento inicial, (falta de respuesta a los 5-7 días de tratamiento) estando en tratamiento oral, debería cambiarse a un tratamiento endovenoso y descartar infecciones respiratorias concomitantes. En pacientes en los que falla el TMP-SMX, o pentamidina IV, se recomienda clindamicina IV y primaquina oral (**BII**).

TABLA 1. Sistema para la clasificación de las recomendaciones de guías de práctica clínica utilizado por la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) y el Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos de América (USPHS).

Fuerza de la recomendación	
A	<i>Ofrecer siempre.</i> Existen pruebas muy sólidas que avalan la eficacia y el beneficio clínico de la recomendación
B	<i>Ofrecer por lo general.</i> Las pruebas que avalan su eficacia: a) no son muy sólidas, o b) son sólidas pero el beneficio clínico de la recomendación es limitado
C	<i>Opcional.</i> a) No existen pruebas concluyentes que avalen la recomendación o que la refuten, o b) las pruebas que avalan su eficacia no compensan los posibles efectos adversos (toxicidad, interacciones medicamentosas), el precio o soluciones alternativas
D	<i>No ofrecer por lo general.</i> Existen pruebas, de moderada solidez, que muestran: a) falta de eficacia, o b) que existe el riesgo de efectos adversos
E	<i>No ofrecer nunca.</i> Existen pruebas sólidas que muestran que la recomendación es ineficaz o supone un riesgo para el paciente
Calidad de las pruebas en las que se basa la recomendación	
I	Al menos un ensayo clínico aleatorizado y controlado bien diseñado
II	Al menos un ensayo clínico bien diseñado pero no aleatorizado o un estudio de cohortes o un estudio de casos y controles (preferiblemente multicéntrico) o múltiples series de casos o bien resultados espectaculares en estudios no controlados
III	Opiniones de profesionales con gran experiencia clínica en la materia, estudios descriptivos o recomendaciones de comités de expertos

Modificado de Berenguer et al., 2004

TABLA 2. Recomendaciones de GESIDA para el tratamiento de la PcP.

Tratamiento de PcP	
Primera elección	Alternativas
<p>Formas graves: -TMP-SMX, 15-20 mg/Kg/d de TMP y 75-100 mg/kg/d de SMX, IV o VO, 21 días (repartido en 3-4 tomas)</p> <p>Añadir: Prednisona, 40 mg/12 h VO o IV, si PaO₂ < 70 mmHg</p> <p>Formas leves-moderadas: TMP-SMX mismas dosis VO</p>	<p>-Pentamidina (isotianato) 3-4 mg/kg/día IV, 21 días</p> <p>-Clindamicina, 600 mg VO o IV/6-8h, + primaquina 30 mg/día VO</p> <p>-Dapsona 100 mg/d + TMP 15-20 mg/kg/d</p> <p>-Atovacuona 750 mg/12 h VO</p>

Modificado de Podzamczar et al., 2008

3.4.3. Profilaxis frente a PcP.

El Grupo de Estudio de SIDA (GESIDA) y la Secretaría del Plan Nacional sobre SIDA (PNS), (*Berenguer et al., 2004*) recomiendan las siguientes pautas para la prevención de la PcP en adultos y adolescentes infectados por el VIH (*Tabla 3*).

a. Profilaxis Primaria.

La profilaxis primaria debe iniciarse cuando la cifra de linfocitos T CD4 sea inferior a 200/ μ l y siempre que exista alguna enfermedad definitoria de SIDA, candidiasis oral o fiebre inexplicada de más de 20 días de duración (**AI**, según la clasificación de la fuerza y calidad de las recomendaciones, *Tabla 1*). Puede considerarse la profilaxis cuando el porcentaje de linfocitos T CD4 sea inferior al 14%, o cuando la cifra de linfocitos T CD4 esté entre 200-250/ml y no se pueda controlar al paciente cada 3 meses (**BII**), (*Kaplan et al., 1998*). La combinación de TMP-SMX se considera el fármaco de elección por su eficacia, comodidad y relación coste-beneficio (**AI**). Los primeros estudios se llevaron a cabo con dosis diarias de TMP-SMX de 160/800 mg (1 comprimido Forte), (*Fischl et al., 1988*), pero posteriormente se ha demostrado que la tolerancia es mejor, y la eficacia similar, con tres comprimidos “Forte” a la semana (**AI**), o con un comprimido “normal” (80/400) todos los días (**AI**), (*Podzamczar et al., 1993; El-Sadr et al., 1999*). Si se presentan reacciones de hipersensibilidad debe intentarse la desensibilización antes de prescribirse un fármaco alternativo (*CDC, 2001*). La pentamidina en aerosol se considera el fármaco de segunda elección; este aerosol debe administrarse con un equipo especial (Respigard® II o Fisoneb®) (**BI**) (*Hirschel et al., 1991*). Esta profilaxis es menos eficaz que el TMP-SMX oral y no protege frente a formas extrapulmonares u otras infecciones como toxoplasmosis (*Schneider et al., 1992*). Entre sus inconvenientes destacan el broncospasmo y el sabor metálico. Además puede ocasionar problemas como la irritabilidad de la vía aérea y riesgo de diseminación de tuberculosis, por lo que el aerosol debe administrarse en un local aislado y bien ventilado. Son alternativas válidas, pero menos estudiadas, la dapsona (**BI**), dapsona/pirimetamina (**BI**) y atovaquona (**BI**) (*El-Sadr et al., 1999; Blue et al., 1992; Mallolas et al., 1993*) que pueden requerir la administración de más de un fármaco dificultando, por tanto, el cumplimiento de la profilaxis o de la c-ART.

b. Profilaxis Secundaria.

Tras una neumonía por *P. jirovecii* se debe administrar profilaxis secundaria para prevenir recidivas (AI). El TMP-SMX (1 comprimido “Forte”, a diario, o 3 días por semana) es más eficaz que la pentamidina en aerosol para prevenir recidivas locales y/o extrapulmonares (AI) (Hardy et al., 1992).

c. Retirada de la Profilaxis.

La profilaxis primaria se puede retirar en aquellos enfermos con c-ART que tengan buen control de la carga viral (indetectable, o < 5000 copias / μ l) y una cifra de linfocitos T CD4 superiores a 200/ μ l durante al menos 3 meses (AI) (López Bernaldo de Quirós et al., 2001; Koletar et al., 2001; Furrer et al., 1999; García Vázquez et al., 1999). Esos mismos criterios son válidos para la suspensión de la profilaxis secundaria (López Bernaldo de Quirós et al., 2001; Koletar et al., 2001; Soriano et al., 2000; Ledergerber et al., 2001; Mussini et al., 2003) **Tabla 4**. La retirada de la profilaxis reduce la toxicidad farmacológica, simplifica el tratamiento, y puede facilitar el cumplimiento de la c-ART porque reduce el número de pastillas. Se han descrito algunos casos de recidiva de la enfermedad tras la retirada de la profilaxis. En general, estos pacientes tenían edad avanzada, habían desarrollado la neumonía por *P. jirovecii* con cifras de linfocitos T CD4 superiores a 200/ μ l, tenían otro tipo de inmunosupresión (p.e. linfoma), o habían abandonado la c-ART.

d. Reinicio de la Profilaxis.

Aunque no hay datos al respecto, se aconseja reanudar la profilaxis si la cifra de linfocitos T CD4 desciende de 200/ μ l, o el paciente presenta un episodio de neumonía por *P. jirovecii* (CIII).

TABLA 3. Profilaxis de PcP en pacientes adultos y adolescentes infectados por VIH.

Indicación	Primera opción	Alternativas
Profilaxis primaria <i>Pneumocystis jiroveci</i> CD4 < 200/ μ l Candidiasis oral FOD > 20 días Enfermedad que defina sida ¹	TMP-SMZ*, 1 comp. Forte TDS ^{2,3}	TMP-SMZ, 1 comp. "Forte", QD TMP-SMZ, 1 comp. Normal ⁴ QD Aerosol de pentamidina (300 mg) cada 28 días Dapsona (50 mg/BID o 100 QD) Dapsona (100 mg DDS) + pirimetamina (50 mg DDS) + ácido fólico (15 mg UDS) Dapsona (50 mg QD) + pirimetamina (50 mg UDS) + ácido fólico (15 mg UDS) Dapsona (200 mg UDS) + pirimetamina (75 mg UDS) + ácido fólico (15 mg UDS) Atovaquona 1.500 mg QD
Profilaxis secundaria <i>P. jiroveci</i> Neumonía por <i>P. jiroveci</i>	TMP-SMZ, 1 comp. Forte TDS TMP-SMZ, 1 comp. Forte, QD	Dapsona (50 mg BID o 100 mg QD) Dapsona (50 mg QD) + pirimetamina (50 mg UDS) + ácido fólico (15 mg UDS) Pentamidina (300 mg/28 día) Atovaquona 1.500 mg QD Sulfadoxina-pirimetamina 1 comp. UDS

Modificada de Berenguer et al., 2004

TABLA 4. Criterios de retirada y reanudación de la profilaxis para PcP en adultos y adolescentes infectados por el VIH que reciben c-ART.

Criterios para suspender la profilaxis		Criterios para reanudar la profilaxis
Primaria	Secundaria	
c-ART (>6 meses), y	c-ART (>6 meses), y	CD4 < 200/ μ l
CD4 > 200/ μ l > 3meses y	CD4 > 200/ μ l > 3meses y	
CV < 5000 copias/ μ l.	CV < 5000 copias/ μ l.	

Modificada de Berenguer et al., 2004

3.5. Dihidropteroato Sintetasa (DHPS) y Citocromo b: El Problema de la Resistencia Emergente.

3.5.1. Introducción.

Los antifolatos (sulfamidas y sulfonas), y las hidroxinaftoquinonas (atovacuna), están entre los más antiguos antimicrobianos conocidos. El prototipo de antifolato fue el Prontosil, descubierto a principios de los años treinta por Gerhard Domagk. La primera sulfona, la dapsona, fue sintetizada en los años cuarenta para el tratamiento de la lepra. En 1962 se descubrió que tanto las sulfamidas (sulfametoxazol = SMX), como las sulfonas, actúan inhibiendo la enzima dihidropteroato sintetasa (DHPS), implicada en la síntesis del ácido fólico (*Meshnick & Kazanjian, 2005*).

En los años cincuenta Hitchings, Elion y colaboradores sintetizaron la pirimetamina y el trimetoprim (TMP), como análogos del metotrexate (*Brumfit & Hamilton-Miller, 1995*). Éstos actúan inhibiendo otra enzima, la dihidrofolato reductasa (DHFR), también involucrada en la síntesis de ácido fólico.

El cotrimoxazol, combinación de TMP y SMX, fue comercializado en los años sesenta. Fue la primera combinación de antimicrobianos en desarrollarse, justificado por el sinergismo de sus dos componentes, y con la pretensión de retrasar la aparición de posibles resistencias (*Brumfit & Hamilton-Miller, 1993*).

Por su parte, las hidroxinaftoquinonas adquirieron importancia al demostrarse su actividad antimalárica durante la Segunda Guerra Mundial (*Wiselogle, 1946*). La primera en utilizarse fue la lapinona, que actuaba inhibiendo la respiración del *Plasmodium*, pero fue descartada rápidamente porque sólo era activa por vía parenteral (*Steck, 1971*). Entre los años ochenta y noventa se desarrolló la atovacuna, activa por vía oral frente a malaria y *Pneumocystis* (*Gutteridge, 1991*). La diana de la atovacuna es el citocromo bc1 de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (*Fry & Pudney, 1992*).

3.5.2. Sulfamidas y los Polimorfismos de DHPS en *Pneumocystis jirovecii*.

El cotrimoxazol (TMP-SMX), constituye el régimen profiláctico y terapéutico de elección de la PcP (*Berenguer et al., 2004; Podzamczar et al., 2008*). La dapsona es utilizada como agente profiláctico de segunda línea. Tanto el SMX como la dapsona impiden la acción de la DHPS, que cataliza la unión de ácido para-aminobenzoico (PABA) y 7,8-dihidropterin-pirofosfato, formando 7,8-dihidropteroato.

El TMP, por su parte, actúa sobre la DHFR, que cataliza la reducción de dihidrofolato a tetrahidrofolato. Ambas enzimas son fundamentales en la síntesis del ácido fólico, por lo tanto, con la inhibición de su metabolismo se interrumpe la formación de ADN en el microorganismo (**Figura 8**). Sin embargo la acción anti-*Pneumocystis* parece ser casi exclusiva del SMX (*Walzer et al., 1992*).

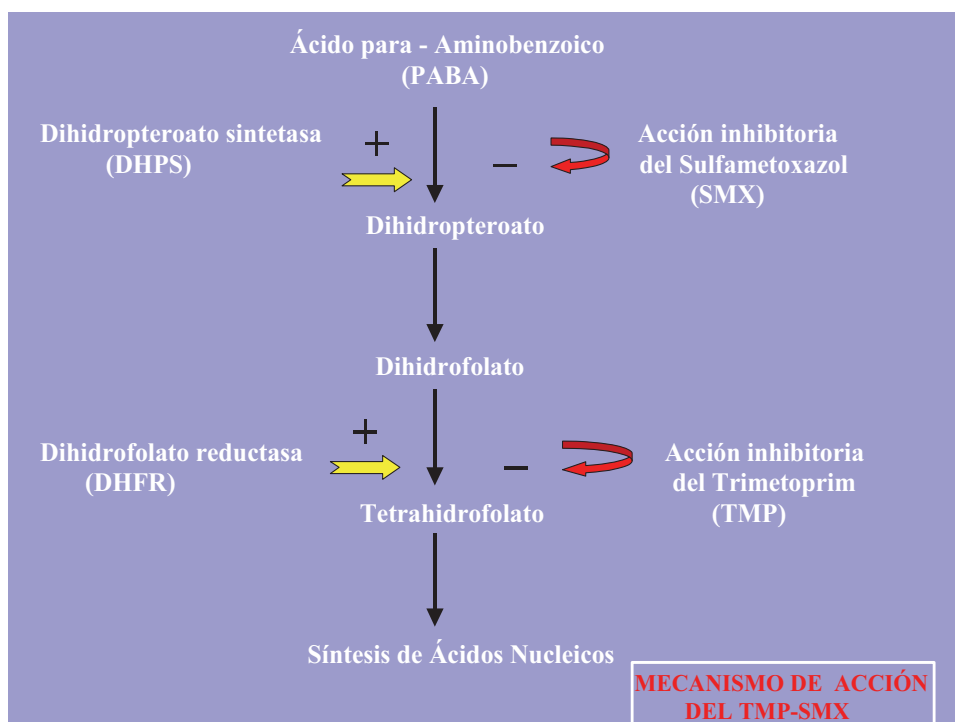


Figura 8: Mecanismo de acción del TMP-SMX.

La resistencia a las sulfamidas y sulfonas está bien caracterizada en *Streptococcus pneumoniae* (*López et al., 1987*), *Neisseria meningitidis* (*Fermer & Swedberg, 1997*), *Escherichia coli* (*Vedantam et al., 1998*), *Mycobacterium leprae* (*Kai et al., 1999*) y *Plasmodium* spp. (*Brooks et al., 1994*). En ellos, la resistencia, surge por mutaciones puntuales en el gen de la DHPS. En el caso de *Plasmodium*, las mutaciones tienden a ser acumulativas en el tiempo, y a determinar varios grados de resistencia (*Sims et al., 1999; Mberu et al., 2000*).

En el caso de *Pneumocystis*, su elevada exposición a las sulfamidas, podría hacer esperar que se desarrollaran resistencias a las mismas. Sin embargo, esta hipótesis no puede confirmarse por métodos clásicos, ya que como *Pneumocystis* no puede cultivarse, no es posible determinar la sensibilidad *in vitro*. Por lo tanto, en la actualidad, la única forma posible de poner de manifiesto la resistencia es de forma indirecta, buscando mutaciones en el gen de la DHPS de *Pneumocystis*. En 1997 fue secuenciado el gen de la DHPS de *Pneumocystis* en muestras de seis pacientes, demostrándose la presencia de polimorfismos especie-específicos (Lane et al., 1997). Todos los polimorfismos eran *nonsynonymous*, es decir, resultado de cambios puntuales en aminoácidos. Esto sugirió por primera vez, que había una presión selectiva sobre *Pneumocystis*, posiblemente como resultado de la exposición a las sulfamidas.

Las mutaciones han sido descritas, basándose en la homología de la DHPS de *E. coli* (Achari et al., 1997). Se localizan en el sitio activo del enzima, en los codones 55 y 57, determinando la sustitución de los aminoácidos treonina (Thr) por alanina (Ala), y prolina (Pro) por serina (Ser) respectivamente, (**Figura 9**). Dichas mutaciones son las mismas que determinan la resistencia a las sulfamidas en *Mycobacterium leprae* (Kai et al., 1999), *Toxoplasma gondii* (Aspinall et al., 2002) y *Plasmodium falciparum* (Triglia et al., 1998). Según el aminoácido presente en las posiciones 55 y 57, Beard clasificó (Beard et al., 2000) los genotipos de DHPS de *Pneumocystis* en los siguientes, genotipo 1, cuando no existe mutación y la cepa es salvaje, o *wild-type* (55Thr, 57Pro); genotipo 2, cuando existe una mutación en la posición 55 (55Ala, 57 Pro); genotipo 3, cuando existe una mutación en la posición 57 (55Thr, 57 Ala); genotipo 4, cuando existe una doble mutación, tanto en la posición 55, como en la 57 (55Ala, 57 Ser). También es posible que existan genotipos mixtos con mezcla de cepa salvaje y cualquiera de los otros genotipos (**Tabla5**).

En varios estudios retrospectivos llevados a cabo en EUA y en Europa, se ha asociado la presencia de dichas mutaciones con una exposición previa a sulfamidas o sulfonas (Kazanjian et al., 1998; Mei et al., 1998; Huang et al., 1999-b; Helweg-Larsen et al., 1999; Ma et al., 1999; Kazanjian et al., 2000). Las mutaciones en la DHPS varían considerablemente en distintas áreas geográficas.

Los porcentajes oscilan entre un 24% y un 75% en diferentes zonas de EUA (Ma et al., 1999), y la oscilación es entre 0 y 73% en una revisión mundial de los porcentajes publicados (**Tabla 6**). No obstante, estas diferencias podrían ser debidas, en parte, a variaciones en la elección del agente profiláctico en cada una de las zonas.

El estudio de mutaciones en el gen de la DHFR, enzima sobre la que actúa el TMP, no se ha asociado con la exposición previa a profilaxis con cotrimoxazol. Lo que apoya la teoría de que la acción anti-*Pneumocystis* del TMP-SMX es debida exclusivamente al SMX.

Surge por tanto la pregunta de si las mutaciones surgen de *novo*, o si las cepas mutantes se transmiten persona a persona. La prevalencia de las cepas mutantes ha ido aumentando durante los años noventa (Armstrong et al., 2000; Kazanjian et al., 1998; Helweg-Larsen et al., 1999). Un estudio demostró que el porcentaje de las mutaciones había pasado de 0% en 1991, a 55% en 1999 (Kazanjian et al., 2000). Además, la observación de que las mutaciones pueden aparecer en porcentajes tan altos como en el 70% de los pacientes que nunca han estado expuesto a las sulfamidas, sugiere que podrían transmitirse persona a persona (Kazanjian et al., 2000); junto con el hecho de la variación geográfica de la prevalencia de dichas mutaciones, entre el 13 y el 70%, en dichos pacientes. También es posible, como ya se ha comentado, que estas diferencias sean debidas al uso de distintos agentes profilácticos según las áreas. Sin embargo, si la transmisión de las mutaciones es persona a persona, se esperaría encontrar una mayor frecuencia en determinadas cepas, pero las mutaciones en la DHPS no aparecen asociadas a cepas específicas (Ma., et al. 2001; Meshnick, et al., 2001), así que el significado de estos hallazgos es incierto.

3.5.3. Significado Clínico de las Mutaciones en la DHPS.

La existencia de casos de PcP en pacientes que reciben profilaxis con sulfamidas sugiere, que las mutaciones en la DHPS confieren al menos un bajo nivel de resistencia, que supera los efectos protectores que otorgan las bajas dosis de sulfamidas, que se administran como profilaxis. Lo que está menos claro es cómo las mutaciones afectan a la respuesta de las dosis con fines terapéuticos y a la evolución del paciente. Los estudios realizados hasta el momento presentan resultados contradictorios, que abren la puerta a la discusión.

- El grupo danés de Helweg-Larsen (*Helweg-Larsen et al. 1999*) afirma que hay una disminución en la supervivencia de los pacientes que presentan mutaciones en la DHPS, respecto de pacientes que presentan la cepa salvaje (*wild-type*) libre de mutaciones, y que su aparición es más común en pacientes que se han expuesto a las sulfamidas, que en los que no las han tomado. Incluso considera la presencia de mutaciones en la DHPS como el factor más importante de mortalidad.
- El grupo americano de Kazanjian (*Kazanjian et al., 2000*) ha puesto de manifiesto que un incremento en la duración de la profilaxis con sulfamidas aumenta las posibilidades de tener mutaciones en la DHPS, independientemente del agente utilizado, y de la dosis administrada. Sin embargo, no hay diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de los pacientes que presentan mutaciones respecto de los que no las presentan.
- Un tercer estudio también americano (*Huang et al., 1999-b*), concluye que la profilaxis con sulfamidas o sulfonas es independiente de la posterior aparición de mutaciones.

Sin embargo, cuando se administran altas dosis de TMP-SMX o dapsona a dosis terapéuticas, son eficaces en el tratamiento de la PcP a pesar de que el paciente presente mutaciones en la DHPS. Pero, ¿qué ocurriría, si una cepa acumulara mutaciones, y determinara un mayor grado de resistencia, como en el caso de la resistencia a penicilina en *Streptococcus pneumoniae*. La consecuencia clínica de esta situación sería la pérdida de la eficacia de las drogas más efectivas frente a *Pneumocystis*.

3.5.4. Atovacuona y Polimorfismos en el Citocromo b de *Pneumocystis*.

La atovacuona inhibe la cadena de transporte electrónico de *Pneumocystis* (*Ittarat et al., 1995*). La actividad anti-*Pneumocystis* de la atovacuona se ve potenciada por su efecto sobre la síntesis de la ubiquinona. La evidencia de que la atovacuona actúa sobre el citocromo b está bien establecida en el *Plasmodium*. En *Pneumocystis* se ha demostrado que la atovacuona se une a la porción Q₀ del citocromo b. El gen que codifica el citocromo b de *Pneumocystis* se secuenció en 1998 (*Walker et al., 1998*). Se han observado mutaciones en la porción Q₀ en pacientes que recibían profilaxis con atovacuona (*Kazanjian et al., 2001*). Sin embargo, no se ha documentado su efecto sobre el tratamiento. Múltiples mutaciones se han descrito en la Q₀ sin que exista similitud entre pacientes (*Kazanjian et al., 2001*), lo que sugeriría que la resistencia a la atovacuona se desarrolla de *novo* en cada paciente.

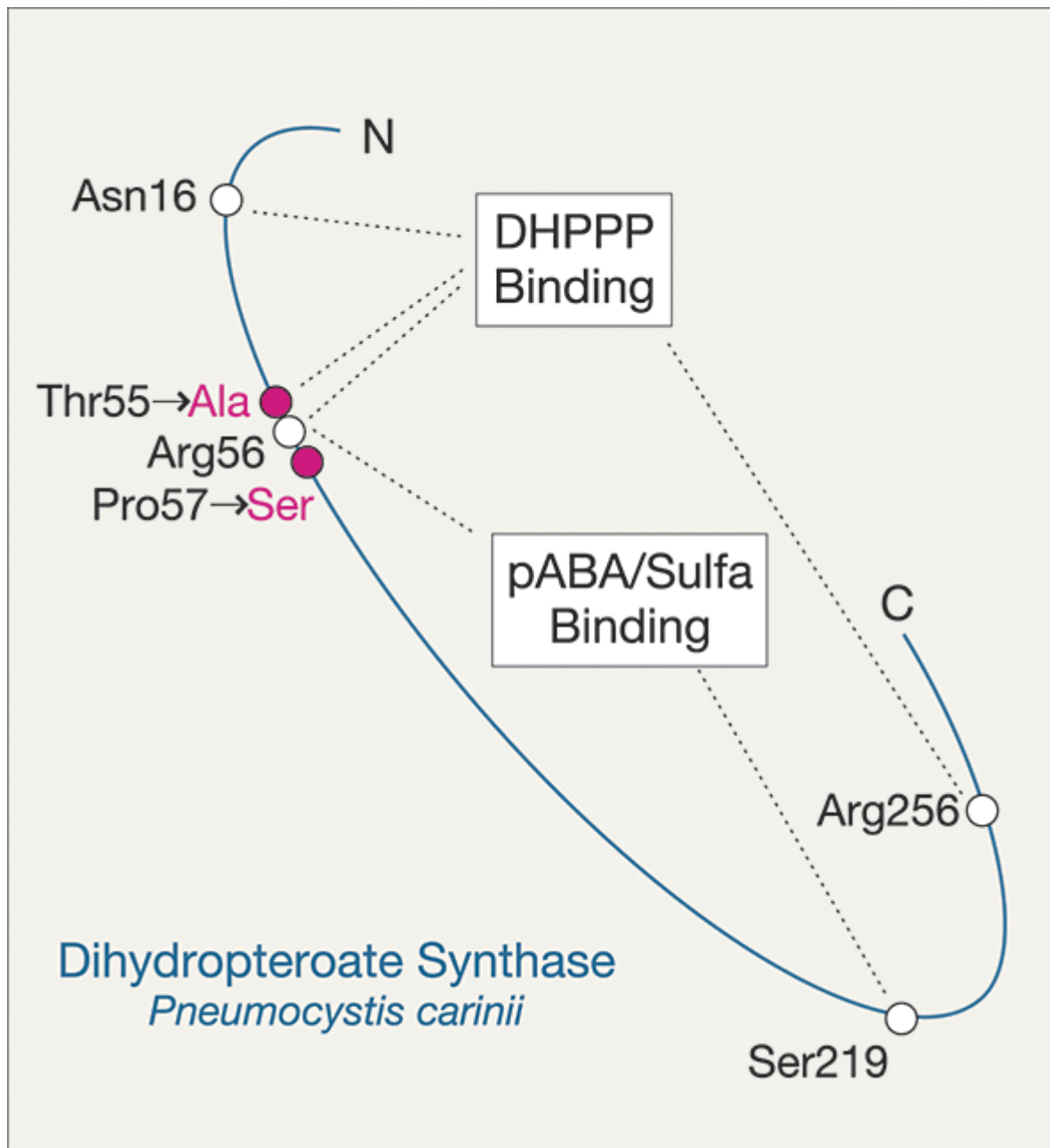


Figura 9: MUTACIONES EN EL SITIO ACTIVO DE LA DHPS (Kovacs et al., 2001)

Diagrama de la enzima DHPS de *P.jirovecii* que muestra la posición de los aminoácidos implicados en el transporte de la 7, 8 dihydropterin-pirofosfato (DHPPP), ácido para-aminobenzoico (pABA) y sulfonamidas (sulfa), basado en la homología de la estructura cristalina del mismo enzima de *E.coli*. Las dos mutaciones más frecuentes asociadas a la resistencia a sulfamidas son Thr55Ala y Pro57Ser.

Tabla 5. Genotipos de DHPS de *Pneumocystis jirovecii*

Genotipo	posición 55 y 57
Salvaje o <i>wild type</i>	(55Thr/ 57 Pro)
Genotipo 2	(55Ala/57 Pro)
Genotipo 3	(55Thr/57 Ser)
Genotipo 4	(55Ala/57 Ser)

Tomada de Beard et al, 2000.

Tabla 6. Prevalencia por países de las mutaciones en la DHPS de *P. jirovecii* en pacientes VIH-positivos.

País	Año	Nº episodios de PcP	Nº mutaciones en DHPS, (%)	Referencia	
EUA	1976-1997	20	7 (35%)	<i>Kazanjan et al. 1998</i>	
	1983-2001	145	58 (40%)	<i>Kazanjan et al. 2004</i>	
	1991-1999	97	42 (43%)	<i>Kazanjan et al. 2000</i>	
	1995-1998	220	152 (69 %)	<i>Beard et al. 2000</i>	
	1996-1999	111	75 (68 %)	<i>Huang et al. 2000</i>	
Dinamarca	1989-1999	152	30 (20%)	<i>Helweg-Larsen et al. 1999</i>	
Francia	1993-1996	120	43 (36 %)	<i>Nahimana et al. 2003</i>	
	1993-1998	30	12 (40%)	<i>Santos et al. 1999</i>	
	1998-2001	83	14 (17%)	<i>Latouche et al. 2003</i>	
Italia	1992-1997	20	7 (35%)	<i>Visconti et al. 2001</i>	
	1994-2001	139	11 (8 %)	<i>Ma et al. 2002</i>	
	1994-2004	154	14 (9%)	<i>Valerio et al. 2007</i>	
Portugal	1994-2000	83	23 (27.7%)	<i>Costa et al. 2003</i>	
	2001-2004	55	4 (7%)	<i>Esteves et al. 2008</i>	
Reino Unido	1992-1993	25	9 (36%)	<i>Miller et al. 2003</i>	
	2000-2001	12	2 (17%)	<i>Miller et al. 2003</i>	
Japón	1994-1999	16	4 (25 %)	<i>Takahashi et al. 2000</i>	
China	1998-2001	15	1 (7%)	<i>Kazanjan et al. 2004</i>	
Zimbawe	1992-1993	14	1 (7 %)	<i>Miller et al. 2003</i>	
Sudáfrica	2000-2002	30	4 (13%)	<i>Zar et al. 2004</i>	
Brasil	1997-2004	70	0 0	<i>Wissmann et al. 2006</i>	
España	Sevilla	2001-2003	15	11 (73.3%)	<i>Montes-Cano et al. 2004</i>
		2001-2004	36	8 (22%)	<i>Esteves et al. 2008</i>
	Multicéntrico	2000-2004	207	7 (3.7%)	<i>Álvarez-Martínez et al. 2008</i>

III. HIPÓTESIS

El trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX), constituye el régimen profiláctico y terapéutico de elección de la PcP (Berenguer et al., 2004; Podzamczar et al., 2008). No obstante, la acción anti-*Pneumocystis* parece ser casi exclusiva del SMX (Walzer et al., 1992).

La resistencia a las sulfamidas y sulfonas está bien caracterizada en *Streptococcus pneumoniae* (López et al., 1987), *Neisseria meningitidis* (Fermer & Swedberg, 1997), *Escherichia coli* (Vedantam et al., 1998), *Mycobacterium leprae* (Kai et al., 1999) y *Plasmodium* spp. (Brooks et al., 1994). En ellos, la resistencia, surge por mutaciones puntuales en el gen de la DHPS. En el caso de *Pneumocystis*, su elevada exposición a las sulfamidas, podría hacer esperar que se desarrollaran resistencias a las mismas. Sin embargo, esta hipótesis no puede confirmarse por métodos clásicos, ya que como *Pneumocystis* no puede cultivarse, no es posible determinar la sensibilidad *in vitro*. Por lo tanto, en la actualidad, la única forma posible de poner de manifiesto la resistencia es de forma indirecta, buscando mutaciones en el gen de la DHPS de *Pneumocystis*.

Se ha descrito la presencia de mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii*, en los codones 55 y 57, que determinan la sustitución de los aminoácidos treonina por alanina, y prolina por serina, respectivamente (Lane et al., 1997). Estas mutaciones se han asociado con la disminución de la sensibilidad de *P. jirovecii* a las sulfamidas y sulfonas. Estudios retrospectivos (Kazanjian et al., 1998; Mei et al., 1998; Huang et al., 1999-b; Helweg-Larsen et al., 1999; Ma et al., 1999; Kazanjian et al., 2000) establecen la posible inducción de resistencias por la propia administración de las sulfamidas como agente profiláctico de la PcP, lo que determina una mayor tasa de fracasos en el tratamiento con dichos agentes, ya que son los fármacos de elección. Sin embargo, existe controversia sobre si este hecho se asocia, o no, a un aumento de mortalidad (Helweg-Larsen et al., 1999; Kazanjian et al., 2000; Huang et al., 1999-b).

Hasta el momento no existían datos de la prevalencia de las mutaciones en España, ni en países de África, ni Sudamérica.

La hipótesis de esta tesis es que la prevalencia de mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* en estos países estará relacionada con la tasa de exposición previa a las sulfamidas, siendo baja cuando la infección por el VIH sea diagnosticada en fases avanzadas.

Conocer por otra parte, el impacto de las mutaciones en la respuesta al tratamiento con TMP-SMX, y en la evolución de la neumonía por *P. jirovecii*, ayudaría, por una parte, a seleccionar el tratamiento antimicrobiano más adecuado, y por otra, a mejorar el pronóstico de la enfermedad y la supervivencia de los pacientes.

IV. OBJETIVOS

1. Desarrollar técnicas de diagnóstico molecular de *Pneumocystis jirovecii* y de tipado del gen de la Dihidropteroato Sintetasa (DHPS) de *P. jirovecii*.
(Artículo 1)

2. Determinar la prevalencia de *P. jirovecii* con mutaciones en el gen de la DHPS, en pacientes VIH- positivos con neumonía por *Pneumocystis* (PcP) en España, en el periodo de la terapia antirretroviral combinada (c-ART).
(Artículo 2)
 - 2.1. Estudiar la asociación entre las mutaciones y la exposición previa a sulfamidas y sulfonas.
 - 2.2. Estudiar los factores pronóstico de mortalidad en la PcP, y el impacto clínico de presencia de mutaciones en la DHPS.

3. Determinar la prevalencia de *P. jirovecii* con mutaciones en el gen de la DHPS, en pacientes VIH- positivos con neumonía por *Pneumocystis* (PcP) en el Hospital Clínic de Barcelona, en el periodo previo a la terapia antirretroviral combinada (pre c-ART), 1989-1995, y compararla con la del periodo c-ART, 2001-2004, en el mismo centro.
(Artículo 3)

4. Conocer la epidemiología de la PcP, y la prevalencia de las mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii*, en África (Sudáfrica y Malawi) y Sudamérica (Brasil).
(Artículos 4, 5 y 6)

V. METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Artículo 1.

**Sensitivity and Specificity of Nested and Real-time PCR for the Detection of
Pneumocystis jiroveci in Clinical Specimens.**

Miriam J. Álvarez-Martínez, José M. Miró, María Eugenia Valls, Asunción Moreno, Paula V. Rivas, Manel Solé, Natividad Benito, Pere Domingo, Carmen Muñoz, Esteban Rivera, Heather J. Zar, Gustavo Wissmann, Ada Diehl, João Prolla, María Teresa Jiménez de Anta, José M. Gatell, Paul E. Wilson, Steven R. Meshnick, and the Spanish PcP Working Group.

Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 56 (2006) 153-160.

Artículo 1.**Sensibilidad y Especificidad de la Nested-PCR y la PCR a Tiempo Real para la Detección de *Pneumocystis jirovecii* en Muestras Clínicas.**

El diagnóstico molecular de *Pneumocystis jirovecii*, antes *P. carinii*, mediante PCR, puede ser una alternativa al diagnóstico histológico en la PcP. Sin embargo, los métodos de nested-PCR utilizados previamente presentaban una baja especificidad, y por tanto, un elevado porcentaje de falsos positivos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar un nuevo método de nested-PCR y de PCR cuantitativa a tiempo real, para la amplificación del gen de la DHPS, y su posterior evaluación, en una serie de diferentes muestras clínicas procedentes de España, Sudáfrica y Brasil. La sensibilidad de ambas técnicas osciló entre el 62.5% y 100%, dependiendo del tipo de muestra. En un subgrupo de 71 muestras positivas para *P. jirovecii*, confirmadas microscópicamente, y 70 muestras negativas, los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 94 % y 81%, para la nested-PCR y, de 94% y 96%, para la PCR cuantitativa a tiempo real, respectivamente. La PCR cuantitativa a tiempo real presentó una especificidad significativamente mejor ($p=0.015$), que la nested-PCR, disminuyendo de esta forma el porcentaje de falsos positivos.

Parasitology

Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jiroveci* in clinical specimens

Miriam J. Alvarez-Martínez^{a,b}, José M. Miró^c, Maria Eugenia Valls^a, Asunción Moreno^c, Paula V. Rivas^c, Manel Solé^d, Natividad Benito^c, Pere Domingo^e, Carmen Muñoz^f, Esteban Rivera^g, Heather J. Zar^h, Gustavo Wissmannⁱ, Ada R.S. Diehl^j, João C. Prolla^j, Maria Teresa Jiménez de Anta^a, José M. Gatell^c, Paul E. Wilson^b, Steven R. Meshnick^{b,*} and the Spanish PCP Working Group¹

^aMicrobiology Department, Hospital Clínic—IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona 08036, Spain

^bDepartment of Epidemiology and Microbiology and Immunology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA

^cInfectious Diseases Service, Hospital Clínic—IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona 08036, Spain

^dPathology Department, Hospital Clínic—IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona 08036, Spain

^eInfectious Diseases Unit, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona 08025, Spain

^fMicrobiology Department, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona 08025, Spain

^gInfectious Diseases Service, Hospital General Universitari Vall d' Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona 08035, Spain

^hDepartment of Pediatric Pulmonology, Red Cross Children's Hospital, University of Cape Town, School of Child and Adolescent Health, 7700 Cape Town, South Africa

ⁱPneumology Postgraduation, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^jLaboratory of Cytopathology, Hospital de Clínicas do Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

Received 3 September 2005; accepted 8 March 2006

Abstract

A polymerase chain reaction (PCR)-based test for *Pneumocystis jiroveci* (formerly *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*) might be an alternative to histologic diagnoses of *P. jiroveci* pneumonia (PCP). However, previously developed nested PCR methods tend to have low specificities (high false-positive rates). In this study, nested and quantitative real-time PCR methods for the amplification of the *P. jiroveci* DHPS (dihydropteroate synthase) gene were evaluated in a variety of stored clinical samples from Spain, South Africa, and Brazil. The sensitivities of both assays were high, ranging from 62.5% to 100% depending on the type of specimen. In a subset of 71 microscopically confirmed PCP cases and 70 negative cases, the sensitivities and specificities were 94% and 81% for nested PCR and 94% and 96% for real-time PCR, respectively. Real-time PCR has a statistically significantly better specificity than nested PCR ($P = .015$) and is likely to generate fewer false positives.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Pneumocystis jiroveci*; Nested PCR; Real-time PCR

1. Introduction

Pneumocystis jiroveci pneumonia (PCP) remains an important cause of morbidity and mortality in HIV-infected patients and in people immunosuppressed from other causes (Benito et al., 2001; Kovacs et al., 2001; Stringer et al.,

2002). Although the incidence of PCP in developed nations has declined as a result of prophylaxis and highly active antiretroviral therapy, it is becoming an increasingly important problem in developing countries (Graham et al., 2000; Ruffini and Madhi, 2002; Zar et al., 2000). In addition, increasing use of cotrimoxazole prophylaxis in HIV-infected patients in developing countries may lead to an increase in drug resistance (Chintu et al., 2004; WHO, 2004).

In developed countries, PCP is usually diagnosed by microscopic examination of induced sputum (IS) or bronchoalveolar lavage (BAL) (Mallolas et al., 1990; Procop et al., 2004). In developing countries, because of

* Corresponding author. Department of Epidemiology, University of North Carolina School of Public Health, Chapel Hill, NC 27599-7435. Tel.: +1-919-966-7414; fax: +1-919-966-2089.

E-mail address: meshnick@unc.edu (S.R. Meshnick).

¹ Spanish PCP Working Group (members are listed in the Acknowledgment).

limited resources, diagnosis of PCP frequently relies on clinical judgment; however, microscopy of IS specimens or nasopharyngeal aspirates has also been used (Fisk et al., 2003).

Microscopic techniques (colorimetric or immunofluorescent) are the standard methods for PCP detection. Among them, Giemsa stain is the most simple and inexpensive and allows to visualized cysts, trophozoites, and sporozoites. Silver–methenamine stain, or Gomori stain, is a specific cyst wall stain and has the same sensitivity for IS or BAL (Pinlaor et al., 2004). Of all the microscopy methods, immunofluorescence may be the most sensitive (Kovacs et al., 1988).

Several groups have been developing polymerase chain reaction (PCR)-based methods to detect *P. jiroveci* in lower respiratory tract specimens and in noninvasive oral washes. (Brancart et al., 2005; Fischer et al., 2001; Flori et al., 2004; Larsen et al., 2002, 2004; Nyamande et al., 2005; Palladino et al., 2001; Ribes et al., 1997; Torres et al., 2000). However, although these methods have good sensitivities, some have reported low specificities (frequent false positives) (Olsson et al., 2001; Larsen et al., 2002). The clinical significance of a PCR-positive, microscopy-negative specimen is not known.

A sensitive and specific PCR method with good concordance with microscopy would be of great use as an alternative to histologic diagnoses. Accordingly, this study was undertaken to compare the sensitivities and specificities of nested and real-time PCR in the diagnosis of PCP using DNA extracted from different types of stored clinical specimens.

2. Materials and methods

2.1. Patients specimens

Specimens used in the study were obtained from Spain (Hospital Clínic, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau and Hospital General Universitari Vall d'Hebrón, Barcelona), South Africa (Red Cross Children's Hospital, Cape Town,

Table 2

Sequence of primers in nested PCR for the DHPS gene

Primer	Sequence (5'–3')
F ₁	5'-CCT GGT ATT AAA CCA GTT TTG CC-3'
B ₄₅	5'-CAA TTT AAT AAA TTT CTT TCC AAA TAG CAT C-3'
AHUM	5'-GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AAT C-3'
BN	5'-GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC-3'

South Africa), and Brazil (Hospital de Clinicas, Porto Alegre) (Table 1). All were unused clinical specimens that were sent to the University of North Carolina (UNC) without personal identifiers; as a result, the study was approved by the UNC Institutional Review Board. *P. jiroveci* pneumonia was diagnosed by the local hospital pathology departments, and these diagnoses were used as the “gold standard”. One hundred eighty-three microscopy-positive specimens from 111 HIV-1–infected patients, with clinical and radiologic characteristics of PCP, were included, as were 70 microscopy-negative samples. These negative specimens were from 39 HIV-1–infected South African children and 28 Spanish immunosuppressed adults from other causes (8 had solid-organ malignancies, 7 had hematological malignancies, 4 had chronic lung diseases, 2 had inflammatory rheumatologic diseases, and 7 had other underlying conditions). Other pathogens were found by culture in the BAL of these Spanish immunosuppressed patients: 10 BAL cultures were positive for bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria* spp., *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus aureus*, and *Klebsiella pneumoniae*), 7 were cultured fungal infection (*Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Rhizomucor* spp., and *Candida* spp.), 2 were cultured mycobacteria (*Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium aureus*), and 2 had evidence of viral infections (varicella-zoster virus, influenza virus type A).

Several types of specimens were obtained (Table 1): alcohol-fixed unstained slides stored at room temperature; 1-mL aliquots of BAL stored at –20 °C; BAL or IS mixed directly with an equal volume of absolute ethanol and stored at 4 °C; and Giemsa-stained, methenamine–silver–stained, and Papanicolaou-stained slides stored at room temperature. Stained slides were tested only if they contained abundant cysts of *P. jiroveci* (i.e., cysts present in more than 50% of microscopy fields).

Investigators performing PCR methods were blinded to the microscopy results.

Table 3

Conditions of nested PCR using Taq polymerase

Step	Cycles	Temperature (°C)	Hold time
Denaturation	1	94	5 min
		95 ^a	15 min ^a
		92	30 s
Annealing	35	52	30 s
		72	60 s
		72	5 min
Termination	1	72	5 min

^a Conditions if HotStarTaq was used.

Table 1

Description and sources of 213 specimens included in the study

Country	n ^a	Type sample	Year obtained	PCP ^b
Spain	42	Frozen BAL (–20 °C)	2001–2004	+
	31	Frozen BAL (–20 °C)	2001–2004	–
	8	BAL unstained slides ^c	2001–2004	+
	8	BAL Giemsa slides	1995	+
	8	BAL silver Mt. slides	1995	+
	8	BAL Papanicolaou slides	1995	+
	29	BAL/IS ethanol (4 °C)	2001–2003	+
Africa ^d	39	BAL/IS ethanol (4 °C)	2001–2003	–
Brazil	20	BAL Giemsa slides	1997–1999	+
	20	BAL Giemsa slides	2002–2003	+

^a Number of samples.

^b *P. jiroveci* diagnosed by microscopy.

^c All slides were stored at room temperature.

^d Samples from children.

Table 4
Sequence of primers and probe in real-time PCR for the DHPS gene

Type	Sequence (5'–3')
Forward primer (DHPS_F)	GCTTGGTCCAAGTCGCAAAA
Reverse primer (DHPS_R)	AGCAGTGCCCCAAATCC
Probe (DHPS_P)	VIC-ATTACAGGGTGTCTTACAGGTGATGTATGCCAA-TAMRA

2.2. Deoxyribonucleic acid extraction

Deoxyribonucleic acid was extracted from slides by the method of Lee et al. (1994). From all other samples, DNA was extracted using the QIAamp DNA mini-kit (Qiagen, Valencia, CA) in accordance with the manufacturer's recommendations. To avoid contamination, we performed DNA extractions and amplifications in separate rooms, and aerosol-barrier pipette tips were used to handle all reagent transfers.

2.3. Nested PCR

The DHPS (dihydropteroate synthase) locus was amplified by a touchdown nested PCR procedure (Kazanjian et al., 1998; Lane et al., 1997) in a PTC-200 programmable thermocycler (MJ Research, Watertown, MA). Two different polymerases, recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA) and HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen), were used, and no difference was found between them. The same primers but different programs in the thermocycler were used for each of the polymerases. In the 1st round of this PCR, the primers F₁ and B₄₅ were used. For the 2nd round, the primers were A_{HUM} and BN (Table 2) (Zar et al., 2004). The PCR mixture in both runs contained template DNA (5 µL) in the 1st round, and 5 µL of the 1st round amplified products in the 2nd round: primers (0.4 µmol/L each); nucleotides (0.2 mmol/L); 2.5 U of polymerase; reaction buffer (each polymerase had its own buffer), and water to a total volume of 100 µL. MgCl₂ (2 mmol/L) was used with recombinant Taq DNA polymerase, but not with HotStarTaq. Positive controls (DNA extracts of *P. jiroveci* with known sequence) and negative controls (molecular biology grade water) were included in every run.

The conditions for the 1st round amplification were 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 92 °C for 30 s, 52 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s, and then a termination step at 72 °C for 5 min. The conditions for the 2nd round of PCR were 94 °C for 5 min, then 35 cycles of 92 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s, followed by a termination step at 72 °C for 5 min. When HotStarTaq polymerase was used, an activation step of 95 °C for 15 min was used instead of 94 °C for 5 min (Table 3).

Table 5
Polymerase chain reaction conditions for real-time assay

Stage	Cycles	Temperature (°C)	Hold time
1	1	95	10 min
2	45	95	15 s
		60	60 s

For analysis of the PCR-generated fragments, 8 µL of each 100 µL of PCR amplification product was applied to a 2% agarose gel, electrophoresed, and visualized with ethidium bromide. Amplifications were considered positive if there was a clear 335-bp band product on an agarose gel. To rule out artifacts, we eluted 335-bp bands from positive samples using QIAquick gel extraction kits (Qiagen) and sequenced at the UNC Sequencing Core Facility by using the ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit (Applied Biosystems). Sequenced analyses were performed using Chromas 2.23 (Technelysium Pty. Ltd., Tewantin, Australia), ClustalX 1.8 (Bethesda, MD), and GeneDoc (Multiple sequence alignment editor, version 2.6.002) and compared with the consensus sequence for the *P. jiroveci* DHPS gene.

2.4. Quantitative real-time PCR

The *P. jiroveci* DHPS gene, cloned into the pCR 2.1 vector (Invitrogen), was used as a standard (supplied by Joe Kovacs, National Institutes of Health). The plasmid was propagated in *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) and purified using the Promega Wizard Plus Minipreps DNA purification system (Promega, Madison, WI). Deoxyribonucleic acid concentration was evaluated according to the absorbance at 260 nm and expressed in copy number of gene per microliter. Tenfold serial dilutions (10¹⁰ to 10⁰ DHPS copies/µL) of linearized plasmid in water were prepared as the DNA carrier and used as a standard for quantification.

DHPS-specific primers and probe were designed using Primer Express software (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), according to the program directions. Primers,

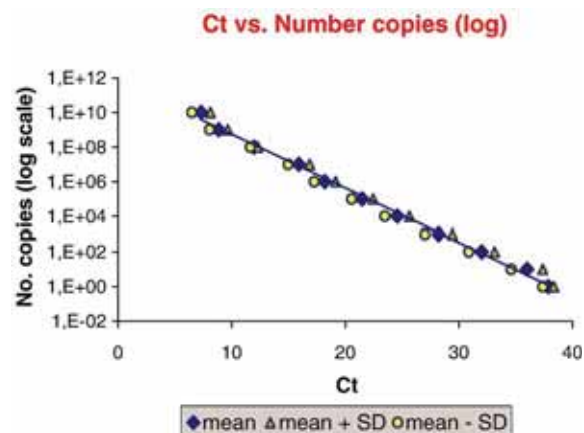


Fig. 1. Standard curve obtained with 10-fold serial dilutions of DHPS control plasmid from 10¹⁰ to 1 copies/µL.

Table 6

Detection of *P. jiroveci* by several diagnostic methods in various types of stored clinical specimens from 143 HIV-1 patients with PCP

Type sample	Microscopy positive, <i>n</i>	Real-time PCR, <i>n</i> (%)	Nested PCR, <i>n</i> (%)
Frozen BAL (–20 °C)	42	40 (95)	40 (95)
BAL/IS ethanol (4 °C)	29	27 (93)	27 (93)
BAL unstained slides	8	5 (62.5)	8 (100)
BAL Giemsa slides	48	39 (81)	36 (75)
BAL silver slides	8	7 (87)	6 (75)
BAL Papanicolaou slides	8	8 (100)	7 (87)
Total	143	126 (88)	124 (87)

synthesized by MWG-Biotech, High Point, NC, were DHPS_F: 5' GCTTGGTCCAAGTCGCAAAA 3' and DHPS_R: 5' CAGCAGTGCCCAAATCC 3'. The probe was synthesized by Applied Biosystems, Foster City, CA, with VIC linked to the 5' position, and TAMRA linked to the 3' end, with a sequence of 5' ATTTACAGGGTGTCT-TACAGGTGATGTTATGCCAA 3' (Table 4).

Real-time PCR reactions were carried out in duplicate in a 25- μ L final volume containing 1 \times TaqMan[®] Universal PCR Master Mix, 0.9 μ mol/L of each primer, 0.25 μ mol/L of probe, 2 μ L of template DNA, and molecular biology grade water to complete the volume. To detect the presence of Human DNA, we added an RNase P primer-probe mix to each reaction mixture (Taqman[®] RNase P Detection kit; Applied Biosystems, Foster City, CA), according to the manufacturer's specifications. All reactions were run on an ABI Prism 7000 sequence detection system (Applied Biosystems) with default settings; each sample was initially denatured at 95 °C for 10 min and cycled 45 times, with each cycle consisting of 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s (Table 5).

P. jiroveci-positive and *P. jiroveci*-negative samples, as determined by previous microscopy, were included in each PCR run. In addition, a water-only control, a DNA extracted from *Plasmodium falciparum*, and dilutions of cloned standards for quantification were included in each PCR run.

Fluorescence measurements were taken, and the threshold cycle (Ct) value for each sample was calculated by determining the point at which the fluorescence exceeds an arbitrary lower limit. Samples were considered positive only if they exceeded the threshold. Performance of the assay for

Table 7

Results of quantitative real-time PCR in various types of stored clinical specimens from 143 HIV-1 patients with PCP

Type sample	Microscopy positive (<i>n</i>)	No. copies DHPS gene/ μ L sample							
		10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	Undetectable
Frozen BAL (–20 °C)	42	1	1	9	11	11	6	1	2
BAL/IS ethanol (4 °C)	29	0	0	0	6	12	5	4	2
BAL unstained slides	8	0	0	0	1	0	2	2	3
BAL Giemsa slides	48	0	0	0	0	6	11	22	9
BAL silver slides	8	0	0	0	0	0	2	5	1
BAL Papanicolaou slides	8	0	0	0	1	1	2	4	0
Total	143	1	1	9	19	30	28	38	17

Table 8

Detection of *P. jiroveci* by nested PCR and real-time PCR in positive and negative specimens

Microscopy	No.	Real-time PCR, <i>n</i> (%)	Nested PCR, <i>n</i> (%)
Positive specimens	71	67 (94)	67 (94)
Negative specimens	70	3 (4)	13 (19)

the quantification was evaluated by analyzing 10-fold serial dilutions of the cloned DHPS template. Standards curves (Ct versus log concentration) were constructed by linear regression, and calculated values for standards and clinical specimens were recorded.

2.5. Data analysis

The sensitivities and specificities of the test were compared by 2-tailed Fisher's exact tests. When comparisons were made among the 6 different sample types and 2 tests, an $\alpha = .005$ was used to control for multiple comparisons.

3. Results

3.1. Quantification of *P. jiroveci* DHPS gene by real-time PCR

Real-time PCR assays were performed on known dilutions of the DHPS-containing plasmids (Fig. 1). All Ct values ranged between 7 and 38. The real-time PCR assay had a detection limit of 1 copy/ μ L of sample. The confidence level of detection at the lower range of 1 copy/ μ L was established by the chance of detecting 1 copy/ μ L running 50 times specimens at this lower concentration. In 50 runs of real-time PCR, the lower concentration of 1 copy/ μ L was detected in 48 runs (96%).

The curve of Ct versus the logarithm of plasmid concentration was linear between 10¹⁰ and 10⁰ copies/ μ L. Five replicates of the diluted plasmid were tested to generate the standard curve. The mean \pm SD has been represented in Fig. 1.

3.2. Sensitivities of PCR methods using different types of stored clinical samples

The sensitivities of nested and real-time PCR methods for different types of stored clinical samples were assessed on

DNA extracted from different specimen types (Table 6). Human DNA was detected in all samples by real-time PCR for human RNase-P (data not shown). Real-time PCR was positive for 126 of 143 microscopy-positive samples (88% sensitivity). Slightly fewer samples (124/143) were positive by nested PCR (87% sensitivity), but the difference was not statistically significant. The sensitivities of the different PCR methods used on different specimen types ranged from 62.5% to 100%. There were no statistically significant differences between either method or between any sample types. The quality of the analysis of the PCR-generated fragments by agarose gel and electrophoresis was compared in HotStarTaq polymerase with regard to Taq DNA polymerase, and any advantage was found. Types and sizes of band product on the agarose gel were similar with both polymerases.

Concentrations of *P. jiroveci* DNA for the different type of stored samples ranged between 1 and 1000 000 copies/ μL . Sixty-seven percent (96/143) of the specimens had concentrations between 100 and 1 copies (Table 7). Five samples were found to be positive by real-time PCR, but negative by nested PCR. The *P. jiroveci* DNA concentration found in these samples was low (10 to 1 copies/ μL).

3.3. Comparison of the sensitivities and specificities of real-time and nested PCR

To compare the sensitivities and specificities of the two PCR methods, we amplified DNA from 71 microscopically confirmed PCP cases and 70 microscopically negative controls (all Spanish and South African BAL samples) by both nested and real-time PCR (Table 8). Human DNA was detected in all samples by real-time PCR for human RNase-P (data not shown). To measure both sensitivity and specificity, we needed both microscopically negative and positive samples and we only had these for the Spanish and South African samples. Also, Spanish and South African specimens were chosen to look at the difference between PCR methods because they were the same type of samples, BAL or IS stored frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ or in ethanol at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ without any kind of stain.

Nested PCR had a sensitivity and specificity of 94% (67/71) and 81% (57/70) respectively. For 67 cases, the amplification product was sequenced and found to be identical to the known DHPS gene sequence (U66282.1 in PubMed Nucleotide database).

Clinical samples were considered positive by real time PCR if their concentrations were over 1 copy of DHPS gene per microliter of sample. All reactions were done in duplicate, and Ct values were averaged between the 2 reactions. Samples were considered positive if they had Ct values under 38 (1 copy/ μL). There were 8 discordant duplicates in which 1 run was positive, with a late Ct value, and the other was negative. For these, a new aliquot of sample was retested and the outlier result discarded. Samples with Ct values over 38 are classified as undetectable.

Bronchoalveolar lavages from 67 microscopy-positive patients had *P. jiroveci* DNA concentrations between 1 and

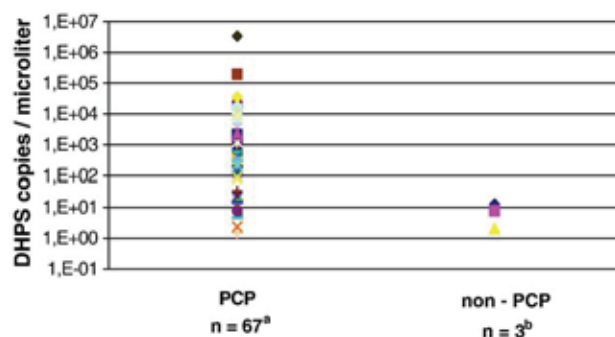


Fig. 2. Quantitative real-time PCR positive results in microscopy-positive BAL and microscopy-negative BAL. ^aFrom a total of 71 patients PCP positive by microscopy. ^bFrom a total of 70 patients PCP negative by microscopy.

10⁶ copies/ μL of sample (1.8×10^4 mean, 1.2×10^5 SD). BALS from 3 microscopy-negative patients had lower *P. jiroveci* concentrations ranging between 10 and 1 copies/ μL (4 mean, 5 SD) (Fig. 2).

The sensitivity and specificity of quantitative real-time PCR were 94% (67/71) and 96% (67/70), respectively, using microscopy as gold standard. The specificity of the real-time method was significantly better than that of nested PCR ($P = .015$).

4. Discussion

This study shows that *P. jiroveci* DNA can be detected in 87% and 88% of stored microscopy-positive clinical specimens by nested and real-time PCR, respectively. There were no significant differences in sensitivities between specimen type and between real-time and nested PCR (both were 94%).

The specificities of the two PCR tests, however, were significantly different ($P < .015$); the specificity of real-time PCR method was better than nested PCR (96% versus 81%).

Real-time PCR test gave a 4% (3/70) of false positivity rate. All these 3 samples presented a very late Ct value, near 38, and low concentrations, between 10 and 1 copies/ μL (Fig. 2). Two of these 3 samples gave a positive result in nested PCR but could not be confirmed by sequencing. However, because microscopy is the “gold standard”, these 3 would be false positive regardless of sequence. Nested PCR method presented a higher false positivity rate of 19% (13/70). The carryover problem in nested PCR could explain the cause of getting high number of false-positive results. Risk of contamination and consequently lower specificity used to be one of the most important problems of nested PCR. Performing double runs in an open system increases the possibility of run-to-run contamination. Therefore, standard precautions should be taken to avoid this problem. Deoxyribonucleic acid extractions and amplifications should be performed in separate rooms and aerosol-barrier pipette tips used to handle all reagent transfers. In contrast, real-time PCR method performed in a closed system limits the

manipulation of the products and, without post-PCR processing, reduces the risk of contamination.

Real-time PCR method offers other advantages; in terms of rapidity and dynamic detection, results could be obtained in less than 3 h compared with more than 12 h required by nested PCR. Traditional PCR is measured at endpoint (plateau), whereas real-time PCR collects data in the exponential growth phase, so the increase in the reporter fluorescent signal is directly proportional to the number of amplicons generated, as a dynamic range. Moreover, real time has the possibility of quantification, let us to determine the concentration of *P. jiroveci* by microliter of sample, that could be useful in identifying carriers of *Pneumocystis* without pneumonia symptoms.

Although real-time PCR require a moderate capital cost in the instrument, a low pretest cost let to consider the real time a suitable method to be adapted in the routine of the microbiology laboratories. The cost of running the completed plate, 96 wells, is around \$30 (approximately \$0.30 by well).

The test sensitivities and specificities reported here are in the same ranges as those reported previously (Table 9). Although 12 of the 16 previous studies reported high sensitivities ($\geq 95\%$), half of these studies reported specificities $< 90\%$. Thus, by using real-time PCR instead of nested PCR to amplify the same *P. jiroveci* target gene, we were able to obtain sensitivity and specificity comparable to the best previously reported values.

The positive predictive value (PPV) of a test is the likelihood that someone who tests positive will truly be positive. At low population prevalences, low specificities lead to low PPVs. Positive predictive value is influenced more by specificity than sensitivity because specificity determines the number of false-positive results. (Aschengrau

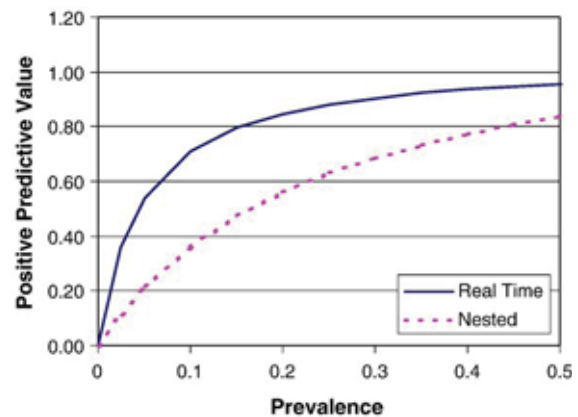


Fig. 3. Positive predictive value of both PCR tests at different PCP prevalences.

and Seage, 2003). The difference observed in this study between the specificities of nested and real-time PCR has a dramatic effect on PPV (Fig. 3). In Fig. 3, PPV has been calculated at different prevalences under Bayes's theorem. Positive predictive value is expressed as follows: $PPV = \frac{Sensitivity * Prevalence}{Sensitivity * Prevalence + (1 - Prevalence) * (1 - Specificity)}$.

At a prevalence of 0.1, for example, real-time PCR has almost twice the PPV of nested PCR (0.71 versus 0.36). Thus, detection of the *P. jiroveci* DHPS gene by real-time PCR would be a much more reliable diagnostic method than its detection by nested PCR.

This study has several limitations. One potential weakness was the use of different microscopic methods performed in different laboratories as the gold standard. The different staining methods themselves could have varying sensitivities and specificities.

However, in current practice, PCP is typically diagnosed by multiple methods in multiple laboratories; pooling these methods to generate a gold standard thus reflects current practice. A second limitation is the method by which stained slides were selected. Because all stained slides used had relatively high cyst counts, the PCR methods might be less sensitive in clinical practice. Also, stained specimens tended to have lower concentrations of *P. jiroveci* than unstained samples. This could be because the stained specimens were older (1995–2003) than unstained specimens (2001–2004) or because the stains themselves could have inhibited DNA extraction (Lee et al., 1994).

In summary, both nested and real-time PCR methods detect *P. jiroveci* DNA in 62.5% to 100% of stored clinical specimens. However, the high rate of false positives associated with nested PCR limits its usefulness. Quantitative real-time PCR, with 1 copy/ μL as detection limit, is much less likely to yield false positives than conventional PCR methods. This, in addition to its low cost and ease of operation, suggests that real-time PCR methods can be useful for the clinical diagnosis of PCP and might be an alternative to histologic diagnoses in the appropriate settings.

Table 9

Diagnostic values of PCR methods using BAL fluid

Author (year)	n	Sensitivity (%)	Specificity (%)
<i>Single PCR</i>			
Roux et al. (1994)	132	86	98.7
Ribes et al. (1997)	129	100	79.3
Helweg-Larsen et al. (1998)	61	100	91
Sing et al. (2000)	134	100	100
Pinlaor et al. (2004)	21	100	90
<i>Nested PCR</i>			
Atzori et al. (1995)	27	96	100
Rabodonirina et al. (1997)	127	100	77
Savoia et al. (1997)	128	91	93
Weig et al. (1997)	46	100	72.2
Sing et al. (2000)	134	100	97.5
Torres et al. (2000)	47	100	86.2
Olsson et al. (2001)	34	87.5	58.3
Larsen et al. (2002)	49	94.7	63.4
Flori et al. (2004)	173	100	87
<i>Real-time PCR</i>			
Larsen et al. (2002)	49	84	93.4
Flori et al. (2004)	173	100	84.9

Acknowledgments

The authors thank Tamara Nun and Alisa Alker for their assistance in the laboratory and Joe Kovacs for supplying plasmid DNA. The expert assistance of the microbiology laboratory staff of Hospital Clínic, Barcelona, Spain, is gratefully acknowledged. Laboratory work at UNC was supported by NIH grant 1R01 AI 46966. Work in Spain was supported by the Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España (FIPSE, grant 24298/01), National AIDS Plan Secretariat from Spanish Ministry of Health, Abbott Laboratories, Behringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, GlaxoSmithKline, Merck Sharp, and Dohme, by the Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA del FIS (Red de Grupos 173). M.J.A.-M. was a recipient of a Research Grant from Fundació Clínic, Barcelona, and from the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). J.M.M. was a recipient of a Research Grant from the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain. The study in South Africa was supported by a BMS Secure the Future Grant.

Members of the Spanish PCP Working Group are M.J. Alvarez-Martínez, J.M. Miró, A. Moreno, M.E. Valls, M. Solé, N. de Benito, P. Rivas, O. Sued, F. García, E. Martínez, J. Mallolas, M.T. Jiménez de Anta, and J.M. Gatell (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer—Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona); P. Domingo and C. Muñoz (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona); E. Ribera and V. Falcó (Hospital General Universitari Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain); J. Arrizabalaga, (Hospital Nuestra Señora de Aránzazu, Donostia, Spain); M.E. Cordero (Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla); M. Santín and D. Podzamczek (Hospital Príncipe d'Asturias, Bellvitge, Barcelona, Spain); G. Sirera, C. Tural, and B. Clotet (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain); J.R. Arribas (Hospital La Paz, Madrid, Spain); M. Saumoy and F. Vidal (Hospital Juan XIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona, Spain); G. Navarro and F. Segura (Hospital de Sabadell, Barcelona, Spain); M. Riera and J. Murillas (Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Spain); and M.C. Pérez (Hospital Son Llaçer, Palma de Mallorca, Spain).

References

Aschengrau A, Seage GR (2003) Screening in public health practice. In *Essentials of Epidemiology in Public Health*. Eds, A Aschengrau and R Seage III. Sudbury (MA): Jones and Bartlett Publishers, pp 412–417.

Atzori C, Lu JJ, Jiang B, Bartlett MS, Orlando G, Queener SF, Smith JW, Cargnel A, Lee CH (1995) Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients by using polymerase chain reactions on serum specimens. *J Infect Dis* 172:1623–1626.

Benito N, Rano A, Moreno A, Gonzalez J, Luna M, Agusti C, Danes C, Pumarola T, Miro JM, Torres A, Gatell JM (2001) Pulmonary infiltrates in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era in Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27:35–43.

Brancart F, Rodríguez-Villalobos H, Fonteyne P-A, Peres-Bota D, Liesnard C (2005) Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *J Microbiol Methods* 61:381–387.

Chintu C, Bhat GJ, Walker AS, Mulenga V, Sinyinza F, Lishimpi K, Farrelly L, Kaganson N, Zumla A, Gillespie SH, Nunn AJ, Gibb DM, CHAP trial team (2004) Co-trimoxazole as prophylaxis against opportunistic infections in HIV-infected Zambian children (CHAP): a double-blind randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 364:1865–1871.

Fischer S, Gill VJ, Kovacs J, Miele P, Keary J, Silcott V, Huang S, Borio L, Stock F, Fahle G, Brown D, Hahn B, Townley E, Lucey D, Masur H (2001) The use of oral washes to diagnose *Pneumocystis carinii* pneumonia: a blinded prospective study using a polymerase chain reaction-based detection system. *J Infect Dis* 184:1485–1488.

Fisk DT, Meshnick S, Kazanjian PH (2003) *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 36:70–78.

Flori P, Bellele B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, Lucht F, Sung RT (2004) Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* 53(Pt 7):603–607.

Graham SM, Mtitimila EI, Kamanga HS, Walsh AL, Hart CA, Molyneux ME (2000) The clinical presentation and outcome of *Pneumocystis carinii* pneumonia in Malawian children. *Lancet* 355:369–373.

Helweg-Larsen J, Jensen JS, Benfield T, Svendsen UG, Lundgren JD, Lundgren B (1998) Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. *J Clin Microbiol* 36:2068–2072.

Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, Cannon M, Meshnick SR (1998) *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* 12:873–878.

Kovacs JA, Ng VL, Masur H, Leoung HG, Hadley WK, Evans G, Lane HC, Ognibene FP, Shelhamer J, Parrillo JE, et al (1988) Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 318:589–593.

Kovacs JA, Gill VJ, Meshnick S, Masur H (2001) New insight into transmission diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *JAMA* 286:2450–2460.

Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, Meshnick SR (1997) Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 175:482–485.

Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, Gill VJ, Silcott A, Kogulan P, Maenza J, Smith M, Lucey DR, Fischer SH (2002) Development and evaluation of quantitative, touch-down real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 40:490–494.

Larsen HH, Huang L, Kovacs JA, Crothers K, Silcott VA, Morris A, Turner JR, Beard CB, Masur H, Fischer S (2004) A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 189:1679–1683.

Lee CH, Wang J, Durkin M, Brady S, Bartlett M, Smith J (1994) Amplification of *Pneumocystis carinii* DNA on specimens scraped from slides. *Diagn Microbiol Infect Dis* 18:197–99.

Mallolas J, Valls ME, Miro JM, Gatell JM, Xaubet A, Picado C, Jimenez de Anta MT, Soriano E (1990) Diagnosis of pneumonia caused by *Pneumocystis carinii* using induced sputum. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 8:511–513.

Nyamande K, Lalloo UG, York D, Naidoo M, Irusen EM, Chetty R (2005) Low sensitivity of a nested polymerase chain reaction in oropharyngeal washings for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. *Chest* 128:167–171.

Olsson M, Stralin K, Holmberg H (2001) Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect* 7:492–497.

Palladino S, Kay I, Fonte R, Flexman J (2001) Use of real-time PCR and the LightCycler system for the rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39:233–236.

- Pinlaor S, Moosikapun P, Pinlaor P, Phunmanee A, Pipitgool V, Sithithaworn P, Chumpia W, Sithithaworn J (2004) PCR diagnosis of *Pneumocystis carinii* on sputum and bronchoalveolar lavage samples in immuno-compromised patients. *Parasitol Res* 94:213–218.
- Procop GW, Haddad S, Quinn J, Wilson ML, Henshaw NG, Reller LB, Artymyshyn RL, Katanik MT, Weinstein MP (2004) Detection of *Pneumocystis jiroveci* in respiratory specimens by four staining methods. *J Clin Microbiol* 42:3333–3335.
- Rabodonirina M, Raffenot D, Cotte L, Boibieux A, Mayencon M, Bayle G, Persat F, Rabatel F, Trepo C, Peyramond D, Piens MA (1997) Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from human immunodeficiency virus-infected patients: use of a simple DNA extraction procedure and nested PCR. *J Clin Microbiol* 35:2748–2751.
- Ribes JA, Limper AH, Espy MJ, Smith TF (1997) PCR detection of *Pneumocystis* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 35:830–835.
- Roux P, Lavrard I, Poirot JL, Chouaid C, Denis M, Olivier JL, Nigou M, Miltgen M (1994) Usefulness of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *J Clin Microbiol* 32:2324–2326.
- Ruffini DD, Madhi SA (2002) The high burden of *Pneumocystis carinii* pneumonia in African HIV-1 infected children hospitalized for severe pneumonia. *AIDS* 16:105–112.
- Savoia D, Millesimo M, Cassetta I, Forno B, Caramello P (1997) Detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification in human immunodeficiency virus-positive patients. *Diagn Microbiol Infect Dis* 29:61–65.
- Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, Russmann H, Tybus K, Pfaff F, Bogner JR, Emminger C, Heesemann J (2000) Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *J Clin Microbiol* 38:1461–1467.
- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE (2002) A new name *Pneumocystis jiroveci* for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 8:891–896.
- Torres J, Goldman M, Wheat LJ, Tang X, Barlett MS, Smith JW, Allen SD, Lee C-H (2000) Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients with polymerase chain reaction: a blinded comparison to standard methods. *Clin Infect Dis* 30:141–145.
- Weig M, Klinker H, Bogner BH, Meier A, Gross U (1997) Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patient groups. *J Clin Microbiol* 35:1445–1449.
- World Health Organization. Joint WHO/UNAIDS/UNICEF (2004) Statement on Use of Cotrimoxazole as Prophylaxis in HIV-infected Children. Geneva (Switzerland): WHO.
- Zar HJ, Dechaboon A, Hanslo D, Apolles P, Magnus KG, Hussey G (2000) *Pneumocystis carinii* pneumonia in South African children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 19:603–607.
- Zar HJ, Alvarez-Martinez MJ, Harrison A, Meshnick SR (2004) Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. *Clin Infect Dis* 39:1047–1051.

Artículo 2.

***Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Spanish HIV-Infected Patients in the Combined Antiretroviral Therapy Era: Prevalencia of DHPS Mutations and Prognostic Factor of Mortality.**

Miriam J. Álvarez-Martínez, Asunción Moreno, José M. Miró, María Eugenia Valls, Paula V. Rivas, Elisa de Lazzari, Omar Sued, Natividad Benito, Pere Domingo, Esteban Rivera, Miguel Santin, Guillermo Sirera, Ferràn Segura, Francesc Vidal, Francisco Rodríguez, Melchor Riera, María Elisa Cordero, José Ramón Arribas, María Teresa Jiménez de Anta, José M. Gatell, Paul E. Wilson, Steven R. Meshnick, and the Spanish PcP Working Group.

Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases (2008) June 11, [Epub ahead of print].

Artículo 2.**Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en Pacientes Españoles Infectados por VIH-1 en la Era de la Terapia Antiretroviral Combinada: Prevalencia de las Mutaciones en DHPS y Factores Pronóstico de Mortalidad.**

La incidencia de la PcP en los pacientes VIH-positivos ha disminuido gracias a la introducción de la profilaxis con sulfamidas y a la c-ART. La influencia de las mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* en la supervivencia de los pacientes con PcP es controvertida, y no ha sido estudiada en España.

Este estudio incluyó a 207 pacientes VIH-positivos diagnosticados de PcP entre el año 2000 y el 2004, procedentes de 12 hospitales españoles. Las variables clínico-epidemiológicas de cada uno de los pacientes se registraron en un cuaderno de recogida de datos (CRD) estandarizado (*Anexo 1*). El genotipado de la DHPS se realizó mediante nested-PCR seguida de secuenciación, y PCR cuantitativa a tiempo real, en LBA ó EI, previamente confirmados como positivos para *P. jirovecii* mediante microscopía. Se analizaron, mediante regresión logística, los factores de riesgo de ingreso en UCI y mortalidad.

Siete pacientes (3.7%; 95% IC, 1.5%-7.5%) presentaron mutaciones en el gen de la DHPS. La mortalidad global fue del 15% (95% IC, 10%-21%), elevándose a 80% en los pacientes que requirieron ventilación mecánica. Ninguno de los pacientes con mutaciones en la DHPS murió, ni necesitó ingreso en UCI, ni ventilación mecánica. Presentar una $Pao_2 < 60\text{mmHg}$ al ingreso se mostró como un factor de riesgo de ingreso en UCI ($p=0.01$), mientras que haber tomado c-ART previamente era un factor protector ($p=0.009$). Presentar una $Pao_2 < 60\text{mmHg}$ al ingreso, y el ingreso en UCI durante la primera semana, se asociaron a mayor mortalidad ($p=0.03$ y $p < 0.001$, respectivamente).

La prevalencia de mutaciones en el gen de la DHPS en España en la era de la c-ART es baja, y no está asociada a un peor pronóstico. La insuficiencia respiratoria severa al ingreso determina el pronóstico de la PcP.



Pneumocystis jirovecii pneumonia in Spanish HIV-infected patients in the combined antiretroviral therapy era: prevalence of dihydropteroate synthase mutations and prognostic factors of mortality[☆]

Miriam J. Alvarez-Martínez^a, Asunción Moreno^{a,*}, José M. Miró^a, Maria Eugenia Valls^a, Paula V. Rivas^a, Elisa de Lazzari^a, Omar Sued^a, Natividad Benito^a, Pere Domingo^b, Esteban Ribera^c, Miguel Santín^d, Guillermo Sirera^e, Ferràn Segura^f, Francesc Vidal^g, Francisco Rodríguez^h, Melchor Rieraⁱ, Maria Elisa Cordero^j, José Ramón Arribas^k, Maria Teresa Jiménez de Anta^a, José M. Gatell^a, Paul E. Wilson^l, Steven R. Meshnick^l
Spanish PCP Working Group^m

^aHospital Clínic-IDIBAPS, Universitat de Barcelona, Barcelona 08036, Spain

^bHospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona 08025, Spain

^cHospital General Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona 08035, Spain

^dHospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Universitat de Barcelona, Hospital de Llobregat, Barcelona 08907, Spain

^eHospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona 08916, Spain

^fHospital Parc Taulí, Sabadell, Barcelona 08208, Spain

^gHospital Joan XXIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona 43007, Spain

^hHospital de Donostia, San Sebastián, Spain

ⁱHospital de Son Dureta, Palma de Mallorca 07014, Spain

^jHospital Virgen del Rocío, Sevilla 41013, Spain

^kHospital de la Paz, Madrid 28040, Spain

^lDepartment of Epidemiology and Department of Microbiology and Immunology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27514, USA

^mSpanish PCP Working Group (members are listed below)^l

Received 8 November 2007; accepted 16 April 2008

Abstract

The incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PCP) in HIV-infected patients has decreased thanks to sulfa prophylaxis and combined antiretroviral therapy. The influence of *P. jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) gene mutations on survival is controversial and has not been reported in Spain. This prospective multicenter study enrolled 207 HIV-infected patients with PCP from 2000 to 2004.

[☆] This study was presented in part at the XV International AIDS Conference, Bangkok, Thailand, July 11–16, 2004. Low prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) mutations in Spanish HIV-1 infected patients with *P. jirovecii* pneumonia. Abstract MoPeB3216. 12th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Boston, MA, February 22–27, 2005. Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene in Spanish HIV-1-infected patients. Abstract 882.

* Corresponding author. Infectious Diseases Service, Universitat de Barcelona, Hospital Clínic-IDIBAPS, Villarroel, 170, Barcelona 08036, Spain. Tel.: +34-93-2275586; fax: +34-93-4514438.

E-mail address: amoreno@clinic.ub.es (A. Moreno).

¹ The members of the Spanish PCP Working Group are M.J. Alvarez-Martínez, J.M. Miró, A. Moreno, M.E. Valls, M. Solé, N. Benito, P. Rivas, O. Sued, F. García, E. Martínez, J. Mallolas, C. Agustí, M.T. Jiménez de Anta, A. Torres and J.M. Gatell (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi I Sunyer—Hospital Clínic, Universitat de Barcelona, Barcelona); P. Domingo and C. Muñoz (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona), E. Ribera and V. Falcó (Hospital General Universitari Vall d'Hebrón, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona); F. Rodríguez, J. Arrizabalaga (Hospital de Donostia, San Sebastián); M.E. Cordero (Hospital Universitari Virgen del Rocío, Sevilla); M. Santín and D. Podzamczar (Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Universitat de Barcelona, L' Hospitalet de Llobregat, Barcelona); G. Sirera, C. Tural and B. Clotet (Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona); J.R. Arribas (Hospital La Paz, Madrid); M. Saumoy and F. Vidal (Hospital Joan XIII, Universitat Rovira i Virgili, Tarragona); G. Navarro, M. Sala, and F. Segura (Hospital Parc Taulí, Sabadell, Barcelona); M. Riera and J. Murillas (Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca); and M.C. Pérez (Hospital Son Llatzer, Palma de Mallorca).

Molecular genotyping was performed on stored specimens. Risk factors for intensive care unit (ICU) admission and mortality were identified using a logistic regression model. Seven patients (3.7%; 95% confidence interval [CI], 1.5–7.5%) had DHPS mutations. Overall mortality was 15% (95% CI, 10–21%), rising to 80% (95% CI, 61–92%) in patients requiring mechanical ventilation. None of the patients with DHPS mutants died, nor did they need ICU admission or mechanical ventilation. PaO₂ <60 mm Hg at admission was a predictor of ICU admission ($P = 0.01$), and previous antiretroviral therapy predicted non-ICU admission ($P = 0.009$). PaO₂ <60 mm Hg at admission and ICU admission during the 1st week were predictors of mortality ($P = 0.03$ and $P < 0.001$, respectively). The prevalence of DHPS mutants in Spain is low and is not associated with a worse outcome. Severe respiratory failure at admission is the strongest predictor of PCP outcome.

© 2008 Published by Elsevier Inc.

Keywords: *Pneumocystis pneumonia*; DHPS mutations; HIV infection; cART; Outcome

1. Introduction

The morbidity and mortality of *Pneumocystis jirovecii* (formerly *Pneumocystis carinii*) pneumonia (PCP) in HIV-infected patients has changed because of the systematic use of sulfa prophylaxis, adjunctive steroids in the acute episodes, and combined antiretroviral therapy (cART) (Huang, 2005). The incidence of PCP in Spain has decreased over the last 2 decades (Benito et al., 2001; San-Andrés et al., 2003) from 20 cases per 100 exposed patients/year in 1987, when sulfa prophylaxis was introduced, to 10 cases per 100 exposed patients/year in 1996, when cART was started. It currently stands at 0.1 cases per 100 exposed patients/year (Benito et al., 2001; San-Andrés et al., 2003). Nevertheless, PCP is still the 2nd most common HIV-related illness in Spain (21.7%) after tuberculosis (Boletín Epidemiológico Semanal [BES], 2005). In the early 1990s, mortality due to PCP was 28% (Fernández et al., 1995), rising to 40% in intensive care unit (ICU) patients and to 79% in patients who required mechanical ventilation (Alvés et al., 2001; Fernández et al., 1995).

The factors affecting mortality rates of PCP in HIV-infected patients during the cART era have been analyzed in the literature. Several studies have evaluated the influence of cART and sulfa prophylaxis on the outcome of PCP. A study found that cART improved survival in HIV-infected patients with severe PCP (Morris et al., 2003). However, another study showed that the improved survival for HIV-infected patients with severe PCP was independent of cART and reflected general improvements in ICU management of respiratory failure rather than improvements in the management of PCP (Miller et al., 2006).

Published studies worldwide have reported the presence of mutations in the *P. jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) gene (Table 1) (Beard et al., 2000; Costa et al., 2003; Diop Santos et al., 1999; Esteves et al., 2008; Helweg-Larsen et al., 1999; Huang et al., 2000; Kazanjian et al., 1998, 2000, 2004; Latouche et al., 2003; Ma et al., 2002; Miller et al., 2003; Montes-Cano et al., 2004; Nahimana et al., 2003; Takahashi et al., 2000; Valerio et al., 2007; Visconti et al., 2001; Wissmann et al., 2006; Zar et al., 2004), although the role of DHPS mutations in response to treatment and outcome is controversial. These mutations, which are found on the sulfa binding site, are associated with sulfa

prophylaxis failure (Armstrong et al., 2000; Beard et al., 2000; Kazanjian et al., 1998; Lane et al., 1997; Ma et al., 1999; Mei et al., 1998). However, although 3 studies found that they were associated with poor treatment outcome (Helweg-Larsen et al., 1999; Kazanjian et al., 2000; Valerio et al., 2007), the 4th did not (Navin et al., 2001). Recently, it has been found that the outcome and mortality of HIV-associated pneumonia containing *P. jirovecii* DHPS mutations are related to the underlying severity of illness and the initial severity of PCP more than to the presence of mutations (Crothers et al., 2005).

The impact of *P. jirovecii* DHPS gene mutations on the outcome of PCP in Spanish HIV-infected patients has not been reported. Accordingly, this study was undertaken i) to document the prevalence of *P. jirovecii* DHPS mutations in Spanish HIV-infected patients with PCP during the cART era, ii) to describe the influence of the mutations on the outcome and survival of these patients, and iii) to analyze mortality rates in HIV-infected patients with PCP during the cART era in Spain and identify the prognostic factors associated with poor outcome determined by ICU admission or death.

2. Materials and methods

A prospective multicenter study including 207 consecutive HIV-infected patients with PCP from 12 Spanish hospitals (Hospital Clínic [57 patients], Hospital Santa Creu i Sant Pau [22], Hospital Vall d'Hebrón [17], Hospital de Bellvitge [19], Hospital Germans Trias i Pujol [35], Hospital Parc Taulí de Sabadell [5], Barcelona; Hospital Joan XXIII [5], Tarragona; Hospital Son Dureta [17] and Hospital Son Llatzer [1], Mallorca; Hospital de Donostia [13], San Sebastian; Hospital Virgen del Rocío [15], Seville; and Hospital La Paz [1], Madrid) was performed between January 2000 and April 2004. Seven centers were in the northeast (Catalonia), 2 in the east (Mallorca), 1 in the north (San Sebastian), 1 in the center (Madrid), and another in the south (Seville). PCP infection was confirmed microscopically by bronchoalveolar lavage (BAL) or induced sputum (IS) as part of routine diagnostic procedures by local hospital microbiology or pathology departments. Frozen aliquots or alcohol-fixed slides of the clinical specimens were sent to the University of North Carolina (UNC, Chapel Hill, NC)

Table 1
Prevalence of *P. jirovecii* DHPS mutants in HIV patients around the world

Country	Years of the study	No. of PCP episodes	No. of DHPS mutants (%)	Reference
United States	1976–1997	20	7 (35%)	Kazanjian et al. (1998)
	1983–2001	145	58 (40%)	Kazanjian et al. (2004)
	1991–1999	97	42 (43%)	Kazanjian et al. (2000)
	1995–1998	220	152 (69%)	Beard et al. (2000)
	1996–1999	111	75 (68%)	Huang et al. (2000)
Denmark	1989–1999	152	30 (20%)	Helweg-Larsen et al. (1999) ^a
France	1993–1996	120	43 (36%)	Nahimana et al. (2003) ^a
	1993–1998	30 ^b	12 (40%)	Santos et al. (1999)
	1998–2001	83	14 (17%)	Latouche et al. (2003)
Italy	1992–1997	20	7 (35%)	Visconti et al. (2001)
	1994–2001	139	11 (8%)	Ma et al. (2002) ^a
	1994–2004	154	14 (9%)	Valerio et al. (2007) ^a
Portugal	1994–2000	83	23 (27.7%)	Costa et al. (2003)
	2001–2004	55 ^c	4 (7%)	Esteves et al. (2008) ^a
UK	1992–1993	25	9 (36%)	Miller et al. (2003)
	2000–2001	12	2 (17%)	Miller et al. (2003)
Japan	1994–1999	16	4 (25%)	Takahashi et al. (2000) ^a
China	1998–2001	15	1 (7%)	Kazanjian et al. (2004)
Zimbabwe	1992–1993	14	1 (7%)	Miller et al. (2003)
South Africa	2000–2002	30	4 (13%)	Zar et al. (2004)
Brazil	1997–2004	70	0	Wissmann et al. (2006)
Spain				
	Seville	2001–2003	15	11 (73.3%)
	2001–2004	36 ^d	8 (22%)	Esteves et al. (2008) ^a
Multicenter	2000–2004	207	7 (3.7%)	Present study

^a Subcloning was performed.

^b HIV status of patients was not provided.

^c Four patients were HIV-negative patients.

^d From a total of 53 patients (19 HIV-positive patients and 34 HIV-negative patients).

without personal identifiers, where the DHPS locus was amplified by nested polymerase chain reaction and genotyped by direct DNA sequencing, as described elsewhere (Alvarez-Martínez et al., 2006; Zar et al., 2004). The study was approved by the research and ethics committees (institutional review board [IRB]) of the Spanish hospitals and the UNC, where it received a category 4 exemption from the UNC IRB.

Investigators performing PCR methods were blinded to the clinical information. *P. jirovecii* DHPS genotypes were classified as described elsewhere (Kazanjian et al., 1998; Lane et al., 1997) as wild-type genotype or mutant genotype (if they presented nonsynonymous changes that resulted in amino acid positions 55 and/or 57 or mixed genotypes that included at least 1 mutant genotype).

A standard form including epidemiologic and clinical data was completed for each patient. The following variables were included: age, gender, risk factors for HIV infection, AIDS-defining events, time since AIDS diagnosis, previous cART (3 or more antiretroviral drugs for at least during 3 months any time before PCP diagnosis), primary PCP prophylaxis, previous PCP episode, treatment of that episode, clinical symptoms and their duration (cough, fever, and dyspnea), radiologic evidence on admission (normal, unilateral or bilateral infiltrates, cavities), blood test on admission (level of hemoglobin [g/dL], leukocytes, platelet, and lymphocyte

count [cells/10⁹/L], CD4⁺ count [$\times 10^6$ cells/L], HIV viral load [log₁₀ copies/mL], C-reactive protein [mg/dL], serum albumin [mg/dL], and serum lactate dehydrogenase [LDH] [U/L]), blood gas parameters (pH, PaO₂; PaCO₂; FiO₂, inspiratory oxygen fraction; PaO₂/FiO₂ ratio; PAO₂–PaO₂ alveolar to arterial difference in oxygen tension), treatment of PCP episode, failure of treatment and causes, adjunctive corticosteroids, need for mechanical ventilation, ICU admission, death, cause of death, and follow-up at 3 and 6 months.

Significant exposure to sulfa agents, therapy failure, successful response to sulfa treatment, and death due to PCP were defined in accordance with Kazanjian et al. (1998, 2000).

2.1. Statistical analysis

The statistical analysis was performed using STATA (StataCorp. 2003, Stata Statistical Software: Release 8.2; Stata Corporation, College Station, TX). Quantitative variables were described using the median and interquartile range (IQR) and compared between groups with the Wilcoxon rank-sum test. Qualitative characteristics were described using absolute frequency and percentage and compared between groups with Fisher's exact test. Risk factors for ICU admission and in-hospital mortality were identified using a logistic regression model. All factors with a univariate *P* value less than 0.1 were included in the model in a stepwise fashion. Models were compared using the log-likelihood ratio test, and

the goodness-of-fit of the final model was assessed using the Hosmer–Lemeshow test. In the analysis of risk factors for ICU admission, 6 patients who died in the infectious diseases wards because severe comorbidities excluded them from ICU admission were not included. In the analysis of in-hospital mortality, all patients were included. Clinically relevant variables and those with a univariate P value <0.1 were selected in a stepwise fashion. All tests were 2 tailed, and the confidence level was set at 95%.

3. Results

The study included 207 consecutive HIV-infected patients with PCP from January 2000 to April 2004 in 12 Spanish hospitals. The DHPS gene was successfully amplified from 185 (98%) samples obtained by BAL and 3 (2%) by IS in 188 patients. There were no differences in the clinical characteristics between the 188 patients with PCP in this study and the 19 remaining patients for whom DNA could not be amplified (data not shown).

Only 7 of the 188 patients (3.7%; 95% confidence interval [CI], 1.5–7.5%) presented a DHPS mutation. Five had a homogeneous population of organisms with single DHPS mutations, 1 contained a homogeneous population with 2 DHPS mutations at positions 55 and 57, and 1 contained a heterogeneous population of organisms with both DHPS genotypes, wild-type, and a single mutation at position 55 (Table 2).

The demographic, clinical, outcome, and follow-up characteristics of the 188 HIV-infected patients with PCP, according to whether mutations were present or absent, are shown in Table 3.

Six of the 7 patients harboring DHPS mutations were male, and their median age was 42 years. PCP was the AIDS-defining illness in 3; the other 4 patients had been diagnosed with HIV previously but had poor adherence to antiretroviral therapy. Patients carrying DHPS mutations were not more likely to have prior sulfa or sulfone prophylaxis than wild-type patients. Six of them received trimethoprim–sulfamethoxazole (TMP–SMX) as treatment of their PCP episode, 2 presented adverse reactions, and TMP–SMX was switched to pentamidine (on days 7 and 10, respectively). One received pentamidine as 1st choice treatment because of previous intolerance to sulfa drugs. None of the patients with DHPS mutants had to be admitted to the ICU,

not even for mechanical ventilation. All of them survived the PCP episode and were still alive 6 months later.

Thirty-one patients (15%; 95% CI, 10–21%) of the 207 died because of the PCP episode. Death occurred a mean of 30 days after PCP diagnosis in all patients, except in 1 patient who died 90 days later. Baseline, clinical, outcome, and follow-up characteristics of the 207 HIV-infected patients with PCP, according to death status, are shown in Table 4. DHPS mutations were not present in the patients who died. Although not statistically significant, dyspnea and high levels of LDH were more frequent in patients who died ($P = 0.06$ and 0.09 , respectively). Death was more common among patients with low levels of serum albumin ($P = 0.03$), $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg at admission ($P = 0.02$), low $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($P < 0.001$), and high $\text{PAO}_2 - \text{PaO}_2$ ($P < 0.001$), and these patients more frequently required adjunctive corticosteroids ($P = 0.03$), mechanical ventilation, ($P < 0.001$), and ICU admission ($P < 0.001$).

Sixty-seven patients were taking previous cART for a median period of 50 months (IQR, 11–76). The median time between the stop of the previous cART and the diagnosis of PCP was 11 months (IQR, 2.6–19). Only 7 patients were taking cART at the time of the PCP episode, and none of them died.

Univariate and multivariate analyses were performed to identify predictors of ICU admission (Table 5). Univariate predictors of ICU admission included new HIV diagnosis, $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg at admission, low levels of serum albumin at admission, and high levels of serum LDH at admission. Previous antiretroviral therapy and previous PCP prophylaxis were identified as protective factors against ICU admission. Variables with a P value <0.1 in the univariate analysis were included in the multivariate analysis, except $\text{PAO}_2 - \text{PaO}_2$, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, serum LDH, and serum albumin, because these variables had only been collected in 57% of patients at baseline. $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg at admission (odds ratio [OR], 2.57; 95% CI, 1.23–5.39%; $P = 0.01$) remained an independent predictor of ICU admission in all the multivariate models tested. Previous antiretroviral therapy (OR, 0.26; 95% CI, 0.1–0.71%; $P = 0.009$) remained an independent protective factor for admission to the ICU.

To identify predictors of mortality, we also performed univariate and multivariate analyses (Table 6). Univariate predictors of mortality at admission included age, dyspnea, $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg, low levels of serum albumin, high levels of serum LDH, use of adjunctive corticosteroids, ICU admission, and need for mechanical ventilation. Variables with a P value <0.1 in univariate analysis were included in the multivariate analysis, except $\text{PAO}_2 - \text{PaO}_2$, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, serum LDH, and serum albumin, as explained above. $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg at admission (OR, 2.49; 95% CI, 1.11–5.42%; $P = 0.03$) and ICU admission and/or need for mechanical ventilation during the 1st week (OR, 28.97; 95% CI, 10.73–78.18%; $P < 0.001$) remained independent predictors of mortality in all the multivariate models tested. Because serum LDH and albumin at

Table 2
Pneumocystis DHPS genotypes in 188 HIV-infected patients with PCP^a

Genotype	n (%)
Wild-type (55Thr/ 57 Pro)	181 (96.3%)
Genotype 2 (55Ala/57 Pro)	2 (1.1%)
Genotype 3 (55Thr/57 Ser)	3 (1.6%)
Genotype 4 (55Ala/57 Ser)	1 (0.5%)
Mixed (WT+ genotype 2)	1 (0.5%)

^a Genotypes according to Beard's classification (Beard et al., 2000).

Table 3

Baseline, clinical course, outcome, and follow-up characteristics of disease in 188 patients with PCP containing mutant or wild-type DHPS genotypes^a

Characteristic	Overall	Mutant	Wild-type	P
<i>Baseline characteristics</i>				
No. (%)	188 (100%)	7 (3.7%)	181 (96.3%)	
Male (no. %)	145 (77%)	6 (86%)	139 (77%)	1.00
Median (IQR) age (years)	39 (34–45)	42 (36–45)	39 (34–45)	0.40
Risk factors (no. %)				1.00
IVDU	69 (37%)	3 (43%)	66 (36%)	
MSM	32 (17%)	1 (14%)	31 (17%)	
Heterosexual	72 (38%)	3 (43%)	69 (38%)	
Years of diagnosis (no. %)				0.57
200–2001	52 (28%)	1 (14%)	51 (28%)	
2002	53 (28%)	2 (29%)	51 (28%)	
2003–2004	82 (44%)	4 (57%)	78 (43%)	
New HIV diagnosis (no. %)	88 (47%)	3 (43%)	85 (47%)	1.00
Previous AIDS (no. %)	83 (44%)	4 (57%)	79 (44%)	0.75
ART prior PCP (no. %)	64 (34%)	4 (57%)	60 (33%)	0.23
History of prior PCP (no. %)	13 (7%)	1 (14%)	12 (7%)	0.40
Sulfa/sulfone prophylaxis (no. %) ^b	12 (6%)	1 (14%)	11 (6%)	0.38
Median CD4 cell count ($\times 10^6$ cells/L [IQR])	21 (8.5–48.5)	7 (1.3–187)	21 (9–48)	0.38
Median HIV viral load (log ₁₀ copies/mL [IQR])	5.3 (4.9–5.7)	5.4 (4.7–5.5)	5.3 (4.9–5.7)	0.65
<i>PCP diagnosis and clinical course</i>				
Diagnostic method				0.08
BAL	175 (93%)	5 (71%)	170 (94%)	
IS	13 (7%)	2 (29%)	11 (6%)	
Fever (no. %)	148 (79%)	5 (71%)	143 (79%)	0.64
Cough (no. %)	154 (82%)	6 (86%)	148 (82%)	1.00
Dyspnea	141 (75%)	5 (71%)	136 (76%)	0.68
Chest X-ray findings				
Lung consolidation (no. %)	56 (30%)	2 (29%)	54 (30%)	1.00
Interstitial infiltrate (no. %)	124 (68%)	5 (71%)	119 (68%)	0.48
Median serum albumin (mg/dL [IQR])	29.6 (25–34)	32.7 (28–34)	29.4 (25–34)	0.48
Median serum LDH (U/L [IQR])	608.5 (414–894)	457.5 (282–536)	620.5 (419–894.5)	0.24
PaO ₂ <60 mm Hg at admission (no. %)	85 (45%)	4 (57%)	81 (45%)	0.52
Median PaO ₂ at admission (IQR)	63.5 (50.6–74)	46 (42–68.4)	64 (51–75)	0.21
Median PaO ₂ /FiO ₂ (IQR)	295 (235–350)	269 (200–352.7)	295 (238–352)	0.56
Median PAO ₂ –PaO ₂ (IQR)	48.5 (35.7–62)	40 (30–55)	48 (36.25–62)	0.54
<i>PCP treatment and outcome (no. %)</i>				
Sulfa/sulfone treatment	184 (98%)	6 (86%)	178 (98%)	0.14
Adjunctive corticosteroids	156 (84%)	6 (86%)	150 (84%)	1.00
ICU admission ^c	38 (21%)	0	38 (21%)	0.35
Mechanical ventilation	29 (16%)	0	29 (16%)	0.60
Death within 60 days	28 (15%)	0	28 (15%)	0.60
Death from PCP	23 (82%)	0	23 (82%)	–
<i>PCP follow-up</i>				
Death at 3rd month	3 (2%)	0	3 (2%)	1.00
Death at 6th month	7 (5%)	0	7 (5%)	1.00

IVDU = intravenous drug users; MSM = men having sex with men; ART = antiretroviral therapy; PaO₂ = partial pressure oxygen in arterial blood; FiO₂ = inspiratory oxygen fraction.

^a No amplified samples (19) have been excluded. There were no significant differences in patient characteristics, PCP severity, or outcomes between the 188 episodes included and the 19 episodes excluded because genotyping was unsuccessful.

^b Within 4 months before admission.

^c At any time in this PCP episode.

admission would provide relevant information for predicting mortality, they were included in a secondary multivariate analysis based on 123 patients with available

serum values. Serum albumin (OR, 0.53; 95% CI, 0.31–0.91, for 5-U increases), PaO₂ <60 mm Hg at admission (OR, 3.74; 95% CI, 1.09–12.88), and 10-year changes in

Table 4

Baseline, clinical course, outcome, and follow-up characteristics of disease in 207 patients with PCP according to outcome^a

Characteristic	Overall	Alive	Death	P
<i>Baseline characteristics</i>				
No. (%)	207	176 (85%)	31 (15%)	
Male (no. %)	160 (77%)	135 (77%)	25 (81%)	0.82
Median (IQR) age (years)	38 (34–44)	38 (33.5–43)	41 (34–53)	0.14
Risk factors (no. %)				0.28
IVOU	77 (37%)	68 (39%)	9 (29%)	
MSM	34 (16%)	28 (16%)	6 (9%)	
Heterosexual	80 (39%)	69 (39%)	11 (35%)	
Others	16 (7%)	11 (7%)	5 (16%)	
Year of diagnosis (no. %)				0.32
2000–2001	60 (29%)	51 (29%)	9 (29%)	
2002	62 (30%)	56 (32%)	6 (19%)	
2003–2004	85 (41%)	69 (39%)	16 (52%)	
New HIV diagnosis (no. %)	98 (47%)	82 (47%)	16 (52%)	0.70
Previous AIDS (no. %)	83 (40%)	72 (41%)	11 (35%)	0.71
ART prior PCP (no. %)	67 (33%)	59 (34%)	8 (26%)	0.53
History of prior PCP (no. %)	16 (8%)	15 (9%)	1 (3%)	0.48
Sulfa/sulfone prophylaxis (no. %) ^b	14 (7%)	14 (8%)	0	0.13
Presence of DHPS mutations	7 (3.4%)	7 (4%)	0	0.60
Median CD4 cell count ($\times 10^6$ cells/L [IQR])	21 (8–48)	21 (9–50)	18 (7–39)	0.56
Median HIV viral load (\log_{10} copies/mL [IQR])	5.3 (4.8–5.7)	5.5 (4.8–5.7)	5.4 (4.9–5.7)	0.64
<i>PCP diagnosis and clinical course</i>				
Diagnostic method				0.70
BAL	192 (93%)	162 (92%)	30 (97%)	
IS	15 (7%)	14 (8%)	1 (3%)	
Fever (no. %)	165 (80%)	140 (80%)	25 (83%)	0.81
Cough (no. %)	172 (83%)	148 (84%)	24 (80%)	0.60
Dyspnea	157 (76%)	130 (74%)	27 (90%)	0.06
Chest X-ray findings				
Lung consolidation (no. %)	63 (31%)	51 (29%)	12 (41%)	0.20
Interstitial infiltrate (no. %)	137 (68%)	119 (69%)	18 (62%)	0.61
Median serum albumin (mg/dL [IQR])	29.4 (25–34)	30 (25.4–34.5)	18 (24–29.4)	0.03
Median serum LDH (U/L [IQR])	620 (393–895)	593 (414–861)	920 (313–1165)	0.09
PaO ₂ <60 mm Hg at admission (no. %)	95 (46%)	75 (43%)	20 (65%)	0.02
Median PaO ₂ at admission (IQR)	64 (50–74)	64 (51–74)	55 (46–75)	0.31
Median PaO ₂ /FiO ₂ (IQR)	295.2 (237.1–347.6)	305 (248–352)	230.5 (185–281)	<0.001
Median PAO ₂ –PaO ₂ (IQR)	48.5 (35.7–62)	47 (33.5–60)	64.5 (50.25–71.75)	<0.001
<i>PCP treatment and outcome (no. %)</i>				
Sulfa/sulfone treatment	203 (98%)	173 (98%)	30 (97%)	0.48
Adjunctive corticosteroids	170 (83%)	141 (81%)	29 (97%)	0.03
ICU admission ^c	41 (20%)	17 (10%)	24 (80%)	<0.001
Mechanical ventilation	32 (16%)	8 (5%)	24 (80%)	<0.001

IVDU = intravenous drug users; MSM = men having sex with men; ART = antiretroviral therapy; PaO₂ = partial pressure oxygen in arterial blood; FiO₂ = inspiratory oxygen fraction.

^a Death within 90 days.

^b Within 4 months before admission.

^c At any time in this PCP episode.

age (OR, 2.24; 95% CI, 1.28–3.91) were identified as independent predictors of mortality.

4. Discussion

This study describes the 1st multicenter cohort of Spanish HIV-infected patients with PCP. The multicenter approach was adopted to determine whether there were any geographic differences as described elsewhere (Kazanjan et al., 2000). The study was undertaken to document the prevalence of

DHPS mutations and their influence on the outcome and survival of these patients and to analyze mortality rates and prognostic factors associated with death or poor outcome in this cohort. We observed mutant DHPS genotypes in 3.7% (95% CI, 1.5–7.5%) of the 188 episodes of PCP. This is the lowest rate of DHPS mutations described to date in the United States and Europe. Other countries have also reported a low incidence of DHPS mutations, for example, Italy with 8% (Visconti et al., 2001); Portugal, China, and Zimbabwe with 7% (Esteves et al., 2008; Kazanjan et al., 2004; Miller

Table 5
Baseline predictors of ICU admission in patients with PCP

Variable	Obs	OR (95% CI)	P
<i>Univariate analysis</i>			
Age (10 years' change)	207	1.06 (0.74–1.51)	0.75
Risk factors	193		
Sexual		1.37 (0.64–2.96)	0.41
Previous ART	207	0.30 (0.12–0.75)	0.009
Previous PCP prophylaxis	207	0.21 (0.06–0.72)	0.01
New HIV diagnosis	207	1.99 (0.99–4.00)	0.053
Fever	206	0.82 (0.36–1.90)	0.65
Dyspnea	206	1.98 (0.78–5.04)	0.15
Chest X-ray findings			
Lung consolidation	204	1.66 (0.81–3.40)	0.17
PaO ₂ <60 mm Hg at admission	207	2.14 (1.06–4.31)	0.03
PAO ₂ –PaO ₂	161	1.00 (1.00–1.002)	0.03
PaO ₂ /FiO ₂	163	0.74 (0.59–0.95)	0.02
HIV viral load ≥5 (log ₁₀ copies/mL)	207	1.17 (0.54–2.54)	0.70
CD4 cell count	199	0.72 (0.47–1.10)	0.13
(×10 ⁶ cells/L) (50-U change)			
Serum albumin at admission	142	0.59 (0.40–0.86)	0.006
(5-U change)			
Serum LDH at admission	171	1.15 (1.07–1.24)	<0.001
(100-U change)			
<i>Multivariate analysis^a</i>			
PaO ₂ <60 mm Hg at admission		2.57 (1.23–5.39)	0.01
Previous ART		0.26 (0.10–0.71)	0.009

ART = antiretroviral therapy; PaO₂ = partial pressure oxygen in arterial blood; Obs = number of cases observed.

^a PAO₂–PaO₂, PaO₂/FiO₂, serum albumin, and LDH were not included in the multivariate analysis.

et al., 2003); and Brazil, which reported no DHPS mutations among Brazilian HIV-infected patients with PCP (Wissmann et al., 2006). However, 2 studies in Spain that included 15 and 36 patients from a single institution reported DHPS mutations in 73.3% (95% CI, 44.9–92.2%) and 22.2% (95% CI, 10.1–39.2%) of their patients, respectively (Esteves et al., 2008; Montes-Cano et al., 2004). These results contrasted with that presented here and could have several explanations. First, the patients in the aforementioned studies were from the same area, where a mutant *P. jirovecii* strain might have been common. In our series, all the patients who harbored DHPS mutations also came from a single region, Catalonia (Northeast Spain). Second, the low percentage of DHPS gene polymorphisms in our series might be because HIV infection manifested itself with an episode of PCP in nearly 50% of our patients, so there would have been little previous sulfa exposure.

Although the number of DHPS mutant genotypes was reduced, our data showed that patients harboring DHPS mutations did not present a worse outcome than patients harboring wild-type genotypes. None of these patients needed ICU admission or mechanical ventilation, and after 6 months of follow-up, all were still alive. These results are consistent with previous theories, suggesting that DHPS mutations confer low-level resistance that can overcome the inhibitory effects of the low doses of sulfa administered during prophylaxis. However, it appears that the higher

concentrations of sulfa drugs in pulmonary tissue achieved with therapeutic doses of cotrimoxazole result in successful treatment of most patients with PCP who harbor DHPS mutations (Meshnick and Kazanjian, 2005). In fact, treatment with cotrimoxazole was successful in all of our patients who harbored DHPS mutations and who were treated with this drug.

Therefore, our results support those reported by Crothers et al. (2005) when describing the influence of DHPS mutations on outcome and survival. Crothers et al. published that the outcome and mortality of HIV-associated pneumonia containing *P. jirovecii* DHPS mutations were related to the underlying severity of illness and the initial severity of PCP more than to the presence of mutations. Similarly, in our study, *P. jirovecii* DHPS mutations did not predict mortality or poor outcome in the 7 patients who harbored them, because all showed a favorable short- and medium-term

Table 6
Predictors of mortality in patients with PCP

Variable	Obs	OR (95% CI)	P
<i>Univariate analysis</i>			
At admission			
Age (10 years' change)	207	1.44 (1.00–2.09)	0.051
Risk factors	193		
Sexual		1.33 (0.56–3.16)	0.52
Previous ART	207	0.70 (0.30–1.63)	0.40
Previous PCP prophylaxis	206	0.77 (0.28–2.15)	0.62
History of prior PCP	207	0.36 (0.05–2.81)	0.33
New HIV diagnosis	207	1.22 (0.57–2.62)	0.61
Fever	206	1.29 (0.46–3.59)	0.63
Dyspnea	207	3.18 (0.92–11.0)	0.06
Chest X-ray findings			
Lung consolidation	204	1.72 (0.76–3.85)	0.19
PaO ₂ <60 mm Hg at admission	207	2.45 (1.10–5.42)	0.03
PAO ₂ –PaO ₂	164	1.002 (1.000–1.003)	0.009
PaO ₂ /FiO ₂	167	0.74 (0.49–0.88)	0.005
HIV viral load ≥5	196	1.30 (0.51–3.27)	0.58
(log ₁₀ copies/mL)			
CD4 cell count	199	0.89 (0.60–1.31)	0.55
(×10 ⁶ cells/L) (50-U change)			
Serum albumin at admission	142	0.66 (0.43–1.001)	0.051
(5-U change)			
Serum LDH at admission	171	1.09 (1.01–1.18)	0.02
(100-U change)			
Adjunctive corticosteroids	204	6.79 (0.89–51.64)	0.06
During the 1st week			
ICU admission and/ or mechanical ventilation	207	28.29 (10.96–73.02)	<0.001
<i>Multivariate analysis^a</i>			
At admission			
PaO ₂ <60 mm Hg		2.49 (1.11–5.42)	0.03
During the 1st week			
ICU admission and/ or mechanical ventilation		28.97 (10.73–78.18)	<0.001

ART = antiretroviral therapy; PaO₂ = partial pressure oxygen in arterial blood; Obs = number of cases observed.

^a PAO₂–PaO₂, PaO₂/FiO₂, serum albumin, and LDH were not included in the multivariate analysis.

outcome. All of these patients survived the PCP episode and were still alive 6 months later. In the same way, underlying severity of illness and the initial severity of PCP in our patients, determined by $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg at admission, and the need for ICU admission were the main factors influencing outcome and mortality.

Alterations in the arterial blood gas parameters of patients requiring mechanical ventilation have been the major determinant in the outcome of HIV-infected patients with PCP for the last 20 years. In at least 2 studies conducted in our patient population, the need for mechanical ventilation was found to be a predictor of poor outcome in PCP (BES, 2005; Torres et al., 1995). Accordingly, the baseline predictors of ICU admission on the 1st day of the PCP episode were analyzed in the present study, and $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg at admission was an independent predictor in the multivariate model, whereas previous antiretroviral therapy remained an independent protective factor for admission to the ICU. We could say that the protective effect of previous antiretroviral therapy was an indirect effect. Patients receiving antiretroviral therapy are usually under strict medical supervision, with the result that an earlier diagnosis can be made and their outcome is closely monitored.

Fifteen percent of our patients died from the PCP episode. A similar rate (13.5%) was shown by Walzer et al. (2008) in a large study that describes early predictors of mortality from 1985 to 2006. However, mortality rates have been decreasing in Spain in the last 2 decades, thanks to the systematic use of sulfa prophylaxis, adjunctive steroids, and cART (San-Andrés et al., 2003). The mortality rate in patients from an earlier study (1985–1990) was 28%, with a 3-fold increase to 79% in patients requiring mechanical ventilation (Fernández et al., 1995). In the current study, the mortality of patients requiring mechanical ventilation was 80% (95% CI, 61–92%), similar to the previous study. Hence, even in the cART era, the prognosis of PCP severe enough to require ICU admission and mechanical ventilation continues to be ominous.

When the predictors of mortality were analyzed, $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg on admission and admission to the ICU during the 1st week proved to be independent predictors of mortality in the multivariate analysis. Therefore, we concluded that severe respiratory failure on admission was the main factor in the outcome of patients with PCP. Hypoxemia on admission appeared to be associated with mortality by itself and with admission to the ICU. Although only 20% of patients in this series had to be admitted to the ICU, 80% of them died, probably because of the severity of the episode. Bedos et al. (1999) identified the need for mechanical ventilation as a predictor of death. Furthermore, although our study shows that crude in-hospital mortality has now decreased, it increased 5-fold (15% versus 80%) when patients required mechanical ventilation.

Therefore, when pointing out the prognostic factors found as protective factors, Morris et al. (2003) stated that cART

was the only factor associated with decreased mortality in PCP, and Curtis et al. (2000) claimed that patients receiving antiretroviral therapy or PCP prophylaxis before admission were less likely to receive mechanical ventilation. Similarly, in the univariate analysis, we observed that previous antiretroviral therapy and previous PCP prophylaxis were protective factors against ICU admission and the need for mechanical ventilation; therefore, these factors would be indirectly associated with a decrease in mortality because ICU admission was found to be an independent predictor of mortality.

Our study has several limitations. One potential weakness is that the validity of the multivariate analysis is compromised by the absence of several well-established predictors of increased ICU admission and mortality on admission, such as low serum albumin, high serum LDH, and increased alveolar–arterial oxygen gradient. These data are missing in our series because, on admission, some emergency laboratories are not able to report them. When a secondary multivariate analysis was performed, including the 123 patients with available serum values, $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg on admission, low serum albumin, and age were found as independent predictors of mortality. The 2nd limitation is that the ability to detect an association between DHPS mutations and adverse outcomes was restricted by the low percentage of patients with mutations in our series. Furthermore, the low observed prevalence of DHPS mutations could be due to technical reasons: DHPS mutations were determined only by sequencing, and subcloning was not performed, unlike in other studies.

In summary, we demonstrated a low incidence of DHPS mutations in Spanish PCP patients. We were unable to show that DHPS mutations predicted mortality or poor outcome. Despite the fact that PCP mortality has decreased in recent years, it remains high in patients requiring mechanical ventilation, even with the protective effect of previous antiretroviral therapy and adjunctive corticosteroids. The initial severity of PCP, determined by $\text{PaO}_2 < 60$ mm Hg at admission and the need for ICU admission during the 1st week, was found to be the main predictors in the outcome of patients with PCP.

Acknowledgments

The authors thank Dr Carles Agustí for his assistance with the interpretation of blood gas parameters. The expert assistance of the microbiology laboratory staff of the Hospital Clínic of Barcelona (Spain) and Steve Meshnick's laboratory staff (UNC) is gratefully acknowledged. Laboratory work at UNC was supported by NIH grant 1R01 AI 46966. Work in Spain was supported by the "Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España" (FIPSE; grant 24298/01), National AIDS Plan Secretariat of the Spanish Ministry of Health, Abbott Laboratories, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, GlaxoSmith-Kline, Merck Sharp and Dohme, and the "Red Temática

Cooperativa de Investigación en SIDA del FIS” (Red de Grupos 173). M.J.A-M. received a research grant from Fundació Clínic, Barcelona, and from the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC). J.M.M. was a recipient of a research grant from the “Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer” (IDI-BAPS) and the “Conselleria de Salut de la Generalitat de Catalunya, Barcelona” (Spain).

References

- Alvarez-Martínez MJ, Miró JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Solé M, Benito N, Domingo P, Muñoz C, Ribera E, Zar HJ, Wissmann G, Diehl A, Prolla JC, Jiménez De Anta MT, Gatell JM, Wilson PE, Meshnick SR, The Spanish PCP Working Group (2006) Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR in the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 153–160.
- Alvés C, Nicolás JM, Miró JM, Torres A, Agustí C, González J, Raño A, Benito N, Moreno A, García F, Millá J, Gatell JM (2001) Reappraisal of aetiology and prognostic factors of severe acute respiratory failure in HIV patients. *Eur Respir J* 17:87–93.
- Armstrong W, Meshnick SR, Kazanjian P (2000) *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients. *Microbes Infect* 2:61–67.
- Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura INS, Roberts JM, Hightower AW, Bens MS, Freeman AR, Lee S, Stringer JR, Duchin JS, del Río C, Rimland D, Baughman RP, Levy DA, Dietz PS, Navin R (2000) Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 6: 265–277.
- Bedos JP, Dumoulin JL, Gachot B, Veber B, Wolff M, Regnier B, Chevret S (1999) *Pneumocystis carinii* pneumonia requiring intensive care management: survival and prognostic study in 110 patients with human immunodeficiency virus. *Crit Care Med* 27:1109–1115.
- Benito N, Raño A, Moreno A, González J, Luna M, Agustí C, Danés C, Pumarola T, Miró JM, Torres A, Gatell JM (2001) Pulmonary infiltrates in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era in Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr* 27:35–43.
- Boletín Epidemiológico Semanal (2005) Ministerio de Sanidad y Consumo. 13:157–168.
- Costa MC, Helweg-Larsen J, Lundgren B, Antunes F, Matos O (2003) Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portuguese patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 22:516–520.
- Crothers K, Beard CB, Turner J, Groner G, Fox M, Morris A, Eiser S, Huang L (2005) Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS* 19:801–805.
- Curtis JR, Yamold PR, Schwartz DN, Weinstein RA, Bennett CL (2000) Improvements in outcome of acute respiratory failure for patients with human immunodeficiency virus-related *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 162:393–398.
- Diop Santos L, Lacube P, Latouche S, Kac G, Mayaud C, Marteau M, Poirot JL, Maury E, Guillot J, Roux P (1999) Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* epidemiology. *J Eukaryot Microbiol* 46(Suppl):S133–S134.
- Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, Calderón EJ, Antunes F, Matos O (2008) *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect* 14:356–362.
- Fernández P, Torres A, Miró JM, Vieigas C, Mallolas J, Zamora L, Gatell JM, Valls ME, Riquelme R, Rodríguez-Roisin R (1995) Prognostic factors influencing the outcome in *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *Thorax* 50:668–671.
- Helweg-Larsen J, Benfiel TL, Eugen-Olsen J, Lundgren JD, Lundgren B (1999) Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *Lancet* 354:1347–1351.
- Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, Pieniazek N, Carter JL, del Río C, Rimland D, Navin TR (2000) Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis* 182: 1192–1198.
- Huang L (2005) Clinical presentation and diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. In: *Pneumocystis pneumonia*, 3rd ed. Walzer P, Cushion MT, Eds. New York: Marcel Dekker, pp. 349–406.
- Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, Cannon M, Meshnick SR (1998) *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* 12:873–878.
- Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee C-H, Crane L, Katz J, Meshnick SR (2000) *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis* 182:551–557.
- Kazanjian PH, Fisk D, Armstrong W, Shulin Q, Liwei H, Ke Z, Meshnick SR (2004) Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* pneumonia, in the United States and China. *J Infect Dis* 189:1684–1687.
- Lane BR, Ast JC, Hossler PA (1997) Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 175:482–485.
- Latouche S, Lacube P, Maury E, Bolognini J, Develoux M, Girard PM, Godet C, Lebrette MG, Mayaud C, Guillot J, Roux P (2003) *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in French patients with pneumocystosis: a 1998–2001 prospective study. *Med Mycol* 41: 533–537.
- Ma L, Borio L, Masur H, Kovacs JA (1999) *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim–sulfamethoxazole or dapsone use. *J Infect Dis* 180:1969–1978.
- Ma L, Kovacs JA, Cargnel A, Valerio A, Fantoni G, Atzori C (2002) Mutations in the dihydropteroate synthase gene of human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from Italy are infrequent but correlate with prior sulfa prophylaxis. *J Infect Dis* 185:1530–1532.
- Mei Q, Gurunathan S, Masur H, Kovacs JA (1998) Failure of co-trimoxazole in *Pneumocystis carinii* infection and mutations in dihydropteroate synthase gene. *Lancet* 351:1631–1632.
- Meshnick SR, Kazanjian P (2005) Dihydropteroate synthase and cytochrome B: the problem of emerging resistance. In: *Pneumocystis pneumonia*, 3rd ed. Walzer P, Cushion MT, Eds. New York: Marcel Dekker, pp. 631–640.
- Miller RF, Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE (2003) Genotypes of *pneumocystis jirovecii* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 47:3979–3981.
- Miller RF, Allen E, Copas A, Singer M, Edwards SG (2006) Improved survival for HIV infected patients with severe *Pneumocystis jirovecii* pneumonia is independent of highly active antiretroviral therapy. *Thorax* 61:716–721.
- Montes-Cano MA, de la Horra J, Martín-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, Medrano FJ, Calderón EJ (2004) *Pneumocystis jirovecii* genotypes in the Spanish population. *Clin Infect Dis* 39: 123–128.
- Morris A, Wachter RM, Luce J, Turner J, Huang L (2003) Improved survival with highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients with severe *Pneumocystis carinii* pneumonia. *AIDS* 17:73–80.
- Nahimana A, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J, Meneau I, Francoli P, Bille J, Hauser PM (2003) Sulfa resistance and dihydropteroate synthase mutants in recurrent *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Emerg Infect Dis* 9:864–867.
- Navin TR, Beard CB, Huang L, del Río C, Lee S, Pieniazek NJ, Carter JL, Le T, Hightower A, Rimland D (2001) Effect of mutations in

- Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P. carinii* pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study. *Lancet* 358:545–549.
- San-Andrés FJ, Rubio R, Castilla J, Pulido F, Palao G, de Pedro I, Costa J-R, del Palacio A (2003) Incidence of acquired immunodeficiency syndrome-associated opportunistic diseases and the effect of treatment on a cohort of 1115 patients infected in human immunodeficiency virus, 1989–1997. *Clin Infect Dis* 36:1177–1185.
- Takahashi T, Hosoya N, Endo T, Nakamura T, Sakashita H, Kimura K, Ohnishi K, Nakamura Y, Iwamoto A (2000) Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulphonamide therapy. *J Clin Microbiol* 38:3161–3164.
- Torres A, El-Ebiary M, Marrades R, Miró JM, Gatell JM, Sánchez-Nieto JM, Xaubet A, Agustí C, Rodríguez-Roisin R (1995) Aetiology and prognostic factors of patients with AIDS presenting life-threatening acute respiratory failure. *Eur Respir J* 8:1922–1928.
- Valerio A, Tronconi E, Mazza F, Fantoni G, Atzori C, Tartarone F, Duca P, Cargnel A (2007) Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Italian AIDS patients. Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. *J Acquir Immune Defic Syndr* 45:521–528.
- Visconti E, Ortona E, Mencarini P, Margutti P, Marinaci S, Zolfo M, Siracusano A, Tamburrini E (2001) Mutations in dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis carinii* in HIV patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 18:547–551.
- Walzer PD, Evans HER, Copas AJ, Edwards SG, Grant AD, Miller RF (2008) Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985–2006. *Clin Infect Dis* 46: 625–633.
- Wissmann G, Álvarez-Martínez MJ, Meshnick SR, Diehl ARS, Prolla JC (2006) Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol* 53: 305–307.
- Zar HJ, Álvarez-Martínez MJ, Harrison A, Meshnick SR (2004) Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Infect Dis* 39: 1047–1051.

Artículo 3.

Influence of Combined Antiretroviral Therapy and Dihydropteroate Synthase Genotypes in the Outcome of *Pneumocystis* Pneumonia in HIV-Patients.

Miriam J. Álvarez-Martínez, José M. Miró, María Eugenia Valls, Omar Sued, Manel Solé, Paula V. Rivas, Elisa de Lazzari, Natividad Benito, Felipe García, Carlos Agustí, Paul E. Wilson, José M. Gatell, María Teresa Jiménez de Anta, Steven Meshnick, Asunción Moreno.

Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (2008) enviado a publicar.

Artículo 3.**Influencia de la Terapia Antirretroviral Combinada y de los Genotipos de DHPS en el Pronóstico de la Neumonía por *Pneumocystis* en Pacientes Infeccionados por VIH.**

Las mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* se han asociado al fallo de la profilaxis con sulfamidas. No obstante, es controvertido si estas mutaciones están asociadas a un peor pronóstico en los pacientes con PcP. El objetivo de este trabajo fue determinar si la prevalencia de mutaciones en el gen de DHPS de *P. jirovecii* ha cambiado desde la introducción de la terapia antirretroviral combinada (c-ART) y si las mutaciones estaban asociadas a peor pronóstico en los pacientes españoles VIH-positivos con PcP.

Este estudio incluyó 167 pacientes VIH-positivos diagnosticados de PcP, 110 durante el periodo pre-cART (1989-1995), y 57 en el periodo c-ART (2001-2004). Se realizó el tipado molecular de DHPS.

Diecisiete pacientes, de los 98 pacientes en los que se amplificó la DHPS, (17%) presentaron mutaciones (33% en el periodo pre-cART y 5.5% en el c-ART; $p < 0.01$). Los pacientes de la era pre-cART tomaron más profilaxis primaria y secundaria que los pacientes de la era c-ART ($p < 0.01$ y $p = 0.05$, respectivamente). El 95% del total de los pacientes recibieron TMP-SMX como tratamiento. Sólo hubo 3 recaídas al tercer mes, y 5 al sexto, en el grupo de los pacientes con genotipo salvaje. La mortalidad intrahospitalaria fue similar entre los pacientes con y sin mutaciones (6% vs. 11%; $p=0.84$).

Las mutaciones en el gen de la DHPS eran más frecuentes durante el periodo pre-cART, cuando los pacientes estaban sometidos a una mayor exposición a sulfamidas. Sin embargo, presencia de mutaciones no empeora el pronóstico, y la respuesta a TMP-SMX, a dosis terapéuticas, fue favorable en la mayoría de los casos.

Title: Influence of Combined Antiretroviral Therapy and Dihydropteroate Synthase Genotypes in the Outcome of *Pneumocystis* Pneumonia in HIV-Patients.

Míriam J. Alvarez-Martínez,¹ José M. Miró,¹ Maria Eugenia Valls,¹ Omar Sued,¹ Manel Solé,¹ Paula V. Rivas,¹ Elisa de Lazzari,¹ Natividad Benito,¹ Felipe García,¹ Carlos Agustí,¹ Paul E Wilson,² José M. Gatell,¹ Maria Teresa Jiménez de Anta,¹ Steven R Meshnick,² and Asunción Moreno¹

¹*Hospital Clínic-IDIBAPS (Institut d'Investigació August Pi i Sunyer), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain*

²*Departments of Epidemiology, and Microbiology & Immunology, University of North Carolina, Chapel Hill, USA*

Running head: PcP outcome, influence of c-ART & DHPS genotype

Correspondence: Dr. José M. Miró
Hospital Clínic-IDIBAPS
Universtat de Barcelona, Barcelona, Spain
Infectious Diseases Service
Villarroel, 170, Barcelona 08036, Spain
Tel: 34-93-2275586
Fax: 34-93-4514438
miro@medicina.ub.es

This study was presented in part at the 12th CROI (Conference on Retroviruses and Oportunistic Infections) meeting, Boston, USA, February 22-27, 2005. Mutations in the *Pneumocystis jiroveci* Dihydropteroate Synthase Gene in Spanish HIV-1-infected Patients. Abstract number 882.

Funding: NIH grant 1RO1 AI 46966; FIPSE “Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España, grant - 24198/ 01.

ABSTRACT

Objective: The objective of this study was to determine whether the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) gene mutations has changed since the introduction of combined antiretroviral therapy (cART) and whether the mutations are associated with poor outcome in Spanish HIV-1-infected patients with *Pneumocystis* pneumonia (PcP).

Methods: We studied 167 PcP episodes in HIV-1-infected patients diagnosed during the pre-cART (1989-1995) and cART (2001-2004) periods. Molecular genotyping of DHPS was performed.

Results: Seventeen patients (17%, 95%CI 10%-25%) had mutations in the DHPS gene: 14 patients (33%, 95%CI 19%-49%) from the pre-cART period and 3 patients (5.5%, 95%CI 1.3%-16%) from the cART period ($P<.01$). Patients from the pre-cART period took more primary and secondary prophylaxis than c-ART patients ($P<.01$ and $P=.05$, respectively). Overall, 95% of patients were treated with TMP-SMX. There were only 3 relapses at 3 months, and 5 at 6 months, in the group of patients with wild-type genotypes. In-hospital mortality was similar in patients with(out) mutations (6% vs. 11%; $P=.84$).

Conclusions: DHPS gene mutations were more common during the pre-cART period and associated with previous sulfa exposure. However, their presence did not worsen prognosis. The response to TMP-SMX with therapeutic doses was successful in most cases.

Keywords: *Pneumocystis* pneumonia; HIV; DHPS mutations; cART; outcome.

Pneumocystis jirovecii (formerly *Pneumocystis carinii*) pneumonia (PcP) is caused by an opportunistic fungal pathogen and remains an important cause of morbidity and mortality in patients infected by the human immunodeficiency virus (HIV). However, the incidence of PcP in developed nations has declined as a result of *P. jirovecii* prophylaxis and combined antiretroviral therapy (cART) [1]. PcP is the most common HIV-related illness in Spain [2]. Cotrimoxazole, a synergistic combination of trimethoprim and sulfamethoxazole (TMP-SMX), is the first choice for treatment and prophylaxis of PcP, although the anti-*Pneumocystis* effect is due to the SMX. Several published studies have demonstrated a significant association between sulfa drug prophylaxis of PcP in HIV-1-infected patients and the presence of mutations in the dihydropteroate synthase (DHPS) gene [3, 4, 5]. However, it is controversial whether these mutations are associated with poor outcome—3 studies have found these mutations to be associated with poor outcome [5, 6, 7], whereas a fourth one has not [8]. Therefore, this study was undertaken to determine whether the prevalence of *P. jirovecii* DHPS gene mutations has changed since the introduction of cART and whether the mutations are associated with poor outcome in Spanish HIV-1-infected patients with PcP.

Subjects and methods

We analyzed HIV-1-infected patients with PcP from a single institution, the Hospital Clínic, Barcelona, Spain (an 850-bed tertiary care center): 110 consecutive HIV-1-infected patients diagnosed with PcP from the pre-combined antiretroviral therapy (pre-cART) period (1989-1995) and 57 consecutive HIV-1-infected patients with PcP from the c-ART period (2001-2004).

PcP infection was microscopically confirmed by bronchoalveolar lavage (BAL) or induced sputum (IS) as part of the routine diagnostic procedures in the microbiology and histopathology departments. Giemsa-stained, methenamine-silver stained, or Papanicolaou-

stained stored slides were collected from pre-cART patients, and frozen aliquots or alcohol-fixed slides from cART patients. The clinical specimens were sent to the University of North Carolina (UNC) without personal identifiers, and the DHPS locus was amplified by nested polymerase chain reaction and genotyped by direct DNA sequencing, as previously described [9, 10]. The study was approved by the research and ethics committees of the Hospital Clínic and the UNC, where it received a Category 4 exemption from the UNC Institutional Review Board.

Investigators performing PCR were blinded to the clinical information. *P. jirovecii* DHPS genotypes were classified as described elsewhere [11] as wild-type (genotype 1, Thr55Pro57) or mutants if they presented a nonsynonymous change that resulted in amino acid position 55 (genotype 2, Ala55Pro57), position 57 (genotype 3, Thr55Ser57) or both (genotype 4, Ala55Ser57), or mixed genotypes that included at least 1 mutant genotype.

A standard form including epidemiological and clinical data was completed for each patient. The following variables were recorded: age, gender, risk factors for HIV infection, AIDS-defining events, previous antiretroviral therapy, primary PcP prophylaxis, previous PcP episode, treatment of previous episode, treatment of present episode, changes in treatment, CD4⁺ count ($\times 10^6$ cells/L), death, cause of death, and follow-up at 3 and 6 months. Clinical variables were defined as previously described [12].

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using STATA (StataCorp. 2003. Stata Statistical Software: Release 8.2, College Station, Texas, USA). Quantitative variables were described using the median and interquartile range (IQR) and compared between groups with the Wilcoxon rank-sum test. Qualitative characteristics were described using absolute frequency and percentages and compared between groups with Fisher's exact test. All tests were two-sided with a confident level set to 95%.

Results

One hundred sixty-seven patients were included in the study: 110 HIV-1-infected patients diagnosed with PcP during the pre-cART period and 57 consecutive HIV-1-infected patients with PcP from the cART period.

The *P. jirovecii* DHPS gene was successfully genotyped from 43 of the 110 (39%) pre-cART patients and from 55 of the 57 (96.5%) cART patients. There were no differences in clinical characteristics and outcome between the 98 patients included in this study and the 69 remaining patients for whom DNA could not be amplified (data not shown).

Seventeen patients (17%, 95%CI 10%-25%) had mutations in the DHPS gene: 14 patients (33%, 95%CI 19%-49%) from the pre-cART period and 3 patients (5.5%, 95%CI 1.3%-16%) from the cART period ($P<.01$). The first DHPS mutation appeared in 1992. The distribution of genotypes by year was as follows: 1992 (1 mutation, genotype 4), 1993 (4 mutations, 2 genotype 2, and 2 genotype 3), 1994 (3 mutations, genotype 2), 1995 (6 mutations, genotype 4), 2002 (2 mutations, genotypes 2 and 3), and 2004 (1 mutation, genotype 4), figure 1.

The baseline, clinical outcome, and follow-up characteristics of the 98 HIV-infected patients with PcP, according to the study period (pre-cART or cART) and whether mutations were present or absent are shown in Tables 1 and 2, respectively.

Patients from the pre-cART period were younger than patients from the cART period, although both groups had similar percentages for sex. The pre-cART group was more likely to be homosexual, to have had previous AIDS-defining events, and to be antiretroviral-experienced. The PcP episodes in the pre-cART group had similar median CD4 cell counts to those of the cART group. Patients from the pre-cART period took more primary prophylaxis than c-ART patients, and this prophylaxis was with a sulfa drug in 42% vs. 20%. In addition,

the pre-cART group had more previous PcP episodes; therefore, these patients were taking more sulfa-based secondary prophylaxis than the c-ART group.

Ninety-three percent of the 14 patients who presented a mutant genotype in the pre-cART period were under sulfa drug pressure during primary prophylaxis. Sixty-seven percent of patients from pre-cART group showing genotype 4 received dapsone-pyrimethamine as primary or secondary prophylaxis. None of the patients harboring mutant genotypes during the cART period received primary prophylaxis, as the PcP episode was the HIV debut.

Ninety-one percent of patients from the pre-cART period were treated with TMP-SMX compared with 98% in the cART group. 3-month and 6-month relapse rates were similar in both groups. In-hospital mortality and 3-month mortality were also similar in both groups, but mortality at 6 months was higher in the pre-cART group, although did not reach statistical significance.

Patients with DHPS mutations had a similar median age, sex, and median CD4 cell counts than those with a wild-type genotype. Patients with mutations were more likely to be homosexual, to have previous AIDS criteria and previous PcP episodes, and to be antiretroviral-experienced. Patients harboring DHPS mutations took more primary prophylaxis than patients with a wild-type genotype, and this prophylaxis was with a sulfa drug in 60% vs. 22% of cases, respectively. Besides, patients with a mutant genotype took more secondary prophylaxis as a consequence of a previous PcP episode than patients with a wild-type genotype.

Overall, 95% of patients were treated with TMP-SMX. There were only 3 relapses at 3 months, and 5 at 6 months, in the group of patients with wild-type genotypes. In-hospital mortality, 3-month mortality, and 6-month mortality were low and similar in both groups, regardless whether the patients had DHPS mutations or not.

Discussion

The introduction of cART in 1996 changed the incidence and management of opportunistic infections associated with HIV. The incidence of PcP in Spain has decreased from 10 cases per 100 exposed patients/year in 1996 to 0.1 cases per 100 exposed patients/year today [13, 14]. However, PcP is the most common HIV-related illness in Spain [2].

Our study describes the prevalence of the *P. jirovecii* DHPS gene in HIV-1-infected patients during the pre-cART and cART periods in a single institution in Spain and analyzes outcome in these patients.

We found epidemiological differences between the pre-cART and cART groups. Patients belonging to the pre-cART group were more likely to be younger, drug users, and homosexual, have more previous PcP episodes, be more antiretroviral-experienced, and take more TMP-SMX or dapsone-pyrimethamine prophylaxis. By contrast, patients from the cART group were more likely to be heterosexual and, in almost 50%, the PcP episode was the debut of HIV infection, with the result that they were less antiretroviral-experienced and took less sulfa drug prophylaxis. Therefore, we can assume that the profile of HIV-infected patients with PcP has changed in our population and that these changes could affect the outcome.

Several published studies have demonstrated a significant association between sulfa drug prophylaxis of PcP in HIV-infected patients and the presence of DHPS mutations [3, 4, 5]. In our study, 33% of the patients from the pre-cART group presented mutations compared with 5.5% in the cART group. This difference was because pre-cART patients were under greater pressure at the DHPS locus from sulfa drugs as primary or secondary prophylaxis (58% vs. 25%) than cART patients. This pressure was not so high in cART patients because

nearly 50% were diagnosed with HIV infection at the time of the PcP episode; therefore, they were not receiving primary prophylaxis.

Our results agree with the assumption by Miller et al. [15] that when the selection pressure of sulfa was absent, a reversal of the mutant-to-wild-type genotype ratios was observed. Therefore, it could be presumed that human *Pneumocystis* infection arises from recent transmission, since if reactivation of latent infection were the explanation, then no differences in DHPS genotypes would be observed over time.

Furthermore, in our series, we detected that the different genotypes of DHPS in the pre-cART era seemed to be grouped by year. Thus, the first DHPS mutation appeared in 1992. All the mutations that appeared in 1992 and 1995 were genotype 4, those that appeared in 1993 were genotype 3 and 4, and those appearing in 1994 were genotype 2. This distribution of genotypes by year might support a person-to-person transmission of strain mutants, as patients during those years were followed in the same care facilities, this could be the evidence that they came into contact with each other.

Remarkably, 90% of our genotype-4 strains belonged to pre-cART patients and, in 78% of these, an association with sulfa drug exposure was observed. Genotype 4 has been reported to be particularly associated with dapsone prophylaxis [15]. In our series, 67% of patients showing this genotype were exposed to prophylactic dapsone-pyrimethamine.

Published papers [5-8] have reported controversy over the role of DHPS mutations in the response to treatment of PcP and outcome. In our study, the presence of mutations in the DHPS gene did not worsen the prognosis of PcP. Overall, 95% of patients were treated with TMP-SMX and the response to treatment was successful in most cases. Patients harboring DHPS mutations had similar in-hospital, 3-month, and 6-month mortality rates to patients with wild-type DHPS genotype. There were no relapses at 3 and 6 months in the group of patients with the mutant DHPS genotype.

Our study has several limitations. One potential weakness is that no data from patients between 1995 and 2001 was included. It would have been of interest to see if the trends identified would have been apparent there as well. A second limitation is that from pre-cART period, DNA was only available from stained slides, and this could generate a lower DNA amplification. However, there were no differences in baseline, clinical characteristics and outcome between the patients included in this study and the patients for whom DNA could not be amplified.

In summary, we conclude that whereas mutations in the DHPS gene are infrequent in the cART period, they were more common during the pre-cART period, when patients were under higher sulfa drug pressure. However, their presence did not worsen the prognosis of PcP, as mutations confer only low-level resistance at low doses of sulfa drugs administered during prophylaxis and the response to TMP-SMX with therapeutic doses was successful in most cases.

Acknowledgments

We thank the staff of the Microbiology Laboratory of Hospital Clínic, Barcelona, Spain and the staff of Steve Meshnick's laboratory at the University of North Carolina, USA for their expert assistance. The laboratory work at UNC was supported by NIH grant 1RO1 AI 46966. The work in Spain was supported by the "Fundación para la Investigación y la Prevención del SIDA en España, Madrid (Spain)" (FIPSE grant - 24198/ 01; Abbott Laboratories, Boehringer Ingelheim, Bristol Myers Squibb, GlaxoSmithKline, Merck Sharp and Dohme), the AIDS Plan Secretariat of the Spanish Ministry of Health, Madrid (Spain); Supported by the "Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III, Madrid (Spain)", Spanish Network for AIDS Research (RIS; ISCIII-RETIC RD06/006).

M.J.A-M. received a Research Grant from Fundació Clínic, Barcelona and from the Spanish Society of Infectious Diseases and Clinical Microbiology (SEIMC).

J.M.M. was a recipient of a Research Grant from the “Institut d’Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)” and the “Conselleria de Salut de la Generalitat de Catalunya, Barcelona (Spain)”. None of the authors has any potential conflicts of interest with this study.

References

1. Huang L. Clinical presentation and diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. In: Walzer P, Cushion MT. *Pneumocystis* pneumonia, Marcel and Dekker editors, 3rd edition, 2005; 349-406.
2. Caro-Murillo AM, Castilla J, Pérez-Hoyos S, et al. Cohorte RIS de pacientes con infección por VIH sin tratamiento antirretroviral previo (CoRIS): metodología y primeros resultados. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25(1): 23-31.
3. Lane BR, Ast JC, Hossler PA. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Inf Dis* 1997; 175: 482-5.
4. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, et al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* 1998; 12: 873-8.
5. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, et al. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis*. 2000 Aug; 182 (2):551-7.
6. Helweg-Larsen J, Benfiel TL, Eugen-Olsen J, Lundgren JD, Lundgren B. Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P carinii* pneumonia. *Lancet* 1999; 354:1347-51.
7. Valerio A, Tronconi E, Mazza F, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Italian AIDS patients. Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2007 Aug 15; 45 (5): 521-8.

8. Navin TR, Beard CB, Huang L, et al. Effect of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P carinii* pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study. *Lancet* 2001; 358: 545-49.
9. Zar HJ, Álvarez-Martínez MJ, Harrison A, Meshnick SR. Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Infect Dis* 2004; 39: 1047-51
10. Álvarez-Martínez MJ, Miró JM, Valls ME et al. Sensitivity and specificity of nested and real time PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diagn Microb Infect Dis* 2006 Oct; 56 (2): 153-60.
11. Beard CB, Carter JL, Keely SP, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 265-277.
12. Álvarez-Martínez MJ, Moreno A, Miró JM, et al. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Spanish HIV-Infected Patients in the Combined Antiretroviral Therapy Era: Prevalence of DHPS Mutations and Prognostic Factors of Mortality. *Diagn Microb Infect Dis* 2008 Jun 11 [Epub ahead of print].
13. Benito N, Rañó A, Moreno A, et al. Pulmonary infiltrates in HIV-infected patients in the Highly Active Antiretroviral Therapy era in Spain. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2001; 27 (1): 35-43.
14. San-Andrés FJ, Rubio R, Castilla J, et al. Incidence of Acquired Immunodeficiency Syndrome-Associated opportunistic diseases and the effect of treatment on a cohort of 1115 patients infected with human immunodeficiency virus, 1989-1997. *Clin Infect Dis* 2003; 36:1177-85
15. Miller RF, Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE. Genotypes of *Pneumocystis jirovecii* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3979-81.

Table 1. Baseline, Clinical Characteristics, and Outcome of PCP Patients According to Period of Study.

	Study Period		<i>P</i>
	Pre-cART (n=43)	cART (n=55)	
Characteristics			
Age (median, IQR)	35 (29, 43)	42 (34, 47)	.03
Sex (male)	37 (86%)	41 (69%)	.15
HIV risk factor			<.01
Drug abuse	15 (35%)	16 (29%)	.66
Heterosexual	9 (21%)	29 (53%)	<.01
Homosexual	14 (33%)	7 (13%)	.03
Previous C events ^a	20 (46%)	9 (16%)	<.01
Previous ART	23 (53%)	18 (33%)	.06
PcP debut of HIV	16 (37%)	25 (45%)	.54
Primary prophylaxis	21 (51%)	11 (20%)	<.01
TMP-SMX	6 (29%)	11 (100%)	
Dapsone-pyrimeth	11 (52%)	-	
Pentamidine	3 (14%)	-	
Others	1 (5%)	-	
Previous PCP	9 (21%)	3 (5%)	.04
Secondary prophylaxis			.05
TMP-SMX	2	3	
Dapsone-pyrimeth	6	-	
Pentamidine	1	-	
CD4/mm ³ (median IQR)	28 (11, 70)	20 (6, 44)	.36
Mutant DHPS genotypes	14 (33%)	3 (5.5%)	< 0.01
2 (55A, 57P)	3 (7 %)	1 (1.8%)	
3 (55T, 57S)	2 (5 %)	1 (1.8%)	
4 (55A, 57S)	9 (21%)	1 (1.8%)	
Treatment			.15
TMP-SMX	30 (91%)	54 (98%)	
Pentamidine/others ^b	3 (9%)	1 (2%)	
No data	10	-	
Mortality	3 (7%)	7 (13%)	.50
3 rd Month ^c			
Relapses	1 (3%)	2 (4%)	1.00
Mortality	1 (3%)	1 (2%)	1.00
6 th Month ^c			
Relapses	3 (7%)	2 (4%)	.66
Mortality	5 (12%)	3 (5%)	.46

Abbreviations: ART, antiretroviral therapy; IQR, interquartile range; NS, nonsignificant; TMP-SMX,

trimethoprim-sulfamethoxazole. ^a Previous C events; ^b Pentamidine or others; ^c According to surviving patients.

Table 2. Baseline, Clinical Characteristics, and Outcome of PCP Patients According to DHPS Genotype.

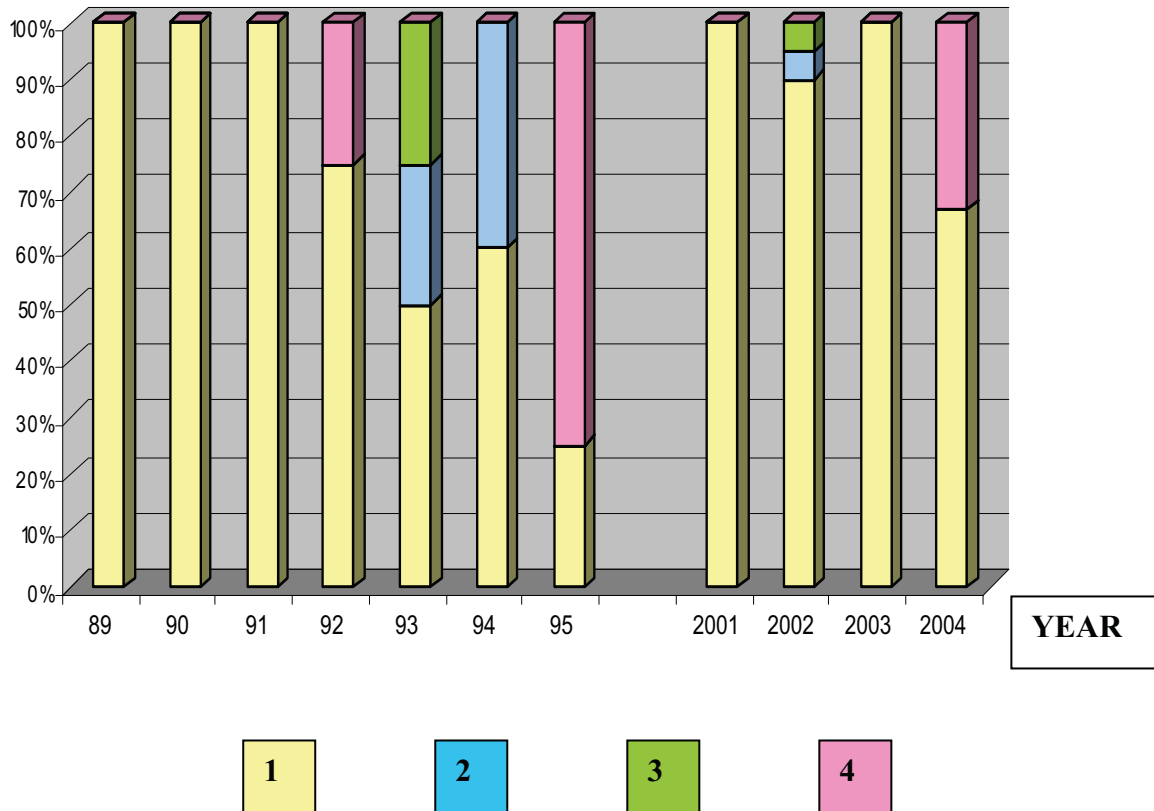
	DHPS mutation		p
	NO (n=81)	YES (n=17)	
Characteristics			
Age (median, IQR)	39 (32, 46)	40 (33, 44)	.98
Gender (male, %)	65 (80%)	13 (76%)	.75
HIV risk factor			0.03
Drug abuse	28 (35%)	3 (18%)	.25
Heterosexual	32 (39%)	6 (35%)	.79
Homosexual	13 (17%)	8 (47%)	< 0.01
Previous C events ^a	20 (25%)	9 (53%)	0.04
Previous ART	29 (36%)	12 (71%)	0.01
Primary prophylaxis	21 (27%)	11 (65%)	< 0.01
TMP-SMX	13	4	
Dapsone-pyrimeth	5	6	
Pentamidine	2	1	
Others	1	-	
Previous PCP	8 (10%)	4 (23%)	.21
Secondary prophylaxis			
TMP-SMX	4	1	
Dapsone-pyrimeth	3	3	
Pentamidine	1	-	
CD4/mm ³ (median, IQR)	21 (9, 59)	13 (3, 54)	.13
Treatment			
TMP-SMX	69 (96%)	14 (93%)	.54
Pentamidine/others ^b	3 (4%)	1 (7%)	
No data	8	2	
Mortality	9 (11%)	1 (6%)	1.00
3 rd Month ^c			
Relapses	3 (4%)	0	1.00
Mortality	1 (1%)	1 (6%)	.33
6 th Month ^c			
Relapses	5 (6%)	0	.58
Mortality	6 (7%)	2 (12%)	.63

Abbreviations: ART, antiretroviral therapy; IQR, interquartile range; NS, nonsignificant;

TMP-SMX, trimethoprim-sulfamethoxazole. ^a Previous C events; ^b Pentamidine or others;

^c According to surviving patients.

Figure 1. Distribution of DHPS genotypes by year



Genotypes of DHPS of *P. jirovecii* according to Beard et al., 2000

Artículo 4.

Prevalence of Dihydropteroate Synthase Mutants in HIV-Infected South African Children with *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia.

Heather J. Zar, **Miriam J. Álvarez-Martínez**, Allen Harrison, and Steven R. Meshnick

Clinical Infectious Diseases (2004) 39: 1047-51.

Artículo 4.**Prevalencia de las Mutaciones en la Dihidropteroato Sintetasa (DHPS) en Niños Sudafricanos Infectados por el VIH y con Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*.**

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PcP), antes *P. carinii*, es la principal causa de mortalidad en los niños africanos infectados por VIH. Sin embargo, la prevalencia de las mutaciones en el gen que codifica la DHPS en esta población, no ha sido descrita hasta el momento.

El objetivo de este trabajo fue investigar la prevalencia de las mutaciones en el gen de DHPS de *P. jirovecii* en niños de Ciudad del Cabo (Sudáfrica), **Figura 10**, infectados por VIH y con PcP, mediante la amplificación de ADN con dos métodos diferentes de PCR.

El gen de la DHPS de *P. jirovecii* fue amplificado en 30 muestras respiratorias, 26 (86.7%) presentaron genotipo *wild-type*. Cuatro muestras (13.3%) mostraron mutaciones, 2 de ellas mutaciones sencillas, la tercera, una doble mutación, y la cuarta presentó un genotipo mixto, *wild-type* junto a una mutación sencilla. Sólo un niño había recibido profilaxis con TMP-SMX, y éste presentó genotipo *wild-type*. La mortalidad global fue de 66.7% (20 de los 30 niños), y no hubo diferencias estadísticamente significativas entre la mortalidad de los pacientes con genotipo salvaje (65.4%, 17 de 26), y la de los que presentaron mutaciones (75%, 3 de 4; $p=0.8$).

Las mutaciones en la DHPS de *P. jirovecii* son infrecuentes en niños sudafricanos. Sin embargo, el incremento del uso de la profilaxis con TMP-SMX, puede determinar un aumento en el desarrollo de genotipos mutantes.



Figura 10. Localización de Ciudad del Cabo (Sudáfrica), centro de estudio, artículo 4.

Prevalence of Dihydropteroate Synthase Mutants in HIV-Infected South African Children with *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia

H. J. Zar,¹ M. J. Alvarez-Martinez,² A. Harrison,² and S. R. Meshnick²

¹School of Child and Adolescent Health, Red Cross Childrens Hospital, University of Cape Town, South Africa; and ²Departments of Epidemiology and Microbiology and Immunology, University of North Carolina—Chapel Hill

Background. *Pneumocystis jiroveci* (formerly *Pneumocystis carinii*) pneumonia (PCP) is a major cause of mortality in human immunodeficiency virus (HIV)-infected infants in Africa, but the prevalence of mutations in the gene encoding dihydropteroate synthase (DHPS) in isolates from Africa has not been reported.

Methods. This study investigated the prevalence of DHPS mutations in *P. jiroveci* isolates from South African HIV-infected children with PCP by amplifying DNA using 2 different polymerase chain reactions.

Results. *P. jiroveci* DNA from 30 respiratory specimens was amplified; 26 specimens (86.7%) contained wild-type DHPS alleles. Of the 4 samples (13.3%) with DHPS mutations, 2 contained a homogenous population with single DHPS mutations, 1 contained a homogenous population with 2 DHPS mutations, and the fourth contained a heterogenous population of organisms with both wild-type and single-mutant DHPS genotypes. Only 1 child was receiving trimethoprim-sulphamethoxazole (TMP-SMZ) prophylaxis; this patient was infected with wild-type *P. jiroveci*. The mortality rate (overall, 20 [66.7%] of 30 children) was not significantly different between children infected with wild-type *P. jiroveci* (17 [65.4%] of 26) and those infected with mutant strains (3 [75%] of 4; $P = .8$).

Conclusions. DHPS mutations are uncommon in *P. jiroveci* isolates from South Africa. However, increasing use of TMP-SMZ prophylaxis may result in widespread development of mutations.

Pneumocystis jiroveci (formerly *Pneumocystis carinii*) pneumonia (PCP) has increasingly been reported as an important cause of hospitalization and death in HIV-infected infants in Africa [1]. Postmortem studies have detected PCP in 16%–51% of HIV-positive African children who died from respiratory illness [2–4]. In a large, recent, autopsy-based study of Zambian children who died from respiratory causes, *P. jiroveci*, which was found in 51% of cases, was the most common cause of death in HIV-infected infants <6 months of age; among infants aged 6–11 months, PCP accounted for 19% of deaths [4]. Prospective African studies have confirmed that *P. jiroveci* is an important cause of severe pneumonia in HIV-infected infants. In a prospective study to investigate the etiology and outcome of com-

munity-acquired pneumonia in South African children admitted to a tertiary care hospital, PCP was the AIDS-defining illness in 20% of HIV-infected children; the mortality rate among those with PCP (47%) was much higher than among those without PCP (18%) [5]. Of 93 HIV-infected Malawian children hospitalized with severe pneumonia, 17% had PCP [6]. A South African study of hospitalized HIV-infected children identified *P. jiroveci* in 44% of the severe pneumonia cases [7].

Trimethoprim-sulphamethoxazole (TMP-SMZ) is the primary agent of choice for prophylaxis and treatment of PCP. Activity against pneumocystis is primarily due to the sulphamethoxazole component, which inhibits dihydropteroate synthase (DHPS) [8]. Prophylaxis has not been widely used in African countries because of the difficulties in identifying HIV-infected infants perinatally, the lack of resources to implement widespread prophylaxis, and the concern about the development of antimicrobial resistance to TMP-SMZ [9, 10]. Nevertheless, TMP-SMZ is widely available, affordable, and effective for preventing PCP, as has been shown by historical comparisons of the incidence of PCP before

Received 14 January 2004; accepted 11 May 2004; electronically published 7 September 2004.

Reprints or correspondence: Prof. Heather Zar, ICH Bldg., 5th Fl., Red Cross War Memorial Children's Hospital, Rondebosch, 7700, South Africa (hzars@ich.uct.ac.za).

Clinical Infectious Diseases 2004;39:1047–51

© 2004 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.
1058-4838/2004/3907-0023\$15.00

the advent of prophylaxis [11–14]. Use of prophylaxis against PCP has been reported to decrease the risk and severity of this disease in African HIV-infected infants [5]. A study done in Cape Town, South Africa, found that use of TMP-SMZ prophylaxis was associated with significant protection against PCP, because only 1 (1.7%) of 59 children who received prophylaxis developed PCP, compared with 14 (15.2%) of 92 who did not receive prophylaxis (relative risk, 0.11; 95% CI, 0.02–0.82; $P = .007$) [5]. Use of TMP-SMZ prophylaxis has also been reported to be associated with a lower mortality rate among HIV-infected children hospitalized with pneumonia, compared with those who had not received prophylaxis [15]. Current World Health Organization HIV/AIDS guidelines recommend the use of TMP-SMZ prophylaxis in all HIV-exposed infants who are between 6 weeks and 15 months of age and in clinically symptomatic HIV-infected children and adults or those with severe immunosuppression (i.e., those with a CD4 cell percentage of <15%) [16]. More-widespread use of TMP-SMZ prophylaxis can be anticipated as these guidelines are implemented in African countries.

Mutations in the *P. jiroveci* gene coding for DHPS have been increasingly reported in isolates in developed countries, in association with widespread use of TMP-SMZ prophylaxis [17–20]. The most common DHPS mutations reported are an amino acid change at positions 55 (from threonine to alanine) and 57 (from proline to serine). Studies have found that mutant strains are associated with the failure of TMP-SMZ prophylaxis [17–20]. An increased mortality rate associated with the presence of DHPS mutations in cases of PCP has been reported. However, no correlation between specific treatment, DHPS mutations, and outcome was described [21]. The prevalence of mutant *P. jiroveci* isolates in Africa has not been reported. Because the use of TMP-SMZ prophylaxis is increasing in African countries and the majority of HIV-infected people in Africa reside in the sub-Saharan region, it is becoming increasingly important to monitor the development and prevalence of mutant strains in this geographical area. The aim of this study was to investigate the prevalence of DHPS mutations in *P. jiroveci* isolates from HIV-infected children hospitalized with PCP in Cape Town.

METHODS

A prospective study of *P. jiroveci* isolates obtained from HIV-infected children admitted for PCP over a 2-year period to Red Cross Childrens Hospital, University of Cape Town, South Africa, was performed. Children admitted to the hospital with clinical signs suggestive of PCP had respiratory specimens obtained for diagnosis. Treatment with a standard regimen of TMP-SMZ (10 mg/kg TMP loading dose, followed by 5 mg/kg q6h) and corticosteroids (2 mg/kg prednisone for 5 days, then 1 mg/kg for 5 days, followed by 0.5 mg/kg for 5 days)

was initiated. Specimens of induced sputum or nondirected bronchoalveolar lavage (BAL) fluid were obtained for immunofluorescent detection of *P. jiroveci*, as described elsewhere [22]. Samples with positive immunofluorescence results were pelleted, placed in ethanol, and delivered to the University of North Carolina–Chapel Hill for further analysis. The study was approved by the research and ethics committees of the University of Cape Town and the University of North Carolina–Chapel Hill.

The QIAamp DNA extraction kit (Qiagen) was used to extract DNA from the pellet obtained after centrifugation of sputum or BAL specimens. DNA was amplified by PCR in a programmable thermal controller (MJ Research) using a nested PCR protocol, as described elsewhere [20, 23, 24]. Two different polymerases—the classical recombinant Taq DNA polymerase (Invitrogen) and the new-generation HotStar Taq polymerase (Qiagen)—were used. The same set of primers, each with different programs in the thermocycler, were used with both polymerases. In the first round of PCR, the primers F₁ (5'-CCTGGT-ATTAACCAGTTTTGCC-3') and B₄₅ (5'-CAATTTAATAAA-TTCTTTCCAAATAGCATC-3') were used. In the second round, the primers were A_{HUM} (5'-GCGCCTACACATATTATGGCCATTTTAAATC-3') and BN (5'-GGAACTTTCAACTTGGCAAC-CAC-3'). The PCR mixtures contained template DNA (5 μ L), primers (0.4 μ mol/L each), dNTPs (0.2 mmol/L), and MgCl₂ (2 mmol/L) if Taq DNA polymerase (2.5 U) was used, but no MgCl₂ if HotStar Taq polymerase (2.5 U) was used, as well as reaction buffer (each polymerase had its own buffer) and water, making a total volume of 100 μ L.

When recombinant Taq DNA polymerase was used, thermocycler settings for the first round were denaturation at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles at 92°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 60 s, and a termination step at 72°C for 5 min. Thermocycler settings for the second round were 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 92°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 60 s, and a termination step at 72°C for 5 min. The same conditions were employed when HotStar Taq polymerase was used, except that the initial denaturation step (for both the first and second rounds) was 95°C for 15 min instead of 94°C for 5 min.

For positive controls, BAL specimens obtained from HIV-infected patients with PCP and known DHPS sequences were used, whereas BAL specimens obtained from HIV-infected patients without PCP were used as negative controls. For analysis of the PCR-generated fragments, 8 μ L of each 100- μ L PCR amplification product was examined by electrophoresis on 2% agarose gels for a band of 335 bp corresponding to the size of the *P. jiroveci* gene encoding DHPS. The DNA from the agarose gel band was purified with the QIAquick gel extraction kit (Qiagen), according to the manufacturer's directions. The PCR fragments were sequenced on an automated DNA sequencer

Table 1. *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase genotypes in HIV-infected African children with *P. jiroveci* pneumonia.

Patient	ICU admission	TMP-SMZ prophylaxis	Treatment outcome	Codon 55, 56, 57	Amino acids 55/57
1	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
2	No	No	Death	ACACGGCCT	T/P
3	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
4	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
5	Yes	No	Survival	ACACGGCCT	T/P
6	Yes	No	Death	AGACGGCTT	A/S
7	Yes	No	Survival	ACACGGCCT	T/P
8	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
9	No	No	Death	ACACGGCTT	T/S
10	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
11	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
12	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
13	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
14	Yes	No	Survival	ACACGGCCT	T/P
15	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
16	Yes	No	Survival	ACACGGCCT	T/P
17	Yes	No	Survival	ACACGGCCT	T/P
18	Yes	No	Death	AGACGGCCT	A/P
19	Yes	No	Survival	ACACGGCCT	T/P
20	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
21	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
22	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
23	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
24	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
25	Yes	No	Survival	ACACGGCCT	T/P
26	Yes	No	Survival	ACACGGCCT	T/P
27	Yes	No	Death	ACACGGCCT	T/P
28	Yes	No	Survival	ACACGGCCT	T/P
29	Yes	Yes	Death	ACACGGCCT	T/P
30	Yes	No	Survival	A(G)CACGGCCT	(T+A)/P ^a

NOTE. A, alanine; ICU, intensive care unit; P, proline; S, serine; T, threonine; TMP-SMZ, trimethoprim-sulfamethoxazole.

^a Mixed infection.

(model ABI 3700; Applied Biosystems), using 2 of the primers described above. Sequence analyses were performed using Chromas 2.23 (Technelysium Pty. Ltd.), ClustalX 1.8, and GeneDoc (multiple sequence alignment editor, version 2.6.002), and the results were compared with the wild-type sequence for the *P. jiroveci* gene encoding DHPS. Results were analyzed using Epi Info, version 6.4 (Centers for Disease Control and Prevention). Mortality among children infected with wild-type *P. jiroveci* was compared with that among children infected with mutant strains using the χ^2 test.

RESULTS

Results of immunofluorescence for PCP were positive for 33 respiratory specimens obtained from 33 HIV-infected children. Of these, 30 samples were amplified using 1 of the 2 sets of

PCR protocols. Of the 30 children, 20 (66.7%) were male; the mean age was 3.2 months (range, 1.5–12 months). Only 1 child was taking TMP-SMZ prophylaxis, because HIV infection had not been previously diagnosed in the others. In 29 children (97%), PCP was the presenting illness that resulted in a diagnosis of HIV infection. A total of 28 children (93.3%) were admitted to an intensive care unit.

A total of 26 samples (86.7%) were infected with *P. jiroveci* with wild-type DHPS alleles, whereas 4 specimens (13.3%) contained DHPS mutations (table 1). Three of these 4 specimens contained homogenous *P. jiroveci* isolates—the first contained a double mutation in DHPS consisting of a change at amino acid 55 and a change at amino acid 57, the second had a single polymorphism at amino acid 57, and the third contained a change at amino acid 55. One sample contained a heteroge-

neous population of *P. jiroveci* isolates consisting of a wild-type strain and a strain with a single mutation at amino acid 55.

Twenty children (66.7%) died during hospitalization, including the single child receiving TMP-SMZ prophylaxis. The mortality rate among children infected with wild-type *P. jiroveci* (17 [65.4%] of 26 children) was not significantly different, compared with those infected with mutant strains (3 [75%] of 4 children) ($P = .8$).

DISCUSSION

This study is the first to report on the prevalence of *P. jiroveci* DHPS mutations in Africa. Most cases of PCP in South African children were caused by wild-type *P. jiroveci*, but DHPS mutations at codons 55 and 57, which may be responsible for low-level resistance to drugs containing sulphur, occurred in a minority of isolates. This is in contrast to reports from the United States, where the prevalence of DHPS mutations reported in patients with AIDS and PCP has been reported to be 43%–68% [17–20]. The low prevalence of mutant *P. jiroveci* observed in our study may be due to the lack of exposure to TMP-SMZ prophylaxis in almost all of the children. In addition, TMP-SMZ is rarely used for treatment of childhood illnesses (other than PCP) in South Africa because of high levels of antimicrobial resistance to this drug. Thus, a β -lactam antibiotic or a cephalosporin, rather than TMP-SMZ, would be the preferred drug for therapy of childhood pneumonia, otitis media, or other common bacterial infections and, consequently, the majority of children would not be exposed to sulphur-containing drugs [25]. Studies from the United States indicate that development of DHPS mutations occurs more commonly in HIV-infected patients with PCP who have received sulphur prophylaxis, is related to duration of prophylaxis, and has increased over time in association with greater use of TMP-SMZ prophylaxis [17–20]. The occurrence of mutations in children who had not received prior TMP-SMZ prophylaxis may possibly be ascribed to primary infection acquired from a person infected with a mutant strain. In support of this, a recent report described probable mother-to-child transmission of pneumocystis infection [26]. In addition, mutant strains have increasingly been found in HIV-infected people in the United States who have not been receiving prophylaxis [19]. However, we were unable to test this hypothesis, because we could not obtain clinical information or samples from the mothers or close contacts of children in our study.

The high mortality observed in this study, which occurred despite the use of intensive care unit facilities and antipneumocystis therapy including steroids, is consistent with the poor outcome reported for HIV-infected children with PCP in developing countries [5–7]. Mortality could not be ascribed to resistance to TMP-SMZ among children in our study, because mortality rates were similar among those who were infected

with wild or mutant strains. Moreover, the clinical significance of DHPS mutations at positions 55 and 57 is unclear. Failure to prevent PCP in patients receiving TMP-SMZ prophylaxis and infection with mutant *P. jiroveci* suggests that such mutations may confer a low level of resistance that is sufficient to overcome the inhibitory effect of prophylaxis. However, the effect of mutant strains on clinical illness and outcome from PCP is controversial, and the efficacy of high-dose TMP-SMZ therapy may be variable. A few studies have reported a similar outcome among HIV-infected patients with wild-type and mutant PCP, whereas others have found that patients infected with mutant strains have a poorer response to therapy [18, 21, 27]. In addition, in our study, a type 2 error may have occurred because of the small sample size. Larger studies of the relationship between clinical outcome and infection with mutant strains in developing countries are needed.

Use of TMP-SMZ prophylaxis can substantially reduce the incidence of PCP [5, 11–14], especially in resource-poor countries where relatively few HIV-infected people have access to HAART. In addition, adult data from West Africa suggests that TMP-SMZ prophylaxis can significantly reduce morbidity and mortality from other bacterial infections [28–30]. The high mortality associated with primary pneumocystis infection in children and the emergence of PCP as an increasingly important infection in African patients [1] indicate that timely identification of HIV-infected infants and use of TMP-SMZ prophylaxis should be a priority [9]. However, as TMP-SMZ prophylaxis is increasingly used, so the potential for emergence of DHPS mutations may occur, as is evident in developed countries. Moreover, studies from developed countries suggest that person-to-person transmission of pneumocystis may occur. Thus, as the prevalence of mutant strains increases, the potential for primary infection with resistant strains in children not receiving prophylaxis may increase [19, 25]. Ongoing monitoring of the development of mutant *P. jiroveci* strains in African countries is therefore becoming increasingly important and may help to elucidate the mechanisms responsible for the development of resistance and the associated clinical implications.

DHPS mutations are uncommon in *P. jiroveci* isolates from HIV-infected children in Cape Town. DHPS mutations at codons 55 and 57, which may be responsible for low-level resistance to therapy that includes sulphur, are only beginning to accumulate. However, increasing use of TMP-SMZ prophylaxis may result in more-widespread development of mutations; ongoing surveillance of this is needed.

Acknowledgments

We thank Patti Apolles for assisting with specimen and data collection, the ward staff at Red Cross Children's Hospital (Cape Town, South Africa) for helping with specimen collection, and the staff in the microbiology laboratory for processing specimens.

Financial support. Bristol-Myers Squibb (Secure the Future grant) and the National Institutes of Health (grant 1R01 AI 46966, for PCR analyses). M.J.A.-M. was the recipient of a research grant from the Fund for the Improvement of Postsecondary Education (Spain).

Conflict of interest. All authors: No conflict.

References

1. Fisk DT, Meshnick S, Kazanjian PH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* **2003**; 36:70–8.
2. Lucas SB, Peacock CS, Hounnou A, et al. Disease in children infected with HIV in Abidjan, Cote d'Ivoire. *BMJ* **1996**; 312:335–8.
3. Vetter KM, Djomand G, Zadi F, et al. Clinical spectrum of human immunodeficiency virus disease in children in a West African city. *Pediatr Infect Dis J* **1996**; 15:438–42.
4. Chintu C, Mudenda V, Lucas S, et al. Lung disease at necropsy in African children dying from respiratory illnesses: a descriptive necropsy study. *Lancet* **2002**; 360:985–90.
5. Zar HJ, Dechaboon A, Hanslo D, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in South African children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* **2000**; 19:603–7.
6. Graham SM, Mtitimila EI, Kamanga HS, et al. The clinical presentation and outcome of *Pneumocystis carinii* pneumonia in Malawian children. *Lancet* **2000**; 355:369–73.
7. Ruffini DD, Madhi SA. The high burden of *Pneumocystis carinii* pneumonia in African HIV-1-infected children hospitalised for severe pneumonia. *AIDS* **2002**; 16:105–12.
8. Hughes WT, Killmar JT, Oz HS. Relative potency of 10 drugs with anti-*Pneumocystis carinii* activity in an animal model. *J Infect Dis* **1994**; 170:906–11.
9. Graham SM. Prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia for HIV-exposed infants in Africa. *Lancet* **2002**; 360(9349):1966–8.
10. Zar HJ. Prevention of HIV-associated respiratory disease in developing countries: potential benefits. *Int J Tuberc Lung Dis* **2003**; 7:820–7.
11. Duong T, Ades AE, Gibb DM, Tookey PA, Masters J. Vertical transmission rates for HIV in the British Isles: estimates based on surveillance data. *BMJ* **1999**; 319:1227–9.
12. Choekhaibulkit K, Wanachiwanawain F, Chearskul S, Wanprapa N, Unganot K. *Pneumocystis carinii* severe pneumonia among human immunodeficiency virus-infected children in Thailand: the effect of primary prophylaxis strategy. *Pediatr Infect Dis J* **1999**; 18:147–52.
13. Rigaud M, Pollack H, Leibovitz E, et al. Efficacy of primary chemoprophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia during the first year of life in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Pediatr* **1994**; 125:476.
14. Thea DM, Lambert G, Weedon J, et al. Benefit of primary prophylaxis before 18 months of age in reducing the incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia and early deaths in a cohort of 112 human immunodeficiency virus-infected infants. *Pediatrics* **1996**; 97:59–64.
15. Madhi SA, Cutland C, Ismail K, et al. Ineffectiveness of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis and the importance of bacterial and viral coinfections in African children with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Infect Dis* **2002**; 35:1120–6.
16. World Health Organization, UNAIDS. Provisional WHO/UNAIDS recommendations on the use of cotrimoxazole prophylaxis in adults and children living with HIV/AIDS in Africa. *Afr Health Sci* **2001**; 1:30–1.
17. Nahimana A, Rabodonirina M, Zanetti G, et al. Association between a specific *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase mutation and failure of pyrimethamine/sulfadoxine prophylaxis in human immunodeficiency virus-positive and -negative patients. *J Infect Dis* **2003**; 188:1017–23.
18. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, et al. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis* **2000**; 182:551–7.
19. Huang L, Beard CB, Creasman J, et al. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis* **2000**; 182:1192–8.
20. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, et al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* **1998**; 12:873–8.
21. Helweg-Larsen J, Benfield TL, Eugen-Olsen J, Lundgren JD, Lundgren B. Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *Lancet* **1999**; 354(9187):1347–51.
22. Zar HJ, Tannenbaum E, Hanslo D, Hussey G. Sputum induction as a diagnostic tool for community-acquired pneumonia in infants and young children from a high HIV prevalence area. *Pediatr Pulmonol* **2003**; 36:58–62.
23. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* **1997**; 175:482–5.
24. Beard CB, Carter JL, Keely SP, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* **2000**; 6:265–72.
25. South African integrated management of childhood illness guideline. Pretoria, South Africa: Department of Health, September **2001**.
26. Miller RF, Ambrose HE, Novelli V, Wakefield AE. Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* infection. *J Clin Microbiol* **2002**; 40:1555–7.
27. Navin TR, Beard CB, Huang L, et al. Effect of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P. carinii* pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study. *Lancet* **2001**; 358(9281):545–9.
28. Wiktor SZ, Sassan-Morokro M, Grant AD, et al. Efficacy of trimethoprim-sulphamethoxazole prophylaxis to decrease morbidity and mortality in HIV-1 infected patients with tuberculosis in Abidjan, Cote d'Ivoire: a randomised controlled trial. *Lancet* **1999**; 353:1469–75.
29. Anglaret X, Chene G, Attia A, et al. Early chemoprophylaxis with trimethoprim-sulphamethoxazole for HIV-1 infected adults in Abidjan, Cote d'Ivoire: a randomised trial. *Lancet* **1999**; 353:1463–8.
30. Castejon K, Anglaret X, Attia A, et al. Effect of early chemoprophylaxis with cotrimoxazole on nutritional status evolution in HIV-1 infected adults in Abidjan, Cote d'Ivoire. *AIDS* **2001**; 15:869–76.

Artículo 5.

Pneumocystis Pneumonia in HIV-Positive Adults, Malawi.

Joep J.G., van Oosterhout, Miriam K. Laufer, M. Arantza Pérez, Stephen M. Graham, Nelson Chimbiya, Phillip C. Thesing, **Miriam J. Álvarez-Martínez**, Paul E. Wilson, Maganizo Chagomerana, Eduard E. Zijlstra, Terrie E. Taylor, Christopher V. Plowe, Steven R. Meshnick.

Emerging Infectious Diseases 13(2) (2007) 325-328.

Artículo 5.**Neumonía por *Pneumocystis* en Pacientes Adultos VIH-positivos en Malawi.**

Este trabajo describe la epidemiología de la neumonía por *Pneumocystis* en pacientes adultos infectados por el VIH en Blantyre (Malawi), **Figura 11**. Para ello se incluyó, de forma prospectiva, a 660 pacientes VIH-positivos diagnosticados de PcP mediante inmunofluorescencia en esputo inducido, PCR a tiempo real, o seguimiento clínico post-tratamiento.

Se demostró que la incidencia de la PcP era mayor en pacientes con más bajo número de linfocitos CD4, sin embargo, la incidencia de la PcP en pacientes VIH-positivos en Malawi era menor que la de la tuberculosis pulmonar y la de la neumonía bacteriana en dicha población.



Figura 11. Localización de Blantyre (Malawi), centro de estudio, artículo 5.

Pneumocystis Pneumonia in HIV-positive Adults, Malawi¹

Joep J.G. van Oosterhout,* Miriam K. Laufer,†
M. Arantza Perez,* Stephen M. Graham,*
Nelson Chimbiya,* Phillip C. Thesing,*
Miriam J. Álvarez-Martínez,‡ Paul E. Wilson,‡
Maganizo Chagomerana,* Eduard E. Zijlstra,*
Terrie E. Taylor,*§ Christopher V. Plowe,†
and Steven R. Meshnick‡

In a prospective study of 660 HIV-positive Malawian adults, we diagnosed *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PcP) using clinical features, induced sputum for immunofluorescent staining, real-time PCR, and posttreatment follow-up. PcP incidence was highest in patients with the lowest CD4 counts, but PcP is uncommon compared with incidences of pulmonary tuberculosis and bacterial pneumonia.

The incidence of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PcP) in HIV-infected adults in the sub-Saharan African region remains uncertain. That PcP is common in African children <1 year of age is well documented (1), but reported prevalence and incidence rates in adult African populations vary widely (2). Many of these reports were cross-sectional studies in selected populations from tertiary hospitals (3–5), and therefore might contain selection bias that favors identifying higher rates of PcP.

To our knowledge, no large prospective studies have been done by using broncho-alveolar lavage (BAL) in combination with immunofluorescent (IF) staining for *P. jirovecii* cysts, the diagnostic procedures of choice. Real-time PCR performed on sputum samples has high sensitivity but low specificity for PcP (6,7). The few studies in African adults that used PCR assays for *Pneumocystis* did not distinguish subclinical colonization from infection, mainly because of limited follow-up after diagnosis (3,4). We describe here the incidence of PcP from a large cohort study of HIV-infected Malawian adults that used a comprehensive diagnostic approach that included induced sputum with IF staining, real-time PCR, and follow-up after diagnosis and treatment.

The Study

HIV-infected adults (>15 years of age), who sought treatment at a government health center in the township of Ndirande, Blantyre, Malawi, were enrolled in a prospective, community-based study to determine the incidence of infections that were preventable by trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis (8). Clinical evaluations were performed monthly and at sick visits occurring between the scheduled monthly evaluations. CD4 counts were determined every 4 months. Standardized diagnostic and treatment guidelines and case definitions were used. At the time of the study, in Malawi, antiretroviral therapy (ART) was rarely used, and trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis was not recommended.

Cases of suspected PcP were identified by patients' clinical signs and symptoms, chest x-ray results, oxygen desaturation exercise test results (9), CD4 count, and failure to improve with antimicrobial treatment without activity against *P. jirovecii*. Patients' sputum production was induced by an ultrasonic nebulizer with hypertonic saline, followed by IF staining for *P. jirovecii* cysts. A case was classified as clinical PcP when the IF staining for *P. jirovecii* cysts was positive or the participant had strong clinical evidence of PcP and negative IF. Clinical follow-up data were collected after the episode of suspected PcP.

After the study, real-time PCR for the *P. jirovecii* dihydropteroate synthase and human RNAase P (control DNA) was performed on DNA extracted from the stored induced sputum slides (10). Clinicians were not aware of the PCR results during the study, and laboratory staff performing the PCR was blinded to clinical information and IF results. A final diagnosis of confirmed PcP was made for any episode with a positive IF result, positive PCR result, or both, unless recovery (defined as resolution of respiratory symptoms present at the start of the episode) without PcP treatment was observed with a minimum of 4 weeks of follow-up. If the PCR results were positive but the patient recovered without active treatment against PcP, the result was interpreted as *Pneumocystis* colonization. A negative PCR result ruled out PcP diagnosis in patients who had received PcP treatment on the basis of clinical evidence alone.

Incidence rates of respiratory diagnoses per 100 person-years of follow-up were calculated with 95% confidence intervals (CIs) based on Poisson distribution. First and subsequent episodes in the same person were counted separately, except for PcP, because patients with PcP

*University of Malawi College of Medicine, Blantyre, Malawi;

†University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland,

USA; ‡University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina,

USA; and §Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA

¹Data from this study were presented in part at the 9th College of Medicine Research Dissemination Conference, Blantyre, Malawi, 12 Nov 2005 (abstract DCON/05/44), and the XV International AIDS Conference, Bangkok, Thailand, 11–16 Jul 2004 (abstract MoPeB3198).

received secondary prophylaxis and exited the study. The CD4 count at the time of the episode or within the previous 6 months was used for analysis.

We used χ^2 , Mann-Whitney, and Student *t* tests for analysis of age, sex, and CD4 counts among diagnoses, respectively, using SPSS version 12 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). The study was approved by the Institutional Review Boards of the University of Malawi College of Medicine, the University of Maryland, and Michigan State University.

Beginning in September 2002, 660 adults were enrolled in the study and followed up through August 2004. Baseline CD4 and World Health Organization stage data are shown in Table 1. Mean age was 31.7 years (range 16–66); 437 (66%) were female. Mean duration of follow up was 10.7 months (95% CI 10.4–11.5) per person. Eighty-six (13%) participants died, and 37 (6%) were withdrawn from the study because they started lifelong trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis. Sixty-three participants (9.5%) left the area, 20 (3%) withdrew consent, and 119 (17%) were lost to follow up. A smaller proportion of patients from the lower CD4 strata exited the study than from the higher CD4 content group.

Ninety-five episodes of suspected PcP occurred in 75 persons. Outcomes of these episodes are given in Table 2.

Table 1. Baseline characteristics of study participants at enrollment, Malawi, 2002–2004*

Characteristic	No. episodes	PYO
CD4 (cells/mm ³)		
0–99	125	83
100–199	159	145
200–499	271	268
≥500	77	75
Missing at enrollment	28	19
HIV clinical stage†		
I	267	255
II	191	190
III	160	120
IV	42	25
Total	660	591

*PYO, person-years of observation (based on enrollment characteristics).

†As defined by World Health Organization criteria.

A final diagnosis of confirmed PcP was made in 6 episodes, and 9 episodes of *Pneumocystis* colonization were recorded, with a mean follow up of 26 weeks (range 4–48 weeks). Table 3 shows the incidence rates of PcP and other respiratory conditions in the cohort.

With full diagnostic workup including posttreatment follow up as the gold standard for the diagnosis of PcP, the sensitivity of PCR alone was 100%, the specificity 88%, and the positive predictive value 31%. Among episodes in which PcP was suspected, the mean CD4 count in patients

Table 2. Outcomes in 95 episodes of suspected *Pneumocystis* pneumonia (PcP), Malawi, 2002–2004*

Final diagnosis†	Clinical diagnosis‡	No. episodes	IF	PCR	Follow-up data
Confirmed PcP	PcP	2	Pos	Pos	–
Confirmed PcP	PcP	1	Neg	Pos	–
Confirmed PcP	PcP	1	–	–	Death after 2 wk of PcP treatment (IS not done due to respiratory distress)
Confirmed PcP	Bronchiectasis	1	Neg	Pos	Death 1 wk after IS
Confirmed PcP	Tuberculosis	1	Neg	Pos	Improvement but short follow-up (2 wk)
<i>Pneumocystis</i> colonization/ pulmonary KS	Pulmonary KS	3§	Neg	Pos	Death 23 wk after first IS
<i>Pneumocystis</i> colonization/ tuberculosis	Tuberculosis	3	Neg	Pos	Recovery
<i>Pneumocystis</i> colonization/ bacterial pneumonia	Bacterial pneumonia	2	Neg	Pos	Recovery
<i>Pneumocystis</i> colonization/ unspecified respiratory illness	Unspecified respiratory illness	2	Neg	Pos	Recovery
<i>Pneumocystis</i> colonization/ other diagnosis	Other diagnosis¶	1	Neg	Pos	Recovery
Unspecified respiratory illness	PcP	3	Neg	Neg	–
Tuberculosis	Tuberculosis	19	Neg	Neg	–
Bacterial pneumonia	Bacterial pneumonia	10	Neg	Neg	–
Unspecified respiratory illness	Unspecified respiratory illness	20	Neg	Neg	–
Unspecified respiratory illness	Unspecified respiratory illness	1	Neg	NA	Recovery (18 wk follow-up)
Other diagnoses¶	Other diagnoses¶	24	Neg	Neg	–
Other diagnosis¶	Other diagnosis¶	1	Neg	NA	Recovery (>1 y follow-up)

*IF, immunofluorescence stain; Pos, positive; Neg, negative; IS, induced sputum procedure; KS, Kaposi sarcoma; NA, not available.

†Diagnosis based on clinical evidence, IF, and PCR from an IS sample, and follow-up after episode.

‡Diagnosis based on clinical evidence and IF from an IS sample.

§Three episodes occurring in 1 person.

¶Among other diagnoses were sepsis, bronchitis, emphysema, pulmonary KS, and bronchiectasis.

Table 3. Incidence of *Pneumocystis pneumonia* (PcP) and other respiratory illnesses, Malawi, 2002–2004*

Diagnosis	All CD4 counts		CD4 0–99/mm ³		CD4 100–199/mm ³	
	No. events	Incidence, % (95% CI)	No. events	Incidence, % (95% CI)	No. events	Incidence, % (95% CI)
Confirmed PcP	6	1.0 (0.3–2.2)	5	5.7 (1.9–13.4)	1	0.6 (0.01–3.8)
Bacterial pneumonia†	102	17.3 (14.1–21.0)	35	40.2 (28.0–56.0)	42	28.6 (20.6–38.6)
Pulmonary tuberculosis	51	8.6 (6.4–11.3)	20	23.0 (14.0–35.5)	25	17.0 (11.0–25.1)
Unspecified respiratory illness	127	21.5 (17.9–25.6)	46	52.9 (38.7–70.5)	38	25.9 (18.3–35.5)

*CI, confidence interval.

†Diagnosis based on new consolidations shown on chest x-ray and response to antimicrobial drugs; includes patients with and without positive blood cultures.

with confirmed PcP cases (42.5 cells/mm³, range 1–103) was not significantly lower than in those with *Pneumocystis* colonization (89.1 cells/mm³, range 7–194; $p = 0.28$), but was significantly lower than in those with other diagnoses (97.0 cells/mm³, range 1–311; $p = 0.03$). Mean age and sex distribution of confirmed PcP, *Pneumocystis* colonization, and other diagnoses were not significantly different. The case-fatality rate of confirmed PcP was 50%.

Conclusions

This is the first community-based prospective study of PcP in a developing country. We found an incidence of PcP in Malawian HIV-infected adults of 1.0/100 person-years, similar to the rates observed in studies that used less comprehensive diagnostic approaches in South African miners (0.5/100 person-years) (11) and the placebo arms of trials of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis in Côte d'Ivoire (12,13). The incidence in persons with CD4 counts <200/mm³ (2.5/100 person-years) was clearly lower than in AIDS patients in the United States before the introduction of routine trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis and highly active ART (10/100 person-years [14]). In the lowest CD4 count range (<100/mm³), PcP was common, although the incidence was low compared with that of bacterial pneumonia and pulmonary tuberculosis.

We believe it is unlikely that we missed many PcP cases among other diagnoses or losses to follow-up because of the intensive active and passive follow-up and because our facility provided expeditious, high-quality care free of charge. Allowing for reduced sensitivity of induced sputum compared to BAL (7) and considering cases with diagnostic uncertainty as PcP cases would still leave the PcP incidence low in the HIV-infected population in general.

We found that *Pneumocystis* colonization and confirmed PcP were equally common among patients with suspected PcP. More sensitive molecular detection methods would possibly have detected higher rates of colonization. It remains uncertain why certain HIV-infected persons clear *Pneumocystis* colonization while others develop PcP. The level of immune suppression as indicated by the CD4 count is a possible explanation, although our data do not support this. Genetic differences between

P. jirovecii strains may be relevant (15). Variation in worldwide distribution of strains, as well as differences in host genetics and shorter survival of patients in low CD4 count ranges, are possible causes of the lower PcP incidence in Africa than in developed countries.

The incidence of PcP in HIV-infected Malawian adults, diagnosed clinically and confirmed with molecular analysis, was low compared with the incidence of bacterial pneumonia and pulmonary tuberculosis at all levels of immunosuppression. PcP rarely occurred with CD4 cell counts >100 mm³. Among the most immunocompromised patients, PcP is an important diagnostic consideration.

Dr van Oosterhout is a senior lecturer in the Department of Medicine, University of Malawi College of Medicine, Blantyre, Malawi. His research interests are the clinical aspects of HIV and the treatment of HIV and tuberculosis.

References

- Graham SM. HIV and respiratory infections in children. *Curr Opin Pulm Med*. 2003;9:215–20.
- Fisk DT, Meshnick S, Kazanjian PH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis*. 2003;36:70–8.
- Hargreaves NJ, Kadzokumanja O, Phiri S, Lee CH, Tang X, Salaniponi FM, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients being registered for smear-negative pulmonary tuberculosis in Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2001;95:402–8.
- Aderaye G, Bruchfeld J, Olsson M, Lindquist L. Occurrence of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive patients with suspected pulmonary tuberculosis in Ethiopia. *AIDS*. 2003;17:435–40.
- Chakaya JM, Bii C, Ng'ang'a L, Amukoye E, Ouko T, Muita L, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV/AIDS patients at an urban district hospital in Kenya. *East Afr Med J*. 2003;80:30–5.
- Maskell NA, Waite DJ, Lindley A, Pepperell JC, Wakefield AE, Miller RF, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax*. 2003;58:594–7.
- Cruciani M, Marcati P, Malena M, Bosco O, Serpelloni G, Mengoli C. Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients. *Eur Respir J*. 2002;20:982–9.
- van Oosterhout JJG, Laufer MK, Graham SM, Thumba F, Perez MA, Chimbiya N, et al. A community-based study of the incidence of trimethoprim-sulfamethoxazole-preventable infections in Malawian adults living with HIV. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2005;39:626–31.

9. Smith DE, McLuckie A, Wyatt J, Gazzard B. Severe exercise hypoxaemia with normal or near normal X-rays: a feature of *Pneumocystis carinii* infection. *Lancet*. 1988;2:1049–51.
10. Alvarez-Martinez MJ, Miro JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Sole M, et al.; 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. Epub 2006 May 4.
11. Corbett EL, Churchyard GJ, Charalambos S, Samb B, Moloji V, Clayton TC, et al. Morbidity and mortality in South African gold miners: impact of untreated disease due to human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1251–8.
12. Wiktor SZ, Sassin-Morokro M, Grant AD, Abouya L, Karon JM, Maurice C, et al. Efficacy of trimethoprim-sulphamethoxazole prophylaxis to decrease morbidity and mortality in HIV-1-infected patients with tuberculosis in Abidjan, Côte d'Ivoire: a randomised controlled trial. *Lancet*. 1999;353:1469–75.
13. Anglaret X, Chene G, Attia A, Toure S, Lafont S, Combe P, et al. Early chemoprophylaxis with trimethoprim-sulphamethoxazole for HIV-1-infected adults in Abidjan, Côte d'Ivoire: a randomised trial. Cotrimo-CI Study Group. *Lancet*. 1999;353:1463–8.
14. Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML, et al. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. 2000;30:S5–14.
15. Beard CB, Fox MR, Lawrence GG, Guarner J, Hanzlick RL, Huang L, et al. Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS: epidemiological implications. *J Infect Dis*. 2005;192:1815–8. Epub 2005 Oct 13.

Address for correspondence: Christopher V. Plowe, University of Maryland School of Medicine, 685 W Baltimore St, HSF1-480, Baltimore, MD 21201, USA; email: cplowe@medicine.umaryland.edu

Use of trade names is for identification only and does not imply endorsement by the Public Health Service or by the U.S. Department of Health and Human Services.

**EMERGING
INFECTIOUS DISEASES**[®]

April 2006

EID
Online
www.cdc.gov/eid

Search
past issues
EID
Online
www.cdc.gov/eid

Artículo 6.

**Absence of Dihydropteroate Synthase Mutations in *Pneumocystis jirovecii*
from Brazilian AIDS Patients.**

Gustavo Wissmann, **Miriam J. Álvarez-Martínez**, Steven R. Meshnick, Ada R.S. Diehl, and
João C. Prolla

Journal of Eukaryotic Microbiology 53(4) (2006) 305-307.

Artículo 6.**Ausencia de Mutaciones en el Gen de la DHPS de *Pneumocystis jirovecii* en Pacientes Brasileños con SIDA.**

Diferentes estudios realizados en países pobres han documentado la asociación entre el fallo de la profilaxis con TMP-SMX, y la presencia de mutaciones en el gen que codifica la DHPS de *P. jirovecii*.

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de mutaciones en el gen de la DHPS en pacientes con SIDA procedentes de Pôrto Alegre (Brasil), **Figura 12**.

Se incluyó a 70 pacientes diagnosticados de PcP, entre 1997 y 2004, mediante la demostración microscópica de *P. jirovecii* con tinción de Giemsa. La amplificación de DHPS mediante PCR fue posible en 57 de los 70 casos (81.4%). Cinco de los pacientes estaban tomando profilaxis para la PcP con sulfamidas.

No se encontraron mutaciones en el gen de DHPS en ninguno de los pacientes. Los resultados sugieren que la presencia de mutaciones es rara en Brasil, así como se ha demostrado en otros países pobres.



Figura 12. Localización de Pôrto Alegre (Brasil), centro de estudio, artículo 6.

Absence of Dihydropteroate Synthase Mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS Patients

GUSTAVO WISSMANN,^a MÍRIAM J. ALVAREZ-MARTINEZ,^b STEVEN R. MESHNICK,^b

ADA R. S. DIHEL^c and JOÃO C. PROLLA^{a,c}

^aHospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil,

^bDepartment of Epidemiology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA, and

^cCytology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

ABSTRACT. Several studies from developed countries have documented the association between trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis failure and mutations in the *Pneumocystis jirovecii* gene coding for dihydropteroate synthase (DHPS). DNA was extracted from Giemsa-stained smears of 70 patients with *P. jirovecii* pneumonia seen in Porto Alegre, Brazil, from 1997 to 2004. Successful PCR amplification of the DHPS locus was obtained in 57 of 70 cases (81.4%), including five cases (8.7%) that had used sulfa prophylaxis. No DHPS gene mutations were seen. These results suggest that DHPS mutations are currently as rare in Brazil as in other developing countries.

Key Words. AIDS-associated disorders, *Pneumocystis jirovecii*, South America, sulfa prophylaxis.

PNEUMOCYSTIS jirovecii pneumonia is still an important cause of morbidity and mortality in patients with AIDS, despite widespread use of potent anti-retroviral therapy in developed countries (Morris et al. 2004). In developing countries, the occurrence of *Pneumocystis* pneumonia (PCP) in AIDS patients is of increasing concern and attention (Fisk, Meshnick, and Kazanjian 2003). In Brazil, AIDS is a significant public health problem with 362,364 cases reported as of June 2004 with an estimated total of over 600,000 HIV-infected adult individuals at that time (National Program of AIDS/Brazil 2005). A significant decrease in AIDS-related mortality in Brazil has been observed, since the widespread free distribution of highly active anti-retroviral therapy. However, PCP, still frequently seen in AIDS patients, is the second most common pulmonary infection at the moment of AIDS diagnosis; tuberculosis is the first (Marins et al. 2003).

Trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) is the primary agent of choice for prophylaxis of PCP (Kaplan, Masur, and Holmes 2002). Several studies from developed countries, have documented an association between the failure of sulfa prophylaxis and the occurrence of mutations in the *P. jirovecii* gene coding for dihydropteroate synthase (DHPS), especially at codons 55 and 57, both as single mutations or combined. These studies described DHPS mutations in 19%–80% of patients with PCP who had used sulfa prophylaxis (Huang et al. 2004). A low prevalence of DHPS mutations in *P. jirovecii* has been recently related in developing countries such as China (Kazanjian et al. 2004), Zimbabwe (Miller et al. 2003), and South Africa (Robberts et al. 2005; Zar et al. 2004).

The aim of the present study was to determine the prevalence of DHPS gene mutations in bronchoalveolar isolates from AIDS patients hospitalized with PCP in Porto Alegre, Brazil. This is the first study of *P. jirovecii* DHPS genotypes in South America.

MATERIALS AND METHODS

The study was performed on 70 bronchoalveolar lavage (BAL) isolates from patients with AIDS and PCP seen at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil from August 1997 to March 2004 (Fig. 1). These isolates tested positive for the presence of *P. jirovecii* in cytological examination using Giemsa staining and confirmed by the silver Grocott staining method.

Corresponding Author: G. Wissmann, Pneumology Program, Federal University of Rio Grande do Sul, Rua Ramiro Barcelos 2400, 90035-003, Porto Alegre, RS, Brazil—Telephone/FAX number: 55-51-32256831; e-mail: GWISSMANN@uol.com.br

The BAL was carried out routinely on all patients with clinical suspicion of PCP, and the cytological exam was performed using the standard protocol of the cytology unit, following a method described previously (Tregnago et al. 1993).

The patient's data were obtained retrospectively, by review of the hospital charts and records. Sulfa prophylaxis was considered present when TMP-SMX was administered prophylactically at any time in the 3-month period antecedent to the PCP episode. Treatment response was considered: (a) PCP recovery, when the patient had a favorable response in the 21 days following start of therapy, as judged by the clinician in charge; (b) PCP-related death, when it occurred in the 28 days following start of therapy, and so judged by the clinician in charge, or established by autopsy. The treatment was changed owing to adverse effects as judged by the clinician as well.

An additional set of 20 HIV-positive patients who had pulmonary infiltrates in their chest radiographs and negative cytological examination for *P. jirovecii*, were also included in the study, to test the hypothesis that no patient with PCP was excluded from the series.

DNA was extracted from the Giemsa-stained slides by a method described previously (Lee et al. 1994). DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) in a programmable thermal controller (MJ Research, Watertown, MA) using a nested PCR protocol as has been described elsewhere (Zar et al. 2004).

Two different polymerases, the classical recombinant Taq DNA polymerase recombinant (Invitrogen, Carlsbad, CA) and a new generation polymerase, HotStart Taq polymerase (Qiagen, Valencia, CA) were used. The same set of primers but different

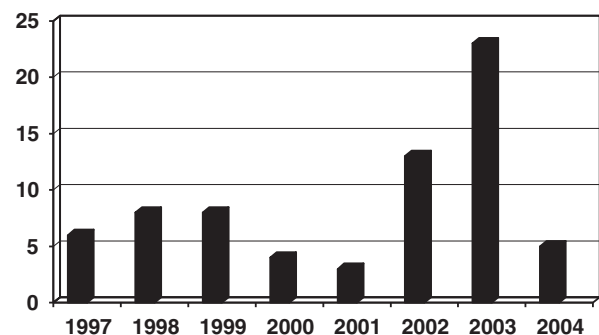


Fig. 1. Annual distribution of *Pneumocystis* pneumonia cases studied from March 1997 to August 2004.

programs in the thermocycler were used with each of the polymerases. In the first round of PCR, the primers F1 (5'-CCT GGT ATT AAA CCA GTT TTG CC-3') and B₄₅ (5'-CAA TTT AAT AAA TTT CTT TCC AAA TAG CAT C-3') were used. For the second round the primers were A_{HUM} (5'-GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AAT C-3') and BN (5'-GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC-3'). The PCR mixtures contained template DNA, primers (0.4 µM each), dNTPs (0.2 mM), MgCl₂ (2 mM) if the primer was Taq DNA polymerase recombinant but none with HotStart Taq, 2.5 U of polymerase, reaction buffer (each polymerase had its own buffer) and water making a total volume of 100 µl.

When recombinant Taq DNA polymerase was used, thermocycler settings for the first round were denaturation at 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 92 °C for 30 s, 52 °C for 30 s, and 72 °C for 60 s, finishing with a termination step at 72 °C for 5 min. Thermocycler settings for the second round were 94 °C for 5 min, followed by 35 cycles of 92 °C for 30 s, 55 °C for 30 s and 72 °C for 60 s, finishing with a termination step at 72 °C for 5 min. The same conditions were employed when HotStart Taq polymerase was used except that the initial denaturation step (for both first and second rounds) was 95 °C for 15 min instead of 94 °C for 5 min.

For analysis of the PCR-generated fragments, 8 µl of each 100 µl PCR amplification product was examined by electrophoresis on 2% agarose gels for a band of 335 bp corresponding to the *P. jirovecii* DHPS gene. The DNA from the agarose gel band was purified with QIAquick gel extraction kit (Qiagen) according to the manufacturer's directions. The PCR fragments were sequenced on an automated DNA sequencer (model ABI 3700, Applied Biosystems, Foster City, CA) using two of the primers described above. Sequenced analyses were performed using Chromas, ClustalX 1.8, and GeneDoc and compared with the consensus sequence for *P. jirovecii* DHPS gene.

RESULTS AND DISCUSSION

The DHPS gene was PCR amplified successfully in samples from 57 of 70 patients (81.4%). These patients were predominantly male (64.9%), with an average age of 37.1 ± 9.5 mean ± SD years (Table 1). The average values of partial pressure of arterial oxygen and serum lactate dehydrogenase at admission were respectively 64.0 ± 11.8 (38.0–96.1) mmHg and 721.5 ± 400.1 (220–1,841) U/l.

Only five patients (8.8%) used TMP-SMX prophylaxis in the preceding 3 months, and nine patients (15.8%) used anti-retroviral therapy. Four patients (7%) had previous episodes of PCP, and

none was exposed to sulfa drugs for treatment of previous toxoplasmosis infection. Twenty-four patients (42.1%) had diagnosed HIV at the moment of PCP.

PCP was treated with TMP-SMX in 55 patients (96.4%). The treatment was switched to alternative agents owing to adverse effects in six patients (leukopenia in three cases, severe rash in two cases and elevation of serum aminotransferase levels in one case).

The adjuvant use of corticosteroids occurred in 75.4% of the patients. Fifty-two patients (91.2%) had a good response to treatment. Deaths because of PCP were registered in five patients (8.8%), but none of these patients was autopsied.

The characteristics of the 13 patients from which clinical samples did not amplify were not significantly different from the data of the 57 patients with positive PCR amplification (Table 1).

No mutations in the DHPS gene were seen in the sequenced amplicons at codons 55 or 57. All had the wild-type genotype with the nucleotide sequence ACA CGG CCT at codons 55, 56, and 57, respectively, corresponding to threonine and proline at positions 55 and 57. All 20 HIV-positive patients who had pulmonary infiltrates in their chest radiographs and negative cytological examination for *P. jirovecii*, were also PCR-negative for the microorganism.

Several studies from developed countries have documented the association between TMP-SMX prophylaxis failure and the increasing prevalence of mutations in the *P. jirovecii* gene coding for DHPS. However, there is a controversy whether DHPS mutations are associated with PCP therapeutic failures (Huang et al. 2004). It is feared the development of resistance to treatment may develop in the future, if new mutations, in addition to the ones described previously, should occur in the *P. jirovecii* genome (Kazanjian et al. 2004). In developed countries, as many as 80% of patients exposed to prophylaxis with sulfonamides have been found to have mutant *P. jirovecii* DHPS genes (Huang et al., 2000). This is in contrast with the situation in developing countries, where the prevalence of mutations is much lower. In South Africa, Zar et al. (2004) reported only four instances of mutant genotypes in a series of 30 pediatric cases, and only one with the double mutation, alanine 55/serine 57. Another South African study reported only one instance of mutant DHPS genotype in 53 samples analysed (Robberts et al. 2005). In China, between 1998 and 2001, only one case of mutation was reported in a series of 15 adult patients with PCP (Kazanjian et al. 2004). In Zimbabwe, only one case of mutation was reported in 2003 from 14 adult patients with PCP (Miller et al. 2003). The low prevalence of DHPS mutations in the developing world may be a result of a less extensive use of sulfa prophylaxis against PCP in these countries.

Table 1. Demographics and clinical characteristics of 70 cases of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia analysed by the polymerase chain reaction at the dihydropteroate synthase locus.

Characteristics	Positive cases	Negative cases
Age, mean years ± SD (range)	37.1 ± 9.6 (23–67)	38.2 ± 11.2 (24–60)
Male sex, no. (%)	37 (64.9%)	9 (69.2%)
Partial pressure of arterial oxygen, mean mmHg ± SD (range)	64.0 ± 11.9 (38.0–96.1)	60.2 ± 9.9 (47.9–76.5)
Lactate dehydrogenase, mean U/l ± SD (range)	721.5 ± 400.1 (220–1,841)	688.1 ± 378.8 (335–1,749)
Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis, no. (%)	5 (8.8%)	1 (7.7%)
Antiretroviral therapy, no. (%)	9 (15.8%)	1 (7.7%)
Previous <i>P. jirovecii</i> pneumonia, no. (%)	4 (7.0%)	1 (7.7%)
Previous toxoplasmosis, no. (%)	0 (0%)	0 (0%)
Diagnosis of HIV at the moment of the <i>P. jirovecii</i> pneumonia	24 (42.1%)	5 (38.5%)
Trimethoprim-sulfamethoxazole treatment, no. (%)	55 (96.5%)	13 (100%)
Treatment changed owing to adverse effects, no. (%)	6 (10.5%)	1 (7.7%)
Adjuvant corticosteroid therapy, no. (%)	43 (75.4%)	9 (69.2%)
Deaths because of <i>P. jirovecii</i> pneumonia, no. (%)	5 (8.8%)	1 (7.7%)

The series of cases in our study shows a low number of patients with prior prophylaxis, including the significant number of patients (42.1%) who had the HIV diagnosed at the moment of PCP.

In conclusion, we observed the absence of mutations in the DHPS gene of *P. jirovecii* in the clinical material from 57 patients seen for PCP episodes in Brazil from 1997 to 2004. These results are similar to the ones reported from other developing countries, showing a low prevalence of mutations in the DHPS gene. As PCP is still an important infection in patients with AIDS in Brazil, and sulfa is the agent of choice for its treatment and prophylaxis, it will be important to monitor the prevalence of DHPS mutations, related to resistance to sulfa in *P. jirovecii*.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was approved by Institutional Review Boards (ethical committees) at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, and the University of North Carolina, Chapel Hill, USA. Gustavo Wissmann was supported by the Pneumology post-graduation funding of the Federal University of Rio Grande do Sul, 2005. Míriam J. Alvarez Martinez was supported by the NIH grant 1 RO AI 46966.

LITERATURE CITED

- Fisk, D., Meshnick, S. & Kazanjian, P. 2003. *Pneumocystis carinii* in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin. Infect. Dis.*, **36**:70–78.
- Huang, L., Beard, C. B., Creasman, J., Levy, D., Duchin, J. S., Lee, S., Pieniazek, N., Carter, J. L., del Rio, C., Rimland, D. & Navin, T. R. 2000. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J. Infect. Dis.*, **182**:1192–1198.
- Huang, L., Crothers, K., Atzori, C., Benfield, T., Miller, R., Rabodonirina, M. & Helweg-Larsen, J. 2004. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**:1721–1728.
- Kaplan, J. E., Masur, H. & Holmes, K. K. 2002. Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons. *MMWR*, **51**(RR-8):4–5.
- Kazanjian, P. H., Fisk, D., Armstrong, W., Shulin, Q., Liwei, H., Ke, Z. & Meshnick, S. R. 2004. Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* pneumonia, in the United States and China. *J. Infect. Dis.*, **189**:1684–1687.
- Lee, C. H., Wang, J., Durkin, M. M., Brady, S. L., Bartlett, M. S. & Smith, J. W. 1994. Amplification of *Pneumocystis carinii* DNA on specimens scraped from slides. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, **18**:197–199.
- Marins, J. R., Jamal, L. F., Chen, S. Y., Barros, M. B., Hudes, E. S., Barbosa, A. A., Chequer, P., Teixeira, P. R. & Hearst, N. 2003. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS*, **17**:1675–1682.
- Miller, R. F., Lindley, A. R., Ambrose, H. E., Mali, A. S. & Wakefield, A. E. 2003. Genotypes of *Pneumocystis jirovecii* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**:3979–3981.
- Morris, A., Lundgren, J. D., Masur, H., Walzer, P. D., Hanson, D. L., Frederick, T., Huang, L., Beard, C. B. & Kaplan, J. E. 2004. Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. *Emerg. Infect. Dis.*, **10**:1713–1720.
- Robberts, F. J., Chalkley, L. J., Weyer, K., Goussard, P. & Liebowitz, L. D. 2005. Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jirovecii* from South Africa. *J. Clin. Microbiol.*, **43**:1443–1444.
- Tregnago, R., Xavier, R. G., Pereira, R. P. & Prolla, J. C. 1993. The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by cytologic evaluation of Papanicolaou- and Leishman-stained bronchoalveolar specimens in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Cytopathology*, **4**:77–84.
- Zar, H. J., Alvarez-Martinez, M. J., Harrison, A. & Meshnick, S. R. 2004. Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin. Infect. Dis.*, **39**:1047–1051.

Received: 11/30/05, 03/23/06; accepted: 03/28/06

VI. DISCUSIÓN

Desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular y genotipado de DHPS de *P. jirovecii*.

(Artículo 1)

El diagnóstico de la PcP, en países desarrollados, se realiza mediante determinación microscópica de *P. jirovecii* en LBA o EI (Mallolas *et al.*, 1990; Procop *et al.*, 2004). En los países pobres, debido a sus limitados recursos, el diagnóstico de la PcP está basado en la sospecha clínica; aunque, en ocasiones también se utiliza el diagnóstico microscópico en EI y aspirado nasofaríngeo (Fisk *et al.*, 2003).

Las técnicas microscópicas, colorimétricas o fluorescentes, son el método estándar de detección de *P. jirovecii*. Entre ellas, la tinción de Giemsa es la más sencilla y barata, además permite la visualización de quistes, trofozoítos y esporozoítos. La tinción de plata metenamina de Gomori está considerada como técnica de referencia, y tiñe específicamente la pared de los quistes, con misma sensibilidad en LBA que en EI (Pinlaor *et al.*, 2004). De todos los métodos microscópicos, la inmunofluorescencia es la más sensible (Kovacs *et al.*, 1988).

Se han desarrollado diversos métodos diagnósticos de *P. jirovecii* basados en la detección de su ADN, mediante PCR, en muestras del tracto respiratorio inferior, así como en muestras no invasivas como los enjuagues orales (Brancart *et al.*, 2005; Fischer *et al.*, 2001; Flori *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2002, 2004; Nyamande *et al.*, 2005; Palladino *et al.*, 2001; Ribes *et al.* 1997; Torres *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque estos métodos presentan una buena sensibilidad, algunos han demostrado una baja especificidad con un elevado porcentaje de falsos positivos (Olsson *et al.*, 2001; Larsen *et al.*, 2002). El significado clínico de una muestra con PCR positiva y microscopía negativa es difícil de interpretar.

Por lo tanto, un método de diagnóstico molecular sensible y específico, basado en la PCR, con una buena concordancia microscópica sería de gran utilidad como alternativa al diagnóstico histológico. De acuerdo con esta premisa, se desarrollaron dos técnicas de PCR, nested-PCR (n-PCR), y PCR a tiempo real (rT-PCR), y se evaluaron la sensibilidad y especificidad de las mismas, para la detección de ADN de *P. jirovecii* procedente de diferentes muestras clínicas.

Los métodos de PCR diseñados, n-PCR y rT-PCR, fueron capaces detectar el ADN de *P. jirovecii* en el 87 % y 88% de las muestras, respectivamente. Se incluyeron diferentes muestras clínicas y distintas formas de conservación de las mismas: alícuotas de LBA almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, LBA o EI mezclados con un volumen igual de metanol y conservados a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, laminillas de LBA teñidas con giemsa, plata metenamina de Gomori y Papanicolau, y conservadas a temperatura ambiente. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre el tipo de muestra utilizada, y el método de PCR, para ambos la sensibilidad fue de 94%. Sí que se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la especificidad de los dos métodos; la especificidad de la rT-PCR fue mejor que la de la nested-PCR (96% *versus* 81%).

La rT-PCR mostró un porcentaje de falsos positivos de 4%. Estas muestras presentaron un umbral de detección de positividad (*threshold cycle*, Ct) muy tardío, y una baja concentración de copias de DHPS por microlitro de muestra. Dos de estas 3 muestras dieron un resultado positivo en la n-PCR, que no pudo confirmarse por secuenciación.

La n-PCR presentó un porcentaje de falsos positivos más elevado (19%). El problema de la contaminación podría explicar este resultado, y justificar la menor especificidad de la n-PCR. El que se realicen las amplificaciones en un sistema abierto favorece el arrastre de producto entre las mismas. Para disminuir este inconveniente, se utilizaron precauciones universales, la extracción de ADN y la amplificación se realizaron en espacios diferentes y se usaron puntas con filtro en todo el proceso. En contraste, como la rT-PCR se realiza en un sistema cerrado, donde la manipulación es menor, el riesgo de contaminación queda reducido.

Por otro lado, la rT-PCR tiene otras ventajas, la rapidez y detección dinámica de la amplificación. Los resultados pueden obtenerse en 3 horas, en comparación de las 12 horas necesarias en la n-PCR. El resultado de la PCR tradicional es medido al final de la reacción, mientras que en la rT-PCR el incremento de la fluorescencia del *reporter* es directamente proporcional al número de amplicones generados, por lo tanto, otorga información de la amplificación al mismo tiempo en que se produce, es decir, en tiempo real. Además la rT-PCR ofrece la posibilidad de la cuantificación, que permite conocer la concentración de *P. jirovecii* por microlitro de muestra, lo que sería de utilidad en futuros trabajos para establecer la diferenciación entre el portador asintomático y el enfermo.

Aunque la rT-PCR requiere una inversión inicial elevada en el sistema de amplificación, el coste moderado de los reactivos (30 euros por 96 determinaciones, aproximadamente, 0.30 euros por reacción) permitiría adaptarla al diagnóstico de rutina de los laboratorios.

Los valores de sensibilidad y especificidad obtenidos en este trabajo coinciden con los descritos en estudios previos (tabla 9, artículo 1). Aunque 12 de los 16 trabajos previos presentaron una elevada sensibilidad ($\geq 95\%$), la mitad de ellos tenían una especificidad más baja ($<90\%$). Por lo tanto, usando la rT-PCR, en vez de la n-PCR, para amplificar el mismo gen de *P. jirovecii*, en nuestro estudio, hemos obtenido valores de sensibilidad y especificidad comparables a los mejores valores recogidos en trabajos previos.

El valor predictivo positivo (VPP) es la probabilidad de que una prueba positiva sea verdaderamente positiva. La baja prevalencia de una patología en una población determina un menor VPP. El VPP está influenciado más por la especificidad que por la sensibilidad del test, porque la especificidad determina el número de los resultados falsos positivos (*Auschengrau & Seage, 2003*). La diferencia observada en este estudio entre la especificidad de la n-PCR y la de la rT-PCR tiene una importante influencia en el VPP (figura 3, artículo 1). Si calculamos el VPP según la fórmula, $VPP = \frac{\text{Sensibilidad} * \text{Prevalencia}}{\text{Sensibilidad} * \text{Prevalencia} + (1 - \text{Prevalencia}) * (1 - \text{Especificidad})}$, con una prevalencia de 0.1, por ejemplo, la rT-PCR tiene un VPP casi del doble que el de la n-PCR (0.71 vs. 0.36). Por lo tanto, la detección del gen de la DHPS de *P. jirovecii* mediante rT-PCR sería de mayor fiabilidad que la detección con n-PCR.

Este trabajo presenta algunas limitaciones. Uno de los puntos débiles es el uso de diferentes métodos de diagnóstico microscópico empleados como técnica de referencia en los laboratorios participantes en el estudio. La sensibilidad y especificidad puede ser variable entre las distintas tinciones empleadas. Sin embargo, en la práctica clínica, la PcP es diagnosticada mediante diferentes métodos según laboratorio; por lo tanto, el análisis de los diferentes métodos para generar un estándar, sería el reflejo de la realidad. Una segunda limitación es el método por el que la tinción es seleccionada. Como las muestra teñidas incluidas tenían un elevado número de quistes, la PCR podría ser menos sensible en la práctica clínica.

Además, las muestras teñidas tienden a presentar concentraciones más bajas de *P. jirovecii* que las muestras no teñidas. Esto podría explicarse porque las muestras teñidas eran más antiguas (1995-2003) que las no teñidas (2001-2004), o porque las tinciones, por sí mismas, inhiben la extracción del ADN (Lee et al., 1994).

Como resumen de este primer trabajo podemos decir que, ambos métodos, n-PCR y rT-PCR, detectan DNA de *P. jirovecii* entre el 62.5% y el 100% de las muestras clínicas utilizadas. Sin embargo, el elevado número de falsos positivos asociados a la n-PCR limitan su utilidad. La rT-PCR cuantitativa, con un límite de detección de 1 copia de DHPS por microlitro de muestra, genera menos falsos positivos que los métodos convencionales de PCR. Si a ello añadimos su bajo coste, y la facilidad de su utilización, podemos concluir que la rT-PCR puede ser útil en el diagnóstico clínico de la PcP, y una alternativa a los métodos histológicos.

Mutaciones en el gen de la DHPS en pacientes VIH-positivos en España en la era c-ART: Prevalencia, asociación con la exposición previa a sulfamidas y valor pronóstico en la PcP. Análisis de los factores pronóstico de mortalidad en la PcP.

(Artículo 2)

La morbi-mortalidad de la PcP en pacientes VIH-positivos ha cambiado gracias al uso sistemático de profilaxis con sulfamidas, los corticoides en los episodios agudos, y la c-ART (Huang, 2005). La incidencia de la PcP en España ha disminuido en las últimas dos décadas de 20 casos por cada 100 pacientes expuestos/ año en 1987, cuando las sulfamidas fueron introducidas, a 10 casos por cada 100 pacientes expuestos/ año en 1996, cuando se inició la c-ART. En la actualidad es de 0.1 casos por cada 100 pacientes expuestos/ año (Benito et al., 2001; San-Andrés et al., 2003). No obstante, la PcP es la primera enfermedad definitoria de SIDA en España (Caro-Murillo et al., 2007). A principios de los años 90, la mortalidad debida a PcP era del 28% (Fernández et al., 1995), elevándose al 40% en los pacientes que requerían ingreso en UCI, y al 79% en aquellos que necesitaban ventilación mecánica (Fernández et al., 1995; Alvés et al., 2001).

Los factores que afectan a la mortalidad por PcP en los pacientes VIH-positivos han sido analizados en la literatura. Varios estudios han evaluado la influencia de la c-ART y la profilaxis con sulfamidas en el pronóstico de la PcP. Un estudio mostró que la c-ART mejoraba la supervivencia en los pacientes VIH con PcP (Morris et al., 2003). Mientras que otro manifestó que la mejoría en la supervivencia de los pacientes con PcP severa, era independiente de la c-ART, y reflejaba más la mejoría en el manejo del fallo respiratorio en la UCI, que los avances en el manejo de la PcP por sí mismos (Miller et al., 2006).

Un gran serie de trabajos publicados a lo largo de la geografía mundial han recogido la presencia de las mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* (Tabla 1, artículo 2), sin embargo, el significado de las mismas, en la respuesta al tratamiento, sigue siendo discutido. Las mutaciones, encontradas en el sitio activo de las sulfamidas, se han asociado con el fallo de la profilaxis con sulfamidas (Kazanjian et al., 2000; Beard et al., 2000; Lane et al., 1997; Mei et al., 1998; Ma et al., 1999; Valerio et al., 2007). Aunque tres estudios han demostrado la asociación de las mutaciones con una mala respuesta al tratamiento (Kazanjian et al., 2000; Helweg-Larsen et al., 1999; Valerio et al., 2007), un cuarto trabajo no recogió esta asociación (Navin et al., 2001).

El impacto de las mutaciones en la DHPS de *P. jirovecii*, en el pronóstico de la PcP, no había sido descrito en España. Este segundo artículo describe la primera cohorte española de pacientes VIH-positivos con PcP, procedentes de 12 hospitales de la geografía nacional; documenta la prevalencia de las mutaciones en la DHPS de *P. jirovecii* durante la era de la c-ART; describe las influencia de la mutaciones en el pronóstico y supervivencia, y analiza la mortalidad, e identifica los factores asociados a mal pronóstico.

Se diseñó un estudio multicéntrico para ver si existían diferencias geográficas en la distribución de las mutaciones, como se había descrito en una publicación previa (*Kazanjian et al., 2000*).

Observamos un genotipo mutante en DHPS en el 3.7% de los 188 episodios de PcP incluidos. Este es el porcentaje más bajo de mutaciones en DHPS descrito hasta el momento en EUA y Europa (Tabla 1, artículo 2). Otros países también han recogido un baja incidencia de mutaciones en el gen de la DHPS, como Italia con 8% (*Visconti et al., 2001*), Portugal, China y Zimbabwe con 7% (*Esteves et al., 2008; Kazanjian et al., 2004; Miller et al., 2003*), y Brasil que no encontró mutaciones en sus pacientes VIH-positivos con PcP (*artículo 5, Wissman et al., 2006*). Sin embargo, dos estudios desarrollados en España que incluyeron 15 y 36 pacientes, procedentes de un mismo hospital, mostraron un 73.3%, y un 22.2% de mutaciones, respectivamente (*Montes-Cano et al., 2004; Esteves et al., 2008*). Estos resultados contrastan con los descritos en nuestro estudio y pueden tener varias interpretaciones. La primera, es que los pacientes de los citados estudios, procedían de la misma área, donde quizá una cepa mutante podría estar circulando. En nuestra serie, todos los pacientes que presentaron mutaciones también procedían de la misma área, Cataluña, mientras que los pacientes del resto de España no presentaron mutaciones. La segunda explicación al bajo porcentaje de polimorfismos encontrados, podría ser que en casi el 50% de nuestros pacientes, la PcP fue el debut de la infección por VIH, por lo tanto, no habrían estado expuestos a la presión previa de las sulfamidas.

A pesar de que el número de genotipos mutantes de DHPS es bajo, nuestros datos muestran que los pacientes que presentan mutaciones no tienen peor pronóstico que los pacientes con genotipo salvaje. Ninguno de los pacientes con mutaciones necesitó ingreso en UCI, ni ventilación mecánica, y después de seis meses de seguimiento seguían vivos.

Estos resultados se apoyarían en la teoría, previamente publicada, que sugiere que las mutaciones en el gen de la DHPS conferirían un bajo nivel de resistencia, que podría superar el efecto inhibitorio de las dosis bajas de sulfamidas administradas como profilaxis. Sin embargo, mayores concentraciones de sulfamidas en el pulmón, administradas con fines terapéuticos, sí serían efectivas como tratamiento, en la mayoría de los pacientes con PcP, a pesar de la presencia de mutaciones (*Meshnick et al., 2005*). En nuestra serie todos los pacientes con mutaciones que fueron tratados con TMP-SMX respondieron bien.

Los hallazgos descritos concuerdan con un trabajo previo que mostró que el pronóstico y la mortalidad de los pacientes con PcP dependen más de la severidad inicial de la PcP, que de la presencia de mutaciones (*Crothers et al., 2005*). En nuestro estudio, la existencia de mutaciones no predispuso a mayor mortalidad, ni a peor pronóstico. Los siete pacientes que presentaron genotipos mutantes sobrevivieron al episodio de PcP, y en el seguimiento al sexto mes seguían vivos. Del mismo modo, la severidad inicial de la PcP, determinada por la presencia de una $Pao_2 < 60$ mmHg al ingreso, y la necesidad de ingreso en UCI, fueron los principales factores que influenciaron el pronóstico, y la evolución a exitus de los pacientes.

La alteración de los gases arteriales en los pacientes con ventilación mecánica ha sido el principal factor determinante de la evolución de la PcP, en los últimos veinte años. En dos estudios dirigidos en nuestra población, la necesidad de ventilación mecánica se definió como factor de mal pronóstico (*BES, 2005; Torres et al., 1995*). De acuerdo con esta premisa, se analizaron los factores predisponentes de ingreso en UCI en el primer día del episodio de la PcP, y la $Pao_2 < 60$ mmHg al ingreso apareció como factor de riesgo independiente en el modelo multivariado; mientras que el haber tomado c-ART previamente se mostró como factor protector de ingreso en UCI. Probablemente el efecto protector de la c-ART sea debido a un efecto indirecto, ya que los pacientes en tratamiento con c-ART suelen estar bajo estricta supervisión médica, que determina un diagnóstico más temprano de la PcP, y en definitiva una evolución observada más estrechamente.

En nuestra serie la mortalidad fue del 15%, cifra similar al 13.5% descrito por Walzer (*Walzer et al., 2008*) en un trabajo donde estudió los factores predisponentes de mortalidad en la PcP, entre 1985 y 2006.

Sin embargo, las tasas de mortalidad han ido disminuyendo en España en las dos últimas décadas gracias al uso sistemático de la profilaxis con sulfamidas, los corticoides, y la c-ART (San-Andrés, et al., 2003). La mortalidad de la PcP en un estudio previo, conducido entre 1985 y 1990, fue de 28%, incrementándose al 79% en el caso de los pacientes que requirieron ventilación mecánica (Fernández et al., 1995). Así mismo, en el presente trabajo, la mortalidad de los pacientes que necesitaron ventilación mecánica también se elevó hasta el 80%. Por lo tanto, a pesar de la introducción de la c-ART, el pronóstico de la PcP severa, que requiere VM e ingreso en UCI, sigue siendo ominoso.

Al analizar los factores predictores de mortalidad, la $Pao_2 < 60$ mmHg al ingreso, y la necesidad de ingreso en UCI durante la primera semana, aparecieron como factores independientes de mortalidad en el análisis multivariado. De ello se deduce, que el fallo respiratorio severo al ingreso es el principal factor determinante del pronóstico de la PcP. La hipoxemia al ingreso aparece asociada a mortalidad por sí misma, y por determinar admisión en UCI. Aunque sólo el 20% de nuestros pacientes ingresaron en UCI, el 80% de ellos murió, probablemente debido a la severidad del episodio. En un trabajo previo (Bedos et al., 1999), se identificó la necesidad de ventilación asociado a mayor mortalidad. En nuestra serie, aunque la mortalidad intrahospitalaria ha disminuido, se incrementa hasta cinco veces (15% vs. 80%) cuando los pacientes requieren ventilación mecánica.

Respecto a los factores protectores de mortalidad, el análisis univariado determinó que haber recibido c-ART previamente, y la profilaxis previa frente a PcP, eran factores protectores de ingreso en UCI, por lo tanto, indirectamente eran factores protectores de mortalidad, ya que el ingreso en UCI se asoció a mortalidad. Este resultado coincide con lo anteriormente publicado por Morris (Morris et al., 2003) que apunta, que el único factor asociado con descenso de la mortalidad en la PcP es la c-ART; y con lo descrito por Curtis, (Curtis et al., 2000), que concluye que los pacientes que han recibido c-ART, y profilaxis frente a PcP antes del ingreso, tienen menos riesgo de necesitar ventilación mecánica.

Este trabajo tiene varias limitaciones. La primera, es que la validez del análisis multivariado está comprometida por la ausencia de información, en algunos pacientes, sobre determinadas variables (disminución de la albúmina sérica, el aumento de la LDH y el incremento del gradiente alveolo-arterial de oxígeno), conocidas como factores de riesgo de ingreso en UCI. Estos datos no están disponibles en algunos pacientes, porque no todos los hospitales determinan estas variables al ingreso. Por ello, realizamos un segundo análisis multivariado que incluyó sólo a los 123 pacientes, de los que sí disponíamos de todas las variables. La $Pao_2 < 60$ mmHg al ingreso, la disminución de la albúmina sérica, y la edad, aparecieron como factores independientes de mortalidad. Una segunda limitación del estudio es que la capacidad de demostrar la asociación entre la presencia de mutaciones en el gen de la DHPS, y el mal pronóstico de la PcP, está restringida por el bajo porcentaje de pacientes que presentaron mutaciones en nuestra serie. Además, la baja prevalencia de mutaciones también podría explicarse por razones técnicas, las mutaciones en la DHPS fueron determinadas sólo por secuenciación, no se realizó subclonación, como definen otros estudios.

Por lo tanto, como resumen, este trabajo ha demostrado que la incidencia de las mutaciones en el gen de la DHPS en España es baja, y que además no están asociadas a mayor mortalidad, ni a peor pronóstico. Aunque la mortalidad por PcP ha descendido en los últimos años, permanece elevada en los pacientes que requieren ventilación mecánica, a pesar del efecto protector de la c-ART y los corticoides. La severidad inicial de la PcP, determinada por una $Pao_2 < 60$ mmHg al ingreso, y la necesidad de ingreso en UCI durante la primera semana, es el principal indicador de mal pronóstico de los pacientes con PcP.

Análisis de la influencia de la introducción de la c-ART en la prevalencia de las mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* en pacientes VIH-positivos en España.

(Artículo 3)

Este estudio fue desarrollado para determinar si la prevalencia de las mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* había cambiado tras la introducción de la c-ART, y si las mutaciones estaban asociadas a un peor pronóstico, en los pacientes españoles infectados por VIH y con PcP.

La introducción de la c-ART en 1996 cambió la incidencia y manejo de las infecciones oportunistas asociadas al SIDA. La incidencia de PcP en nuestro país ha descendido de 10 casos por cada 100 pacientes expuestos por año en 1996, a 0.1 casos por cada 100 pacientes expuestos por año en la actualidad (*Benito et al., 2001; San-Andrés et al., 2003*). Sin embargo, la PcP es la primera enfermedad definitoria de SIDA en España (*Caro-Murillo et al., 2007*).

Este trabajo describe la prevalencia de las mutaciones en el gen de la DHPS en 167 pacientes VIH-1 diagnosticados en el Hospital Clínic de Barcelona, durante el periodo pre-cART (1989-1995), y el periodo c-ART (2001-2004), y analiza el pronóstico de la PcP en estos pacientes.

Se encontraron diferencias epidemiológicas entre los dos grupos de pacientes (Tabla 1, artículo 3). Los 110 pacientes que pertenecían a grupo pre-cART eran más jóvenes, usuarios de drogas, homosexuales, habían tenido episodios previos de PcP, tomado más profilaxis con sulfamidas y terapia antirretroviral. En contraste, los pacientes pertenecientes al grupo c-ART tenían como factor de riesgo de VIH el ser heterosexuales, y en casi el 50% de ellos, el episodio de PcP fue el debut de su infección por VIH, por lo tanto, habían estado menos expuestos a la profilaxis con sulfamidas, y a la terapia antirretroviral. Estas diferencias hacen pensar que el perfil de los pacientes con VIH y PcP ha cambiado en nuestra población, y que estos cambios podrían afectar a la evolución de la enfermedad.

Diversas publicaciones han demostrado una asociación entre la profilaxis frente a PcP con sulfamidas y la presencia de mutaciones en el gen de la DHPS (*Lane et al., 1997; Kazanjian et al., 1998 y 2000*). En nuestro estudio, el 33% de los pacientes del grupo pre-cART presentó mutaciones frente al 5% de los pacientes del grupo cART.

Esta diferencia podría explicarse, porque los pacientes de la era pre-cART estaban sometidos a una mayor presión con sulfamidas, en el locus de DHPS, que los pacientes c-ART, ya que tomaban más profilaxis primaria o secundaria (58% vs. 25%). La presión en el grupo c-ART era menor porque casi el 50% de los casos, eran diagnosticados de PcP al mismo tiempo que de VIH, y por tanto, no habían recibido profilaxis primaria.

Estos resultados concuerdan con los expuestos en el trabajo de Miller (*Miller et al., 2003*), que asume que cuando la presión selectiva de las sulfamidas está ausente, se produce un cambio de genotipo mutante a genotipo salvaje. Y por tanto, podría hipotetizarse, que la infección por *Pneumocystis* es debida a una transmisión reciente, ya que si la causa fuera la reactivación de una infección latente, no se observarían cambios en el genotipo de DHPS a lo largo del tiempo.

Los diferentes genotipos de DHPS de la era pre-cART aparecen agrupados por años. La primera mutación de nuestra serie surgió en el año 1992. Todas las mutaciones aparecidas en 1992 y 1995, eran de genotipo 4, las de 1993 de genotipo 3 y 4, y las de 1994 de genotipo 2. Esta distribución de genotipos por año podría apoyar la teoría de la transmisión persona a persona de cepas mutadas (*Figura 1, artículo 3*).

Es remarcable, que el 90% de los genotipos 4 pertenecieran a pacientes del grupo pre-cART, y en el 78% de ellos existiera una exposición previa sulfamidas. Se ha descrito (*Miller et al., 2003*) que el genotipo 4 aparece específicamente asociado a la profilaxis previa con dapsona. En nuestra serie, el 67% de los pacientes con genotipo 4 habían tomado profilaxis con dapsona-pirimetamina.

Trabajos previos han expuesto la controversia del papel que juegan las mutaciones en DHPS en la respuesta al tratamiento y pronóstico de la PcP; mientras que 3 estudios asociaron las mutaciones a peor pronóstico (*Kazanjan et al., 2000; Helweg-Larsen et al., 1999; Valerio et al., 2007*), un cuarto no demostró la asociación (*Navin et al., 2001*). En nuestra serie, la presencia de mutaciones no empeoró el pronóstico de la PcP. Aproximadamente el 95% de los pacientes fueron tratados con TMP-SMX, y la respuesta al tratamiento fue buena en la mayoría de los casos. Los pacientes con mutaciones presentaron una mortalidad intrahospitalaria, al tercer, y sexto mes, similar a la de los pacientes con genotipo salvaje. No hubo recaídas al tercer ni al sexto mes, entre los pacientes con mutaciones.

Este estudio tiene ciertas limitaciones, la primera es que no se determinó la prevalencia de las mutaciones entre los años 1996 y 2000, lo que podría haber dado información adicional de este periodo de cambio entre la era pre y c-ART. Otra limitación, técnica, es que del periodo pre-cART sólo se dispuso de muestras conservadas en portaobjetos, y no de LBA total, lo que quizá redujo el número de muestras en las que se consiguió la amplificación.

Con este trabajo hemos demostrado que la prevalencia de las mutaciones en el gen de la DHPS es baja en el periodo c-ART, pero que era más alta en el periodo pre-cART, cuando los pacientes estaban sometidos a un mayor presión con sulfamidas. Sin embargo, la presencia de mutaciones no empeora en pronóstico de la PcP, ya que parece ser, que las mutaciones sólo confieren un bajo nivel de resistencia a las dosis bajas de sulfamidas administradas como profilaxis, pero a altas dosis, con fines terapéuticos, el tratamiento con TMP-SMX es efectivo en la mayoría de los casos.

Prevalencia de las mutaciones en el gen de la DHPS y evolución de la PcP en niños sudafricanos VIH-positivos.

(Artículo 4)

La hospitalización y muerte por PcP, en niños africanos infectados por VIH, se ha incrementado en los últimos años (*Fisk et al., 2003*). Varios estudios *postmortem* detectaron PcP entre el 16 y 51% de los niños africanos con VIH que murieron por patología respiratoria (*Lucas et al., 1996; Vetter et al., 1996; Chintu et al., 2002*). Estudios prospectivos han confirmado que *P. jirovecii* es una importante causa de neumonía severa en niños con VIH. Un trabajo realizado en Sudáfrica (*Zar et al., 2000*) determinó que la PcP era la enfermedad definitoria de SIDA en el 20% de los niños infectados por VIH, y que la mortalidad entre ellos era mucho mayor (48%) que entre los que no tenían PcP (18%).

El uso de profilaxis con TMP-SMX, en niños, no está ampliamente establecido en los países africanos por la dificultad de diagnosticar el VIH en el periodo neonatal, la falta de recursos para implementar su utilización, y el temor a generar resistencias. A pesar de que el 50% de la población vive por debajo del umbral de la pobreza en Sudáfrica, el TMP-SMX está disponible, es asequible, y efectivo para prevenir la PcP, como se ha demostrado en los estudios previos que comparaban la incidencia de PcP, antes y después de su introducción (*Duong et al., 1999; Chokeyhaibulkit et al., 1999; Rigaud et al., 1994; Thea et al., 1996*). El uso de TMP-SMX también se ha asociado a una disminución de la mortalidad entre los niños africanos, VIH-positivos, hospitalizados por neumonía (*Madhi et al., 2002*).

Las recomendaciones de la OMS sobre SIDA y VIH proponen la profilaxis con TMP-SMX en todos los niños expuestos a VIH, entre 6 semanas y 15 meses de edad, y en los niños VIH-positivos con manifestaciones clínicas (*WHO, 2001*).

Las mutaciones en el gen de la DHPS se han asociado, en los países desarrollados, al amplio uso profiláctico del TMP-SMX (*Nahimana et al., 2003; Huang et al., 2000; Kazanjian et al., 1998 y 2000*). Sin embargo, hasta la publicación de este trabajo se desconocía su prevalencia en los países africanos. Con el aumento de la profilaxis con TMP-SMX en estos países, y el hecho de que la mayoría de pacientes VIH-positivos en África residen en la zona subsahariana, se hacía necesario determinar la prevalencia de mutaciones en esta zona. Para ello se diseñó este estudio, con el objetivo de conocer la prevalencia de mutaciones en el gen de la DHPS en niños VIH-positivos con PcP de Ciudad del Cabo (Sudáfrica).

De los 30 niños incluidos en este estudio 13.3% presentaron mutaciones en DHPS. La prevalencia es mucho menor que la publicada por países desarrollados como EUA, que está entre el 43% y 68% (*Nahimana et al., 2003; Huang et al., 2000; Kazanjian et al., 1998 y 2000*), pero superior al 3.7% descrito en nuestro país en la era c-ART (artículo 2). La explicación más probable es que los niños africanos estaban poco expuestos a la profilaxis con sulfamidas, o al uso del TMP-SMX por cualquier otra causa, debido a la elevada cifra de resistencias. La mayoría de los niños africanos están mucho más expuestos a betalactámicos que a sulfamidas, para tratar cuadros como neumonía, otitis u otra infección bacteriana (*South African Dept. Health, 2001*). Aunque los polimorfismos en DHPS se han asociado a una mayor exposición a sulfamidas, en este trabajo, las mutaciones aparecieron en niños que previamente no habían recibido profilaxis con sulfamidas. Este hecho hace resurgir de nuevo la discusión sobre la forma de transmisión de la PcP. Así, parece que podría existir una transmisión madre-hijo de las cepas mutantes (*Miller et al., 2002*). No obstante, en este estudio no se ha podido comprobar la hipótesis al no disponer de muestras, ni información clínica de las madres, o de los contactos cercanos de estos niños.

La mortalidad de la serie fue muy elevada, 66.7% (20/30), a pesar de la vigilancia estrecha en la UCI, la administración de corticoides y terapia antipneumocystis. Las cifras son similares a las publicadas por otros países pobres (*Zar et al., 2000; Graham et al., 2000; Ruffini et al., 2002*). No hubo diferencias entre la mortalidad de los niños que presentaron mutaciones, y la de los que portaban un genotipo salvaje. Por lo tanto, como ya se ha discutido previamente, parece que las mutaciones sólo confieren un bajo nivel de resistencia a la profilaxis, y que la evolución final del paciente está marcada por la gravedad inicial de la PcP.

La elevada mortalidad del cuadro, y su emergencia en África, hacen que el diagnóstico de la PcP, y el uso de la profilaxis con TMP-SMX, se deban considerar una actuación prioritaria. La situación actual hace prever que la prevalencia de las mutaciones aumente, consecuencia de la mayor exposición a las sulfamidas, y la transmisión persona-persona de cepas mutantes. Con este trabajo se ha demostrado que la prevalencia de mutaciones en el gen de la DHPS es baja en niños sudafricanos, y que aunque la mortalidad de la serie es muy elevada, no se ha asociado a la presencia de mutaciones. Sin embargo este hecho puede variar con el incremento del uso de sulfamidas en los países africanos.

Epidemiología de la PcP en pacientes adultos infectados por el VIH en Malawi.

(Artículo 5).

La incidencia de la PcP en pacientes adultos VIH-positivos en África Subsahariana es incierta. Aunque la PcP en niños africanos menores de 1 año es frecuente, y está bien documentada (*Graham, 2003*), los datos de incidencia y prevalencia publicados en pacientes adultos africanos son muy variables (*Fisk et al., 2003*). Muchos de estos estudios están realizados en poblaciones seleccionadas de hospitales terciarios (*Hargreaves et al., 2001; Aderaye et al., 2003; Chakaya et al., 2003*), por lo tanto podrían incluir un sesgo a favor de mayores cifras de diagnóstico de PcP.

Hasta el momento, no se había realizado ningún estudio prospectivo africano, que incluyera una larga serie de pacientes, donde el diagnóstico de la PcP se realizara en LBA mediante inmunofluorescencia. Trabajos previamente publicados, en los que se utilizó la rT-PCR en esputo, han mostrado una elevada sensibilidad, pero baja especificidad (*Maskell et al., 2003; Cruciani et al., 2002*). En los pocos estudios realizados en pacientes africanos, la PCR ha sido incapaz de distinguir la colonización subclínica de la infección, limitados por la imposibilidad de hacer el seguimiento de los pacientes post-diagnóstico (*Hargreaves et al., 2001; Aderaye et al., 2003*).

Este trabajo describe la incidencia de la PcP en una larga serie de 660 pacientes adultos VIH-positivos en Malawi, entre 2002 y 2004, utilizando un exhaustivo abordaje diagnóstico que incluyó, el esputo inducido teñido con inmunofluorescencia, la rT-PCR, y el seguimiento de la evolución tras diagnóstico y tratamiento. Se encontró una incidencia de 1.0/100 personas-año, datos similares a los descritos en estudios previos (*Corbett et al., 2002*). La incidencia de pacientes con cifras de linfocitos CD4 $<200/\text{mm}^3$ (2.5/100 personas-año) fue claramente más baja que en pacientes con SIDA procedentes de EUA, antes de la introducción de la profilaxis con TMP-SMX y la c-ART (10/100 personas-año) (*Kaplan et al., 2000*). En los pacientes con cifras de CD4 más bajas ($<100/\text{mm}^3$), la incidencia de PcP era alta, aunque menor que la de la tuberculosis pulmonar y otras neumonías bacterianas.

La presencia de colonización por *Pneumocystis*, y la PcP confirmada, fueron igualmente frecuentes en los pacientes con sospecha de PcP. De todos modos, serían necesarios métodos de diagnóstico molecular más sensibles para establecer un umbral de detección de *P. jirovecii* que diferenciara entre el estado de portador asintomático y el de enfermo.

Todavía queda sin resolver porqué determinados pacientes infectados por VIH son capaces de controlar la colonización por *Pneumocystis*, y otros, sin embargo, acaban desarrollando una PcP. Quizá pueda explicarse por el nivel de inmunosupresión, determinado por la cifra de linfocitos CD4, aunque nuestros datos no aportan suficiente evidencia de ello. Las diferencias genéticas entre las diferentes cepas de *P. jirovecii* podrían tener un papel relevante (*Beard et al., 2005*).

Las variaciones en la distribución mundial de las cepas de *Pneumocystis*, así como las diferencias genéticas del hospedador, y una menor supervivencia en los pacientes con bajo recuento de linfocitos CD4, podrían ser causas de que la incidencia de la PcP en África sea menor que en los países desarrollados.

Con todo ello, este trabajo ha demostrado que la incidencia de la PcP en pacientes adultos VIH-positivos, en Malawi, donde el 65.3% de la población vive por debajo del umbral de la pobreza, es menor que la de la tuberculosis pulmonar, y otras neumonías bacterianas, a igual nivel de inmunosupresión. La PcP raramente ocurre en pacientes con recuento de linfocitos $CD4 > 100 \text{ mm}^3$. Sin embargo, entre los pacientes más inmunodeprimidos, es importante considerar el diagnóstico de PcP.

Ausencia de mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* en pacientes brasileños con SIDA.

(Artículo 6)

En los países pobres la aparición de PcP en pacientes con SIDA es un fenómeno creciente que requiere especial atención (*Fisk et al., 2003*). En Brasil, con el 36.3% de población viviendo por debajo del umbral de la pobreza, el SIDA se ha convertido en un importante problema de salud pública, con una incidencia de 362.364 casos, en junio de 2004, y un número total de 600.000 afectados en 2005 según el Programa Nacional de SIDA de Brasil. La c-ART ha disminuido la mortalidad de los pacientes afectados de VIH. Pero entre ellos, la PcP sigue siendo la principal enfermedad definitoria de SIDA, después de la tuberculosis (*Marins et al., 2003*).

Existen pocos trabajos sobre la prevalencia de las mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* en los países pobres. En China (*Kazanjian et al., 2004*), Zimbabwe (*Miller et al., 2003*), y Sudáfrica (*artículo 4; Robberts et al., 2005*) se ha descrito que es baja.

El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de mutaciones en el gen de DHPS de *P. jirovecii* en pacientes VIH-positivos con PcP, en Porto Alegre (Brasil). Hasta el momento no había descripciones de la situación en los países de Sudamérica.

El estudio incluyó 70 pacientes VIH-positivos diagnosticados de PcP entre 1997 y 2004. En ninguno de los pacientes se detectó un genotipo mutado de DHPS. Brasil es el primer país donde se ha comunicado la ausencia de mutaciones. Los resultados obtenidos, junto con los ya publicados de otros países pobres, como China, Zimbabwe, y Sudáfrica, hacen pensar que la baja prevalencia es debida a que el uso de la profilaxis con sulfamidas frente a PcP es menor que en los países desarrollados. En esta serie de pacientes, tan sólo el 8.8% recibían profilaxis frente a PcP, aunque casi la mitad de ellos conocían su estado de VIH-positivos, en el momento del diagnóstico de la PcP. A pesar de estos resultados, aparentemente favorables, como la PcP es una de las principales infecciones oportunistas en los pacientes con SIDA, y el TMP-SMX, el fármaco de elección para la profilaxis, es probable, que la prevalencia de las mutaciones aumente en los países sudamericanos con el paso del tiempo, y que sea necesario seguir observando la evolución de una manera estrecha, tal y como se recomienda en los países africanos.

VII. CONCLUSIONES

Conclusiones respecto al objetivo 1.

1. Se desarrollaron dos técnicas de PCR, una nested-PCR y una PCR cuantitativa a tiempo real, para el diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii*, mediante la detección del gen de la DHPS. Dichas técnicas presentaron una sensibilidad que osciló entre el 62.5% y el 100%, dependiendo del tipo de muestra clínica, y su método de conservación.
2. En un subgrupo de 71 muestras positivas para *P. jirovecii*, confirmadas microscópicamente, y 70 muestras negativas, los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 94% y 81%, para la nested-PCR, y de 94% y 96%, para la rT-PCR.
3. La rT-PCR cuantitativa, con un límite de detección de 1 copia de DHPS / μ l de muestra, presentó una especificidad significativamente mejor, que la nested-PCR. Por lo tanto, podría considerarse la técnica recomendada para el diagnóstico de *Pneumocystis jirovecii*.

Conclusiones respecto al objetivo 2.

4. La prevalencia de mutaciones en el gen de la DHPS de *Pneumocystis jirovecii* en España, en la era c-ART, fue del 3.7%, siendo la prevalencia más baja descrita hasta el momento en EUA y Europa.
5. Aproximadamente el 50% de los pacientes de nuestra serie de la era c-ART presentó una PcP, como debut de la infección por VIH. Por lo tanto, no habían estado previamente expuestos a profilaxis con sulfamidas. Este hecho explicaría la baja prevalencia de mutaciones en el periodo c-ART en nuestro país.

6. La mortalidad global de la serie de pacientes en la era c-ART fue de 15%, elevándose a 80% en los pacientes que requirieron ventilación mecánica.
7. Ninguno de los pacientes que presentó mutaciones en el gen de DHPS requirió ingreso en UCI, ni murió. Por lo tanto, podemos concluir que su presencia no se asocia a un peor pronóstico en la PcP.
8. Las mutaciones en el gen de DHPS sólo confieren un bajo nivel de resistencia a las dosis de sulfamidas administradas como profilaxis, pero a mayores dosis de sulfamidas, administradas con fines terapéuticos, el tratamiento con TMP-SMX fue efectivo en la mayoría de los casos.
9. Presentar una $Pao_2 < 60$ mmHg al ingreso se identificó como un factor de riesgo de ingreso en UCI, mientras que haber tomado c-ART previamente, se mostró como un factor protector.
10. Presentar una $Pao_2 < 60$ mmHg al ingreso, o la necesidad de ingreso en UCI durante la primera semana de hospitalización, se asociaron a una mayor mortalidad. La severidad de la insuficiencia respiratoria al ingreso determinó el pronóstico de la PcP.

Conclusiones respecto al objetivo 3.

11. Las mutaciones en el gen de la DHPS fueron más frecuentes en el periodo pre-cART (1989-1995), que en el periodo c-ART (2001-2004), siendo del 33% vs 5.5%, respectivamente. La exposición previa a las sulfamidas en los pacientes en el periodo pre-cART fue del 51% frente al 20% en el periodo c-ART, lo que explicaría la mayor prevalencia de mutaciones. Sin embargo, su presencia tampoco empeoró el pronóstico de la PcP.

Conclusiones respecto al objetivo 4.

13. Las mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jirovecii* fueron infrecuentes en niños sudafricanos infectados por el VIH (prevalencia de 13.3%), siendo probablemente debido a una transmisión madre-hijo de cepas mutantes, más que a una sobreexposición a sulfamidas. Aunque la mortalidad por PcP fue elevada en Sudáfrica (66.7%), no se incrementó por la presencia de mutaciones.

14. La incidencia de PcP en adultos infectados por el VIH en Malawi fue de 1.0/ 100 personas-año, siendo menor que la incidencia de la tuberculosis pulmonar y de la neumonía bacteriana.

15. No se detectaron mutaciones en la serie de 70 pacientes infectados por el VIH con PcP en Brasil, probablemente por una menor exposición a las sulfamidas en dichos pacientes.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

A

- Abernathy-Carver, K.J., Fan, L.L., Boguniewicz, M., et al.** *Legionella* and *Pneumocystis* pneumonias in asthmatic children on high doses of systemic steroids. *Pediatr Pulmonol* **1994**; 18:135-8.
- Abouya, Y.L., Beaumel, A., Lucas, S.B., et al.** *Pneumocystis jirovecii* pneumonia- an uncommon cause of death in African patients with acquired immune deficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* **1992**;145: 617-20.
- Achari, A., Somers, D.O., Champness, J.N., Bryant, P.K., Rosemond, J., & Stammers, D.K.** Crystal structure of the anti-bacterial sulphonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat Struct Biol* **1997**; 4: 490-7
- Aderaye, G., Bruchfeld, J., Olsson, M., & Lindquist, L.** Occurrence of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-positive patients with suspected pulmonary tuberculosis in Ethiopia. *AIDS* **2003**; 17: 435-40.
- Agostini, C., Adami, F., Poulter, L.W., et al.** Role of bronchoalveolar lavage in predicting survival of patients with human immunodeficiency virus infection. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**; 156: 1501-7.
- Allegra, C.J., Kovacs, J.A., Drake, J.C., Swan J.C., Chabner, B.A., & Masur, H.** Activity of antifolates against *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase and identification of a potent new agent. *J Exp Med* **1987**; 165:926-31.
- Alvés, C., Nicolás, J.M., Miró J.M., et al.** Reappraisal of aetiology and prognostic factors of severe acute respiratory failure in HIV patients. *Eur Respir J* **2001**, 17: 87-93.
- Ammich, O.** Über die nichtsyphilitische interstitielle Pneumoniae des ersten Kindersalters. *Virchow Arch Pathol Anat* **1938**; 302:539.
- Anglaret, X., Chene, G., Attia, A., et al.** Early chemoprophylaxis with trimethoprim-sulphamethoxazole for HIV-1-infected adults in Abidjan, Côte d'Ivoire: a randomised trial. Cotrimo-CI Study Group. *Lancet* **1999**; 353: 1463-8.
- Aregao, H.B.** Nota sobre as schizogonias e gametogonias dos trypanosomas. *Braz Med* **1913**; 11:271.
- Armstrong, W., Meshnick, S., & Kazanjian, P.** *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients. *Microbes Infect* **2000**; 2:61-7.

- Aschengrau, A., & Seage, G.R.** Screening in public health practice. *En* Essentials of Epidemiology in Public Health. Eds, A Aschengrau & R Seage III. Sudbury (MA): Jones & Barlett Publishers, **2003**; 412-7.
- Aspinall, T.V., Joyson, D.H., Guy, E., Hyde, J.E., & Sims, P.F.** The molecular basis of sulfonamide resistance in *Toxoplasma gondii* and implications for the clinical management of toxoplasmosis. *J Infect Dis* **2002**; 185: 1637-43.
- Atzori, C., Bruno, A., Chichino, G., et al.** *Pneumocystis jiroveci* pneumonia and tuberculosis in Tanzanian patients infected with HIV. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1993**; 87:55-6.
- B**
- Batungwanayo, J., Taelman, H., Lucas, S.B., et al.** Pulmonary disease associated with HIV in Kigali, Rwanda. *Am J Respir Crit Care Med* **1994**; 149:1591-6.
- Beard, C.B., Carter, J.L., Keely, S.P., et al.** Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* **2000**; 6: 265-72.
- Beard, C.B., Roux, P., Nevez, G., et al.** Strain typing methods for *Pneumocystis jiroveci* and the applications to molecular epidemiologic studies. *Emerg Infect Dis* **2004** Oct;10(10):1713-20.
- Beard, C.B.** Molecular typing and epidemiological insights. *In*: Walzer P., *Pneumocystis pneumonia*, 3^a ed., Marcel and Dekker ed., **2005**, p.479-504.
- Beard, C.B., Fox, M.R., Lawrence, G.G., et al.** Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS : epidemiological implications. *J Infect Dis* **2005**; 192: 1815-8.
- Bedos, J.P., Dumoulin, J.L., Gachot, B., et al.** *Pneumocystis carinii* pneumonia requiring intensive care management: survival and prognosis study in 110 patients with human immunodeficiency virus. *Crit Car Med* **1999**; 27: 1109-15.
- Barber, B.A., Pegram P.S., & High, K.P.** Clindamycin/primaquine as prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Infect Dis* **1996**; 23:718-22.
- Beck, J.M., Newbury, R.L., Palmer, B.E., et al.** Role of lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *J Lab Clin Med* **1996**; 128: 477-87.
- Benito, N., Rañó, A., Moreno A., et al.** Pulmonary infiltrates in HIV-infected patients in the highly active antiretroviral therapy era in Spain. *J Acquir Immune Syndr* **2001**; May 1;27(1): 35-43.

- Benson, C.A., Spear, J., Hines, D., Pottage, J.C., Kessler, H.A., & Trenholme, G.M.** Combined APACHE II score and serum lactate dehydrogenase as predictors of in-hospital mortality caused by first episode *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* **1991**; 144: 319-23.
- BES. Boletín Epidemiológico Semanal** Ministerio de Sanidad y Consumo **2005**; 13 (14): 157-68.
- Berenguer, J., Laguna, F., López-Aldeguer J., et al.** Prevención de las infecciones oportunistas en pacientes adultos y adolescentes infectados por el VIH. Recomendaciones de GESIDA/ Plan Nacional sobre el Sida. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2004**; 22(3): 160-76.
- Blaxhult, A., Kirk, O., Pedersen, C., et al.** Regional differences in presentation of AIDS in Europe. *Epidemiol Infect* **2000**; 125: 143-51.
- Blum, R.N., Miller, L.A., Gaggini, L.C. & Cohn, D.L.** Comparative trial of dapsone versus trimethoprim/sulfamethoxazole for primary prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr.* **1992**; 5:341-7.
- Boldt, M.J., & Bai, T.R.** Utility of lactate dehydrogenase levels in patients receiving aerosolized pentamidine. *Chest* **1997**; 111: 1187-92.
- Brancart, F., Rodríguez-Villalobos, H., Fonteyne, P-A., Pérez-Bota, D., Liesnard, C.** Quantitative Taqman PCR for detection of *Pneumocystis jirovecii*. *J Microb Methods* **2005**; 61: 381-7.
- Brooks, D.R., Wang, P., Read, M., Watkins, W.M., Sims, P.F. & Hyde, J.E.** Sequence variation of the hydroxymethyl-dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroyl synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. *Eur J Biochem* **1994**; 224:397-405.
- Brumfitt, W., & Hamilton-Miller, J.M.** Reassessment of the rationale for the combinations of sulphonamides with diaminopyrimidines. *J Chemother* **1993**; 5: 465-9.
- Brumfitt, W., & Hamilton-Miller, J.M.** Combinations of sulphonamides with diaminopyrimidines: how, when and why? *J Chemother* **1995**; 7: 136-9.
- C**
- Carinii, A.** Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. *Soc De Med et Chir de São Paulo* 16 aou 1910. *Bull Inst Pasteur* **1910** ; IX : 973-8.
- Carne, B., Mboussa, J., Andzin, M., et al.** *Pneumocystis jirovecii* is rare in AIDS Central Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1991**;85:80-5

- Caro-Murillo, A.M., Castilla, J., Pérez-Hoyos, S., et al.** Cohorte RIS de pacientes con infección por VIH sin tratamiento antirretroviral previo (CoRIS): metodología y primeros resultados. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2007**; 25(1): 23-31.
- Centres for Disease Control and Prevention.** Guidelines for prophylaxis against *Pneumocystis pneumonia* for persons infected with human immunodeficiency virus. *MMWR* **1989**; 38(Nº. S-5): 1-9.
- Centres for Disease Control and Prevention.** 2001 USPHS/IDSA Guidelines for the Prevention of Opportunistic Infections in Persons Infected with Human Immunodeficiency Virus. En www.hivatis.org; **2001**; p. 1-65
- Chagas, C.** Nova tripanosomíase humana. *Mem do Instituto Oswaldo Cruz* **1909**; 1: 159-218.
- Chakaya, J.M., Bii, C., Ng'ang'a, L., et al.** *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV/AIDS patients at an urban district hospital in Kenya. *East Afr Med J* **2003**; 80: 30-5.
- Chintu, C., Mudenda, V., Lucas, S., et al.** Lung disease at necropsy in African children dying from respiratory illnesses: a descriptive necropsy study. *Lancet* **2002**; 360: 985-90.
- Chokephaibulkit, K., Wanachiwanawain, F., Chearskul, S., Wanprapa, N., & Unganot, K.** *Pneumocystis carinii* severe pneumonia among human immunodeficiency virus-infected children in Thailand: the effect of primary prophylaxis strategy. *Pediatr Infect Dis J* **1999**; 18: 147-52.
- Cobertt, E.L., Churchyard, G.J., Charalambos, S., et al.** Morbidity and mortality in South African gold miners: impact of untreated disease due to human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* **2002**; 34: 1251-8.
- Colebunders, R., & Quinn, T.** Retroviruses and HIV. In: Warren, K.S., Mahmoud, A.A.F., Eds. *Tropical and Geographical Medicine*, McGraw Hill. **1990**: 728-41.
- Coles, A.C.** Multiplication forms of *Trypanosoma lewisi* in the body of the rat. *Parasitology* **1915**; 8: 184-6.
- Costa, M.C., Helweg-Larsen, J., Lundgren, B., Antunes, F., & Matos, O.** Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portuguese patients with *Pneumocystis pneumonia*. *Int J Antimicrob Agents* **2003**; 22 (5): 516-20
- Crothers, K., Beard, C.B., Turner, J., et al.** Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis pneumonia* containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS* **2005**; 19: 801-5.
- Cruciani, M., Marcati, P., Malena, M., Bosco, O., Serpelloni, G., & Mengoli, C.** Meta-analysis of diagnostic procedures for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients. *Eur Respir J* **2002**; 20: 982-9.

- Curtis, J.R., Yarnold, P.R., Shwart, D.N., Weinstein, R.A., & Bennet, C.L.** Improvements in outcome of acute respiratory failure for patients with human immunodeficiency virus-related *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**; 162: 393-8.
- Cushion, M.** *Pneumocystis carinii*. En: Collier L, Balows A, Sussman M, eds. Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, v.4. New York: Oxford University Press, **1998**:645-683.
- Cushion, M.T.** *Pneumocystis* infection. In: Thompson RCA, Ed. Molecular Epidemiology of Infectious Diseases. New York: Oxford University Press, **2000**:210-28.
- Dei-Cas, E., Aliouat, E.M., & Cailliez, J.C.** In: Walzer P., *Pneumocystis pneumonia*, 3^a ed., Marcel and Dekker ed., **2005**, p.61-94.
- Delanoe, P., & Delanoe, M.** De la rareté de *Pneumocystis carinii* chez les cobayes de la région de Paris. Absence de kyst chez d'autres animaux (lapin, grenouille, 3 anguilles). *Bull Soc Pathol Exot* **1914** ; 7 : 271-2.
- DeLorenzo, L.J., Huang, C.T., Maguire, G.P., & Stone, D.J.** Roentgenographic patterns of *Pneumocystis carinii* pneumonia in 104 patients with AIDS. *Chest* **1987**; 91: 323-7.
- Dohn, M.N., White, M.L., Vigdorth, E.M. et al.** Geographic clustering of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**; 161: 1617-21.
- Duong, T., Ades, A.E., Gibb, D.M., Tookey, P.A., & Masters, J.** Vertical transmission rates for HIV in the British Isles: estimates based on surveillance data. *BMJ* **1999**; 319: 1227-9.
- Dworkin, M.S., Hanson, D.L., & Navin, T.R.** Survival of patients with AIDS after diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. *J Infect Dis* **2001**; 183:1409-12.
- Daly, K.R., Tanka, R., Linke, M.J., et al.** Serologic responses to epitopes of the major surface glycoprotein of *Pneumocystis jirovecii* differ in human immunodeficiency virus-infected and uninfected persons. *J Infect Dis* **2002**; 186: 644-51.
- Daly, K.R., Koch, J., Levin, L., & Walzer, P.D.** Enzyme-linked immunosorbent assay and serologic responses to *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis* **2004**; 10:848-54.
- Dei-Cas, E.** *Pneumocystis* infections: the iceberg?. *Med Mycol* **2000**; 38 (suppl 1): 23-32.

D

E

Edman, J.C., Kovacs, J.A., Masur, H., Santi, D.V., Elwood, H.J., & Sogin, M.L. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* **1998**; 334: 519-22.

Eijking, E.P., van Daal, G.J., Tenbrink, R., et al. Effect of surfactant replacement on *Pneumocystis carinii* pneumonia in rats. *Intensive Care Med* **1991**; 17: 475-8.

El-Sadr, W.M., Luskin-Hawk, R., Yurik, T.M., et al. A randomized trial of daily and thrice-weekly trimethoprim-sulfamethoxazole for the prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected persons. Terry Bein Community Programs for Clinical Research on AIDS (CPCRA). *Clin Infect Dis*, **1999**; 29: 775-83.

Elvin, K.M., Lumbwe, C.M., Luo, N.P., et al. *Pneumocystis jiroveci* is not a cause of pneumonia in HIV-infected patients in Lusaka, Zambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1989**; 83: 553-5.

Elvin, K.M., Bjorkman, A., Heurlin, N., et al. Seroreactivity to *Pneumocystis carinii* in patients with AIDS versus other immunosuppressed patients. *Scand J Infect Dis* **1994**; 26:33-40.

Esteves, F., Montes-Cano, M.A., de la Horra, C., Calderón, E.J., Antunes, F., & Matos, O. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect* **2008** Apr; 14(4):356-62.

F

Fauci, A.S., Macher, A.M., Longo, D.L., et al. Acquired immunodeficiency syndrome : epidemiologic, clinical, immunologic and therapeutic considerations. *Ann Intern Med* **1984**; 100: 92-106.

Fermer, C., & Swendberg, G. Adaptation to sulphonamide resistance in *Neisseria meningitidis* may have required compensatory changes to retain enzyme function: kinetic analysis of dihydropteroate synthases from *N. meningitidis* expressed in a knockout mutant of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **1997**; 179: 831-7.

Fernández, P., Torres, A., Miró J.M., et al. Prognostic factors influencing the outcome in *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *Thorax* **1995**; 50:668-71.

Fischer, S., Gill, V.J., Kovacs, J., et al. The use of oral washes to diagnose *Pneumocystis carinii* pneumonia : a blinded prospective study using polymerase chain reaction-based detection system. *J Infect Dis* **2001**; 184: 1485-8.

- Fischl, M.A., Dickinson, G.M., & La Voile L.** Safety and efficacy of sulfamethoxazole and trimethoprim chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS. *JAMA* **1988**; 259: 1185-9.
- Fisk, D.T., Meshnick, S.R., & Kazanjian, P.** *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* **2003**; 36: 70-8.
- Flori, P., Belleste, B., Durand, F., et al.** Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* **2004**; 53(7): 603-7.
- Frenkel, J.K.** *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr.* **1976** Oct; 43:13-30
- Fry, M., & Pudney, M.** Site of action of the antimalarial hydroxynaphtoquinone, 2-[trans-4-(4'- chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphtoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* **1992**; 43: 1545-53.
- Furrer, H., Egger, M., Opravil, M., et al.** Discontinuation of primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1 infected adults treated with combination antiretroviral therapy. *Swiss HIV Cohort Study. N Engl J Med.* **1999**; 340: 1301-6.
- G**
- Gajdusek, D.C.** *Pneumocystis carinii*-etiologic agents of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. *Paediatrics* **1957**; 9: 543-53.
- Galli, V.B.** Parasitologische Untersuchungen und Beitrage zur parasitologischen Technik. *Zentralbl Bakteriol* **1917**; 79: 41.
- Garay, S.M., & Greene, J.** Prognostic indicators in the initial presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest* **1989**; 95: 1031-3.
- García Vázquez, E., De Górgolas Hernández, M., García Delgado, R., & Fernández Guerrero, M.L.** Suspensión de profilaxis frente a neumonía por *Pneumocystis carinii* en pacientes con tratamiento antirretroviral combinado eficaz. Estudio de 85 casos. *Med Clin (Barc).* **1999**; 340: 1301-6.
- Garvy, B.A., Wiley, J.A., Gigliotti et al.** Protection against *Pneumocystis carinii* pneumonia by antibodies generated from either T helper 1 or T helper 2 response. *Infect Immun* **1997**; 65: 5052-6.
- Garvy, B.A., & Qureshi, M.H.** Delayed inflammatory response to *Pneumocystis carinii* infection in neonatal mice due to inadequate lung environment. *J Immunol* **2000**; 165: 6480-6.

- Gigliotti, F., & Hughes, W.T.** Passive immunoprophylaxis with specific monoclonal antibody confers partial protection against *Pneumocystis carinii* pneumonitis in animal models. *J Clin Invest* **1988**; 81: 1666-8.
- Gigliotti, F., Haidaris, C.G., Wright, T.W., & Harmsen, A.G.** Passive intranasal monoclonal antibody prophylaxis against murine *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun* **2002**; 70:1069-74.
- Godeau, B., Countant-Perronne V., Le Thi Houng, D., et al.** *Pneumocystis carinii* pneumonia in the course of connective tissue disease : report of 34 cases. *J Rheumatol* **1994**; 21: 246-51.
- Gottlieb, M.S., Schroff, R., Schanker, H.M., et al.** *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med* **1981**; 305: 1424-31.
- Graham, B.S., & Tucker, W.S.** Opportunistic infections in endogenous Cushing's syndrome. *Ann Intern Med* **1984**; 101: 334-8.
- Graham, S.M., Mtimila, E.I., Kamanga, H.S., et al.** The clinical presentation and outcome of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in Malawian children. *Lancet* **2000**; 355: 369-73.
- Graham, S.M.** HIV and respiratory infections in children. *Curr Opin Pulm Med* **2003**; 9: 215-20.
- Gutteridge, W.E.** 566C80, an antimalarial hydroxynaphthoquinone with broad spectrum: experimental activity against opportunistic parasitic infections of AIDS patients. *J Protozool* **1991**; 38: 141S-143S.
- ## H
- Hardy, W.D., Feinberg, J., Finkelstein, D.M., et al.** A controlled trial of trimethoprim-sulfamethoxazole or aerosolized pentamidine for secondary prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. AIDS Clinical Trials Group Protocol 021. *N Engl J Med*. **1992**; 327: 1842-8.
- Hargreaves, N.J., Kadzakuanja, O., Phiri, S., et al.** *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients being registered for smear-negative pulmonary tuberculosis in Malawi. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **2001**; 95:402-8.
- Harmsen, A.G., & Stankiewicz, M.** Requirement to CD4+ cells in resistance to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J Exp Med* **1990**; 172: 937-45.
- Harmsen, A.G., Chen, W., & Gigliotti, F.** Active immunity to *Pneumocystis carinii* reinfection in T-cell-depleted mice. *Infect Immun* **1995**; 63: 2391-5.

- Hauser, P.M., Blanc, D.S., Sudre, P., et al.** Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and-negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. *AIDS* **2001**; 15: 461-6.
- Hauser, P.M., Sudre, P., Nahimana, A., & Francioli, P.** Prophylaxis failure is associated with specific *Pneumocystis carinii* genotype. *Clin Infect Dis* **2001(b)**; 33: 1080-2.
- Helweg-Larsen, J., Benfield, T.L., Eugen-Olsen, J., Lundgren, J.D., & Lundgren, B.** Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P.carinii* pneumonia. *Lancet* **1999**; 354: 1347-51.
- Hirschel, B., Lazzarin, A., Chopard, P., et al.** A controlled study of inhaled pentamidine for primary prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *N Engl J Med* **1991**; 324: 1079-83.
- Hong, S.T., Steele, P.E., Cushion, M.T., Walzer, P.D., Stringer, S.L., & Stringer, J.R.** *Pneumocystis carinii* karyotypes. *J Clin Microbiol* **1990**; 28: 1785-95.
- Hsiao, C.H., Huang, S.H., Huang, S.F., et al.** Autopsy findings on patients with AIDS in Taiwan. *Chin J Micro Immunol* **1997**; 30: 145-59.
- Hu, D.J., Fleming, P.L., Castro, K.G., et al.** How important is race/ethnicity as an indicator of risk for specific AIDS-defining condition? *J Acquir Immun Defic Syndr Hum Retrovirol* **1995**; 10: 374-380.
- Huang, L., Stansell, J., Osmond, D., et al.** Performance of algorithm to detect *Pneumocystis carinii* pneumonia in symptomatic HIV-infected persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Chest* **1999**; 115: 1025-32.
- Huang, L., Beard, C. B., Turner, J., & Navin, T.** Association between *Pneumocystis carinii* prophylaxis, *Pneumocystis carinii* molecular genotype, and clinical outcomes (abstract 244). In: Program and abstracts of the 6th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (Chicago). Alexandria, VA: Foundation for Retrovirology and Human Health **1999(b)**: 114.
- Huang, L., Beard, C.B., Creasman, J., et al.** Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis* **2000**; 182: 1192-8.
- Huang, L.** Clinical presentation and diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. In: Walzer P., *Pneumocystis* pneumonia, 3^a ed., Marcel and Dekker ed., **2005**, p.349-406.
- Hughes, W.T., Price, R.A., Kim, H.K., Coburn, T.P., Grigsby, D., & Feldman, S.** *Pneumocystis carinii* pneumonia in children with malignancies. *J Pediatr* **1973**; 82: 404-15.

- Hughes, W.T., Price, R.A., Sisko, F., et al.** Protein-calorie malnutrition. A host determinant for *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Am J Dis Child* **1974**; 128:44-52.
- Hughes, W.T. , McNabb, P.C., Makres, T.D., & Feldman, S.** Efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob Agents Chemother* **1974 (b)**; 5: 289-73.
- Hughes, W.T., Kuhn, S., Chaudhary, S. Feldman, et al.** Successful chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *N Engl J Med* **1977**; 297:1419-26.
- Hughes, W.T.** Natural mode of acquisition for *de novo* infection with *Pneumocystis carinii* infection. *J Infect Dis* **1982**;145:842-8.
- Hughes, W.T., Gray, V.L., Gutteridge, W.E., Latter, V.S., & Putney, M.** Efficacy of hydroxynaphthoquinone 566C80, in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob Agents Chemother* **1990**; 34: 225-8.
- Hughes, W.T.** Prologue to AIDS: the reconognition of infectious opportunists. *Medicine* **1998**; 77: 227-32.
- Hughes, W.T.** Current issues in the epidemiology, transmission, and reactivation of *Pneumocystis carini*. *Semir Respir Infect* **1998 (b)**; 13: 283-8.
- Hughes, W.T.** Pneumocystosis. In: Strickland, G.T., Ed. *Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases*: Philadelphia: Saunders, **2000**:7001-4
- Hughes, W.T.** Historical overview. In: Walzer P., *Pneumocystis pneumonia*, 3^a ed., Marcel and Dekker ed., **2005**, p.1-37.
- Hunter, J.A., & Wakefield A.E.** Genetic divergence at the mitochondrial small subunit ribosomal RNA gene among isolates of *Pneumocystis* from five mammalian host species. *J Eukaryot Microbiol* **1996**; 43: 24S-25S.
- ## I
- Ikeogu, M.O., Wolf, B., & Mathe, S.** Pulmonary manifestations in HIV seropositivity and malnutriron in Zimbabwe. *Arch Dis Child* **1997**; 76:124-8.
- Ittarat, I., Asawamahasakda, W., Bartlett, M.S., Smith, J.W., & Meshnick, S.R.** Effects of atovaquone and other inhibitors on *Pneumocystis carinii* dihydropteroate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother* **1995**; 39: 325-8.
- Ivady, G., Paldy, L., & Unger, G.** Other experiences in the treatment of interstitial plasma cell pneumonia with pentamidine. *Monatsschr Kinderchir* **1963**; 111: 297-9.

Ivady, G., Paldy, L., Koltay, M., et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* **1967**; 1:616-7.

J

Jaffe, H.W., Choi, K., Thomas, P.A., et al. National case-control study of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men: Part 1. Epidemiologic results. *Ann Intern Med* **1983**; 99: 145-51.

Jasmer, R.M., Edinburgh, K.J., Thompson, A., et al. Clinical and radiographic predictors of the etiology of pulmonary nodules in HIV-infected patients. *Chest* **2000**; 117: 1023-30.

Jeena, P.M., Coovadia, H.M., & Chrystal, V. *Pneumocystis* and *cytomegalovirus* infections in severely ill, HIV-infected African infants. *Am of Trop Paed* **1996**; 4: 361-8.

K

Kai, M., Matsuoka, M., Nakata, N., et al. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol Lett* **1999**; 177: 231-5.

Kales, C.P., Murren, J.R., Torres, R.A., & Crocco, J.A. Early predictors of in-hospital mortality for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired

immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* **1987**; 147: 1413-7.

Kamiya, Y., Mtitmila, E.L., Graham, S.M., et al. *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in Malawian children. *Ann Trop Paediatr* **1997**; 17:121-6.

Kandil, O., Fishman, J.A., Koziel, H., et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human macrophages modulates the cytokine response to *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* **1994**; 62: 644-50.

Kaplan, J.E., Hanson, D.L., Navin, T. R., & Jones, J.L. Risk factors for primary *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected adolescents and adults in the United States: Reassessment of indications for chemoprophylaxis. *J Infect Dis*, **1998**; 178: 1126-32.

Kaplan, J.E., Hanson, D., Dworkin, M.S., et al. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* **2000**; 30: S5-14.

Kaplan, J.E., Hanson, D.L., Jones, J.L., & Dworkin, M.S. Viral load as an independent risk factor for opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents. *AIDS* **2001**; 15: 1831-6.

- Kaplan, J.E., Masur, H., & Holmes, K.K.** Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons-2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR* **2002**; 51: 1-52.
- Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, et al.** *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* **1998**; 12: 873-8.
- Kazanjian, P. Armstrong, W., Hossler, P.A., et al.** *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis* **2000**; 182: 551-7.
- Kazanjian, P. Armstrong, W., Hossler, P.A., et al.** *Pneumocystis carinii* cytochrome b mutations are associated with atavaquone exposure in patients with AIDS. *J Infect Dis* **2001**; 183: 819-22.
- Kazanjian, P.H., Fisk, D., Armstrong, W., et al.** Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P carinii* pneumonia, in the United States and China. *J Infect Dis* **2004**; 189: 1684-7.
- Kazanjian, P., Fisk, D.T. & Meshnick S.R.** *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in AIDS patients in the developing world. In: Walzer P., *Pneumocystis pneumonia*, 3^a ed., Marcel and Dekker ed., **2005**, p.435-50
- Keely, S.P., Stringer, J.R., Baughman, R.P., Linke, M.J., Walzer, P.D., & Smulian, A.G.** Genetic variation among *Pneumocystis carinii* hominis isolates in recurrent pneumocystosis. *J Infect Dis* **1995**; 172: 595-8.
- Keely, S.P., Baughman, R.P., Smulian, A.G., Dohn, M.N., & Stringer, J.R.** Source of *Pneumocystis carinii* in recurrent episodes of pneumonia in AIDS patients. *AIDS* **1996**; 10: 881-8.
- Kim H.Y., Hughes, W.T., & Feldman, S.** Studies of morphology and immunofluorescence of *Pneumocystis carinii*. *Proc Soc Exp Biol Med* **1972**; 141: 304.
- Kim, C.K., Foy, J.M., Cushion, M.T., et al.** Comparison of histologic and quantitative techniques in the evaluation of experimental *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob Agents Chemother* **1987**; 31: 197-201.
- Koletar, S.L., Heald, A.E., Finkelstein, D., et al.** A prospective study of discontinuing primary and secondary *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after CD4 cell count increase to > 200 x 10⁶/l. *AIDS*. **2001**; 15: 1509-15.
- Kolls, J.K., Habetz, S., Shean, M.K., et al.** IFN- γ and CD8⁺ T cells restore host defenses against *Pneumocystis carinii* in mice depleted of CD4⁺ T cells. *J Immunol* **1999**; 162: 2890-4.

- Kovacs, J.A., Ng, V.L., Masur, H., et al.** Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* **1988**; 318: 589-93.
- Kovacs, J.A., Gill, V.J., Meshnick, S., & Massur, H.** New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *JAMA* **2001**; 286: 2450-60.
- Koval, C.E., Gigliotti, F., Nevins, D., & Demeter, L.M.** Immune reconstitution syndrome after successful treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in a man with human immunodeficiency virus type 1 infection. *Clin Infect Dis* **2002**; 35: 491-3.
- Koziel, H., Eichbaum, Q., Kruskal, B.A., et al.** Reduced binding and phagocytosis of *Pneumocystis carinii* by alveolar macrophages from persons infected with HIV-1 correlates with mannose receptor downregulation. *J Clin Invest* **1998**; 102: 1332-44.
- Koziel, H., Kim, S., Reardon, C., et al.** Enhanced in vivo human immunodeficiency virus-I replication in the lungs of human immunodeficiency virus-infected persons with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**; 160: 2048-55.
- Kulke, M.H., & Vance, E.A.** *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients receiving chemotherapy for breast cancer. *Clin Infect Dis* **1997**; 25: 215-8.
- L**
- Lane, B.R., Ast, J.C., Hossler, P.A., et al.** Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* **1997**; 175: 482-5.
- Larsen, H.H., Masur, H., Kovacs, J.A., et al.** Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 490-4.
- Larsen, H.H., Huang, L., Kovacs, J.A., et al.** A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. *J Infect Dis* **2004**; 189: 1679-83.
- Latouche, S., Lacube, P., Maury, E., Bolognini, J., Develoux, M., Girard, P.M., Godet, C., Lebrette, M.G., Mayaud, C., Guillot, J., & Roux, P.** *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase genotypes in French patients with pneumocystosis: a 1998-2001 prospective study. *Med Mycol* **2003**; 41: 533-7.
- Laursen, A.L., & Andersen, P.L.** Low levels of IgG antibodies against *Pneumocystis carinii* among HIV-infected patients. *Scand J Infect Dis* **1998**; 30: 495-9.

- Ledergerber, B., Eggar, B., Erard, V., et al.** AIDS-related opportunistic illnesses occurring after initiation of potent antiretroviral therapy. *JAMA* **1999**; 282: 2220-6.
- Ledergerber, B., Mocroft, A., Reiss, P., et al.** Discontinuation of secondary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia patients with HIV infection who have a response to antiretroviral therapy. Eight European Study Groups. *N Engl J Med.* **2001**; 344: 168-74.
- Lee, C.H., Wang, J., Durkin, M., Brady, S., Barlett, M., & Smith, J.** Amplification of *Pneumocystis carinii* DNA on specimens scraped from slides. *Diagn Microb Infect Dis* **1994**; 18: 197-9.
- Lee, C.H., Helweg-Larsen, J., Tang, X., et al.** 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: 734-41.
- Levy, J., Español-Boren, T., Fisher, A., et al.** Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM síndrome. *J Pediatr* **1997**; 131: 47-54.
- Li Pira, G., Fenoglio, D., Bottone, L., et al.** Preservation of clonal heterogeneity of *Pneumocystis carinii*-specific CD4 T cell repertoire in HIV infected, asymptomatic individuals. *Clin Exp Immunol* **2002**; 128: 155-62.
- López, P., Espinosa, M., Greenberg, B. & Lacks, S. A.** Sulfonamide resistance in *Streptococcus pneumoniae*: DNA sequence of the gene encoding dihydropteroate synthase and characterization of the enzyme. *J Bacteriol* **1987**; 169: 4320-6.
- López Bernaldo de Quirós, J.C., Miró, J.M., Peña, J.M., et al.** A randomized trial of the discontinuation of primary and secondary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia after highly active antiretroviral therapy in patients with HIV infection. Grupo de Estudio de SIDA 04/98. *N Engl J Med.* **2001**; 344: 159-67.
- Lyles, R.H., Chu, C., Mellors, J.W., et al.** Prognostic value of plasma HIV RNA in the natural history of *Pneumocystis carinii* pneumonia, cytomegalovirus and *Mycobacterium avium* complex. Multicenter AIDS Cohort Study. *AIDS* **1999**; 13: 341-9.
- Lu, J.J., Barlett, M.S., Shaw, M.M., Smith, J.W., & Lee, C.H.** Typing *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based in nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J Eukaryot Microbiol* **1994**; 41: 102S.
- Lumbiganon, P., Kosalaraksa, P., Loapaiboon, M., et al.** Survival of children with AIDS : experience in a university hospital in northeast Thailand. *J Med Assoc Thai* **2000**; 83: 652-6.

- Lundgren, B., Lundgren, J.D., Nielsen, T., et al.** Antibody responses to a major *Pneumocystis carinii* antigen in human immunodeficiency virus-infected patients with and without *P. carinii* pneumonia. *J Infect Dis* **1992**; 165: 1151-5.
- Lundgren, J.D., Barton, S.E., Lazzarin, A., et al.** Factors associated with the development of *Pneumocystis carinii* pneumonia in 5025 European patients with AIDS. AIDS in Europe Study Group. *Clin Infect Dis* **1995**; 21: 106-13.
- Lucas, S.B., Hounnou, A., Peacock, C., et al.** The mortality and pathology of HIV infection in a West African city. *AIDS* **1993**; 7: 1569-79.
- Lucas, S.B., Peacock, C., Hounnou, A., et al.** Disease in children infected with HIV in Abidjan, Cote d' Ivoire. *BMJ* **1996**; 312: 335-8.
- M**
- Ma, L., Borio, L., Masur, H., & Kovacs, J.A.** *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim- sulfamethoxazole or dapsons use. *J Infect Dis* **1999**; 180:1969-78.
- Ma, L., & Kovacs, J.A.** Genetic analysis of multiple loci suggests that mutations in the *Pneumocystis carinii* f sp *hominis* dihydropteroate synthase gene arose independently in multiple strains. *Antimicrob Agents Chemother* **2001**; 45:3213-5.
- Ma, L., Kovacs, J.A., Cargnel, A., Valerio, A., Fantoni, G., & Atzori, C.** Mutations in the dihydropteroate synthase gene of human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from Italy are infrequent but correlate with prior sulfa prophylaxis *J Infect Dis* **2002**; 185: 1530-2.
- Machiels, G., & Urban, M.I.** *Pneumocystis jiroveci* as a cause of pneumonia in HIV-infected patients in Lusaka, Zambia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1992**;86: 399-400.
- Madhi, S.A., Cutland, C., Ismail, K., et al.** Ineffectiveness of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis and the importance of bacterial and viral coinfections in African children with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Infect Dis* **2002**; 35: 1120-6.
- Mahomed, A.G., Murray, J., Klempman, G.R., et al.** *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in HIV infected patients from South Africa. *East Afr Med J* **1999**; 76: 80-84.
- Malin, A.S., Gwanzura, L.K.Z., Klein, S., et al.** *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in Zimbabwe. *Lancet* **1995**; 346:1258-61.
- Mallolas, J., Valls, M.E., Miró, J.M., et al.** Diagnosis of pneumonia caused by *Pneumocystis carinii* using induced sputum. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **1990**; 8: 511-13.

- Mallolas, J., Zamora, L., Gatell, J.M., et al.** Primary prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia: A randomized trial comparing cotrimoxazole, aerosolized pentamidine and dapsone plus pyrimethamine. *AIDS* **1993**; 7: 59-64.
- Manaloto, C.R., Perrault, J.G., Caringal, L.G., et al.** Natural history of HIV infection in Filipino female commercial sex workers. *J AIDS* **1994**; 7: 1157-68.
- Mansharamani, N.G., Balanchandran, D., Vernofsky, I., et al.** Peripheral blood CD4 lymphocyte counts during *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients without HIV infection. *Chest* **2000**; 118: 712-20.
- Marins, J.R., Jamal, L.F., Chen, S.Y., et al.** Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS* **2003**, 17; 1675-82.
- Maskell, N. A., Waine, D.J., Lindley, A., et al.** Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax* **2003**; 58: 594-7.
- Masur, H., Michelis, M.A., Greene, J.B., Onarato, I., Stouwe, R.A.V., & Cunningham-Rundles, S.** An outbreak of community acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestations of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* **1981**; 305:1431-8.
- Mazars, E., Odberg-Ferragut, C., Durand, I., Tibayrenc, M., Dei-Cas, & E., Camus, D.** Genomic and isoenzymatic markers of *Pneumocystis* from different host species. *J Eukaryot Microbiol* **1994**; 41: 104S.
- Mberu, E.K., Mosobo, M.K., Nzila, A.M., Kokwaro, G.O., Sibley, C.H., & Watkins, W.M.** The changing in vitro susceptibility pattern to pyrimethamine/sulfadoxine in *Plasmodium falciparum* field isolates from Kilifi, Kenya. *Am J Trop Med Hyg* **2000**; 62: 396-401.
- McClellan, M.D., Miller, S.B., Parsons, P.E., & Cohn, D.L.** Pneumothorax with *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS. Incidence and clinical characteristics. *Chest* **1991**; 100: 1224-8.
- McLeod, D.T., Neill, P., Robertson, V.J., et al.** Pulmonary diseases in patients infected with the human immunodeficiency virus in Zimbabwe, Central Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **1989**; 83: 694-7.
- Mei, Q., Gurunathan, S., Masur, H., & Kovacs, J. A.** Failure of cotrimoxazole in *Pneumocystis carinii* infection and mutations in dihydropteroate synthase gen. *Lancet* **1998**; 351: 1631-2.
- Mellors, J.M., Rinaldo, C.R., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., & Kingsley, L.A.** Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science* **1996**; 212: 1167-70.

- Mellors, J.M., Muñoz, A., Giorgi, J.V., et al.** Plasma viral load and CD4+ lymphocytes as prognostic markers of HIV-1 infection. *Ann Intern Med* **1997**; 126: 946-54.
- Meshnick, S.R.** Drug-resistance *Pneumocystis carinii*. *Lancet* **1999**; 354: 1318-9.
- Meshnick, S.R., Hossler, P.A., Enger, K.S., et al.** Distribution of DHPS mutations among ITS subtypes of *P. carinii* f sp *hominis*. *J Eukaryot Microbiol* **2001**; 126s-128s.
- Meshnick, S.R., & Kazanjian, P.** Dihydropteroate synthase and cytochrome B: the problem of emerging resistance. *In*: Walzer P., *Pneumocystis pneumonia*, 3^a ed., Marcel and Dekker ed., **2005**, p.631-40.
- Metersky, M.L., Colt, H.G., Olson, L.K., & Shanks, T.G.** AIDS- related spontaneous pneumothorax. Risk factors and treatment. *Chest* **1995**; 108: 946-51.
- Meuwissen, J.H., Tauber, I., Leewenberg, A.D., Beckers, P.J. & Sieben, M.** Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J Infect Dis* **1997** Jul; 136(1): 43-9.
- Michalany, J., Mattos, A.L., Michalany, N.S., et al.** Acquired immune deficiency syndrome in Brazil. *Ann Pathol* **1987**; 7: 15-24.
- Miller, R.F., & Wakefield, A.E.** *Pneumocystis carinii* genotypes and severity of pneumonia. *Lancet* **1999**; 353: 2039-40.
- Miller, R.F., Ambrose, H.E., Novelli, V., & Wakefield, A.E.** Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* infection. *J Clin Microbiol* **2002**; 40 (4): 1555-7.
- Miller, R.F., Lindley, A.R., Ambrose, H.E., Malin, A.S., & Wakefield, A.E.** Genotypes of *Pneumocystis jiroveci* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* **2003**; 47: 3979-81.
- Miller, R.F., Allen, E., Copas, A., Singer, M., & Edwards, S.G.** Improved survival for HIV infected patients with severe *Pneumocystis jirovecii* pneumonia is independent of highly active antiretroviral therapy. *Thorax* **2006**, Aug; 61 (8): 716-21.
- Mocroft, A., Katlama, C., Johnson, A.M., et al.** AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study. *Lancet* **2000**; 356: 291-6.
- Mohar, A., Romo, J., Salido, F., et al.** The spectrum of clinical and pathological manifestations of AIDS in a consecutive series of autopsied patients in Mexico. *AIDS* **1992**; 6: 467.
- Montes-Cano, M.A., de la Horra, C., Martín-Juan, J., et al.** *Pneumocystis jiroveci* genotypes in the Spanish population. *Clin Infect Dis* **2004**; 39: 123-8.
- Mootsikapun, P., Chetchotisakd, P., & Intarapoka, B.** Pulmonary infections in HIV-infected patients. *J Med Assoc Thai* **1996**; 79; 477-85.

- Morris, A.M., Swanson, M., Ha, H., & Huang, L.** Geographic distribution of human immunodeficiency virus-associated *Pneumocystis carinii* pneumonia in San Francisco. *Am J Resp Crit Care Med* **2000**; 162: 1622-6.
- Morris, A.M., Huang, L., Bacchetti, P., et al.** Permanent declines in pulmonary function following pneumonia in human immunodeficiency virus-infected persons. The Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* **2000 (b)**; 162: 612-6.
- Morris, A., Beard, C.B., & Huang, L.** Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*. *Microbes Infec* **2002**; 4: 95-103.
- Morris, A., Creasman, J., Turner, J., Luce, J.M., Wachter, R.M. & Huang, L.** Intensive care of human immunodeficiency virus-infected patients with severe *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **2002 (b)**; 166: 262-7.
- Morris A., Wachter, R.M., Luce, J., Turner, J., & Huang, L.** Improved survival with highly active antiretroviral therapy in HIV-infected patients with severe *Pneumocystis carinii* pneumonia. *AIDS* **2003**; 17: 73-80.
- Murphy, M.J., Pifer, L.L., & Hughes, W.T.** *Pneumocystis carinii* in vitro: a study by scanning electron microscopy. *Am J Pathol* **1977**; 86:387-401.
- Mussini, C., Pezzotti, P., Antonori, A., et al.** Discontinuation of secondary prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected patients : A randomized trial by the CIOP Study Group. *Clin Infect Dis.* **2003**; 36: 645-51.
- N**
- Nahimana, A., Rabodonirina, M., Zanetti, G., et al.** Association between a specific *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase mutation and failure of pyrimethamine/sulfadoxine prophylaxis in human immunodeficiency virus-positive and -negative patients. *J Infect Dis* **2003**; 188: 1017-23.
- National Institute of Health-University of California Expert Panel for Corticosteroids as Adjunctive Therapy for *Pneumocystis Pneumonia*.** Consensus statement on the use of corticosteroids as adjunctive therapy for *Pneumocystis pneumonia* in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* **1990**; 323:1500-4.
- Navin, T.R., Beard, C.B., Huang, L., et al.** Effect of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P. carinii* pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study. *Lancet* **2001**; 358: 545-9.

Ng, V.L., Yajko, D.M., & Hadley, W.K. Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev* **1997**; 10: 401-18.

Nicholson, G.L. The interactions of lectins with animal cells. *Int Rev Cytol* **1974**; 39: 89-190.

Nickas, G., & Wachter, R.M. Outcomes of intensive care for patients with human immunodeficiency virus infection. *Arch Intern Med* **2000**; 160: 541-7.

Northfelt, D.W., Clement, M.J., & Safrin, S. Extrapulmonary pneumocystosis: clinical features in human immunodeficiency virus infection. *Medicine (Baltimore)* **1990**; 69: 392-8.

Nyamande, K., Lallo, U.G., York, D., Naidoo, M., Irusen, E.M., & Chetty, R. Low sensitivity of a nested polymerase chain reaction in oropharyngeal washings for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in HIV-infected patients. *Chest* **2005**; 128: 167-71.

O

Oh, M.D., Park, S.W., Kim, H.B., et al. Spectrum of opportunistic infections and malignancies in patients with human immunodeficiency virus infection in South Korea. *Clin Infect Dis* **1999**; 29: 1524-8.

Olsson, M., Stralin, K., & Holmberg, H. Clinical significance of nested polymerase chain reaction and immunofluorescence for detection of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Microb Infect* **2001**; 7: 492-7.

Opravil, M., Marinček, B., Fuchs, W.A. et al. Shortcomings of chest radiography in detecting *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J AIDS* **1994**; 7: 39-45.

P

Palella, F.J., Delaney, K.M., Moorman, A.C. et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* **1998**; 338: 853-60.

Palladino, S., Kay, I., Fonte, R., & Flexman, J. Use of real-time PCR and the lightCycler system for the rapid detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *Diagn Microb Infect Dis* **2001**; 39: 233-6.

Peglow, S.L., Smulian, A.G., Linke, M.J., et al. Serologic responses to *Pneumocystis carinii* antigens in health and disease. *J Infect Dis* **1990**; 161: 296-306.

Phair, J., Muñoz, A., Detels, R., et al. The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* **1990**; 322: 161-5

Pifer L.L., Hughes, W.T., Stagno, S., & Woods, D. *Pneumocystis* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics* **1978** Jan; 61(1):35-41.

Pinlaor, S., Mootsikapun, P., Pinlaor, P., et al. PCR diagnosis of *Pneumocystis carinii* on sputum and bronchoalveolar lavage samples in immuno-compromised patients. *Parasitol Res* **2004**; 94: 213-8.

Pitchenik, A.E., Fischl, M.A., Dickenson, G.M., et al. Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma among Haitians: evidence of a new acquired immunodeficiency state. *Ann Intern Med* **1983**; 98:277-84.

Podzamczar, D., Santín, M., Jiménez, J., Casanova, A., Bolao, F., & Gudiol, G.R. Thrice-weekly cotrimoxazole is better than weekly dapsone-pyrimethamine for the primary prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected patients. *AIDS*, **1993**; 7:501-6.

Podzamczar, D., Barros, C., Berenguer, J., et al. Tratamiento de las infecciones oportunistas en pacientes adultos y adolescentes infectados por el VIH en la era del Tratamiento Antiretroviral de gran actividad. Recomendaciones de GESIDA/ Plan Nacional sobre el Sida. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **2008**, 26(6); 356-74.

Porter, A. The occurrence of *Pneumocystis carinii* in mice in England. *Parasitology* **1915**; 8: 255.

Procop, G.W., Haddad, S., Quinn, J., et al. Detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens by four staining methods. *J Clin Microbiol* **2004**; 3333-5.

Q

Queener, S.F., Barlett, M.S., Jay, M.A., Durkin, M.M., & Smith, J.W. Activity of lipid-soluble inhibitors of dihydrofolate reductase against *Pneumocystis carinii* in culture and in rat model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* **1987**; 31: 1323-7.

Qureshi, M.H., & Garvy, B.A. Neonatal T cells in an adult lung environment are competent to resolve *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Immunol* **2001**; 166: 5704-11.

R

Ribes, J.A., Limper, A.H., Espy, M.J., & Smith, T.F. PCR detection of *Pneumocystis* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* **1997**; 35: 830-5.

- Rigaud, M., Pollack, H., Leibovitz, E., et al.** Efficacy of primary chemoprophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia during the first year of life in infants infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Pediatr* **1994**; 125: 476.
- Robberts, F.J., Chalkley, L.J., Weyer, K., Goussard, P., & Liebowitz, L.** Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jiroveci* from South Africa. *J Clin Microbiol* **2005**; 43: 1443-4.
- Rodríguez, F., Suárez, M., Cornejo, M.X. et al.** Neumonía por *Pneumocystis jiroveci* en pacientes con SIDA en el Hospital Santo Tomás. *Rev Med Panamá* **1996**; 21:4-10.
- Rogers, M.F., Morens, D.M., Stewart, J.A., et al.** National case-control study of Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men: Part 2. Laboratory results. *Ann Intern Med* **1983**; 99:151-8.
- Rubis, E., & Zak, F.G.** Variants of *Pneumocystis pneumonia*. *Pathol Bacteriol* **1957**; 74: 353.
- Ruffini, D.D., & Madhi, S.A.** The high burden of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in African HIV-1 infected children hospitalized for severe pneumonia. *AIDS* **2002**; 16:105-12.
- Ruoslahti, E., & Pieschbacher, M.D.** New perspectives in cell adhesion: RDG and integrins. *Science* **1987**; 238:491-7.
- Russian, D.A., & Kovacs, J.A.** *Pneumocystis carinii* in Africa: An emerging pathogen? *Lancet* **1995**; 346:1242-3.
- S**
- San-Andrés, F.J., Rubio, R., Castilla, J., et al.** Incidente of Acquired Immunodeficiency Síndrome-Associated opportunistic diseases and the effect of treatment on a cohort of 1115 patients infected in human immunodeficiency virus, 1989-1997. *Clin Infect Dis* **2003**; 36: 1177-85.
- Sandhu, J.S., & Goodman, P.C.** Pulmonary cysts associated with *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *Radiology* **1989**; 173: 33-5.
- Santoro-Lopes, G., Harrison, L.H., Moulton, L.H., et al.** Gender and survival after AIDS in Rio de Janeiro, Brazil. *J AIDS* **1998** ; 4 :403-7.
- Santos, L.D., Lacube, P., Latouche, S., Kac, G., Mayaud, C., Marteau, M., et al.** Contribution of dihydropteroate synthase gene typing for *Pneumocystis carinii* f.sp. hominis epidemiology. *J Euk Microbiol* **1999**; Sep-Oct 46(5) 133S-134S.

- Schneider, M.M., Hoepelman, A.I., Eeftinck Schattenkerk, et al.** A controlled trial of aerosolized pentamidine or trimetoprim-sulfamethoxazole as primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection. The Dutch AIDS Treatment Group. *N Engl J Med* **1992**; 327: 1836-41.
- Semenzano, G., Agostini, C., Ometto, L., et al.** CD8+ T lymphocytes in the lungs of acquired immunodeficiency syndrome patients harbor human immunodeficiency virus type 1. *Blood* **1995**; 85: 2308-14.
- Sepkowitz, K.A., Telzak, E.E., Gold, J.W. et al.** Pneumothorax in AIDS patients. *Ann Intern Med* **1991**; 114: 455-9.
- Sepkowitz, K.A., Brown, A.E., Armstrong, D.** *Pneumocystis carinii* pneumonia without acquired immunodeficiency syndrome. More patients, same risk. *Arch Intern Med* **1995**; 155: 1125-8.
- Serrano, M.T., Smith, N.H., & Shandera, W.X.** Epidemiology of human immunodeficiency virus infection in Central Americans treated in Harris County, Texas hospital district facilities. *Am J Trop Med Hyg* **1997**; 57: 678-82.
- Sheehan, P.M., Stokes, D.C., Yeh, Y., & Hughes, W.T.** Surfactant phospholipids and lavage phospholipase A₂ in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am Rev Respir Dis* **1986**; 134:526-31.
- Sheldon, W.H.** Experimental pulmonary *Pneumocystis* infection in rabbits. *J Exp Med* **1959**; 110: 147-60.
- Shellito, J., Suzara, V.V., Blumenfeld, W., et al.** A new model of *Pneumocystis carinii* infection in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *J Clin Invest* **1990**; 85: 1686-93.
- Sims, P., Wang, P., & Hyde, J.E.** Selection and synergy in *Plasmodium falciparum*. *Parasitol Today* **1999**; 15: 132-4.
- Smith, J.W.** Studies of susceptibility of *Pneumocystis carinii* to clindamycin/primaquine in rats. *Eur J Clin Microb Infect Dis* **1991**;10: 201-3.
- Smith, D.K., Neal, J.J., Holmberg, S.D. et al.** Idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia Task Force. Unexplained opportunistic infections and CD4+ T-lymphocytopenia without HIV infection. *N Engl J Med* **1993**; 328: 373-9.

- Smulian, A.G., Keely, S.P., Sunkin, S.M., et al.** Genetic and antigenic variation in *Pneumocystis carinii* organisms: Tools for examining the epidemiology and pathogenesis of infection. *J Lab Clin Med.* **1997**; 130: 461-8.
- Soriano, V., Dona, C., Rodríguez-Rosado, R., Barreiro, P., & González-Lahoz, J.** Discontinuation of secondary prophylaxis for opportunistic infections in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS.* **2000**; 14: 383-6.
- South African Department of Health.** South African integrated management of childhood illness guideline. Pretoria, South Africa: Department of Health, September **2001**.
- Stagno, S., Piller, L.L., Hughes, W.T., Brasfield, D.M., & Tiller, R.E.** *Pneumocystis carinii* pneumonia in young immunocompetent infants. *Pediatrics* **1980**; 66(1):56-62.
- Stahl, P.D., Rodman, J.S., Miller, M.J. & Schlesinger, P.H.** Evidence for receptor mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* **1978**; 78: 1019-22.
- Steele, C., Zheng, M., Marrero, L., et al.** Increased host resistance against *Pneumocystis carinii* in $\gamma\delta$ T-cell-deficient mice: Protective role of gamma interferon and CD8+ T cells. *Infect Immun* **2002**; 70: 5208-15.
- Steck, E.A.** The Chemotherapy of Protozoan Diseases. Vol.III. Washintong. DC: Walter Reed Army Institute of Research, **1971**.
- Stringer, S.L., Stringer, J.R., Blase, M.A., Walzer, P.D., & Cushion, M.T.** *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp. Parasitol* **1989**; 68: 450-61.
- Stringer, J.R., Beard, C.B., Miller R.F., & Wakefield, A.E.** A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* **2002**; 8: 891-6.
- ## T
- Takahashi, T., Hosoya, N., Endo, T., Nakamura, T. Sakashita, H., Kimura, K., et al.** Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis isolates in Japan and resistance to sulphonamide therapy. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 3161-4.
- Tansuphasawadikul, S., Amornkul, P.N., Tanchanpong, C., et al.** Clinical presentation of hospitalized adult patients with HIV infection and AIDS in Bangkok, Thailand. *J AIDS* **1999**; 21: 326-32.

- Telzak, E.E., Cote, R.J., Gold, J.W., Campwell, S.W. & Armstrong, D.** Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections. *Rev Infect Dis* **1990**;12: 380-6.
- Thea, D.M., Lambert, G., Weedon, J., et al.** Benefit of primary prophylaxis before 18 months of age in reducing the incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia and early deaths in a cohort of 112 human immunodeficiency virus-infected infants. *Pediatrics* **1996**; 97: 59-64.
- Theus, S.A., Andrews, R.P., Steele, P., & Walzer, P.D.** Adoptive transfer of lymphocytes sensitized to the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* confers protection in the rat. *J Clin Invest* **1995**; 95: 2587-93.
- Theus, S.A., Smulian, A.G., Steele, P., et al.** Immunization with the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii* elicits a protective response in the rat. *Vaccine* **1998**; 16: 1149-57.
- Theus, S.A., Sawhney, N., Smulian, A.G., et al.** Proliferation and cytokine responses of human T lymphocytes isolated from HIV patients to the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* **1998 (b)**; 177: 238-41.
- Torres, A., El-Ebiary, M., Marrades, R., et al.** Aetiology and prognostic factors of patients with AIDS presenting life-threatening acute respiratory failure. *Eur Respir J* **1995**; 8: 1922-8.
- Torres, J., Goldman, M., Wheat, L.J., 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: 141-5.
- Triglia, T., Wang, P., Sims, P.F., Hyde, J.E., & Cowman, A.F.** Allelic exchange at the endogenous locus in *Plasmodium falciparum* proves the role of dihydropteroate synthase in sulfadoxine-resistant malaria. *EMBO J* **1998**; 17: 3807-15.
- V**
- Valerio, A., Tronconi, E., Mazza, F., et al.** Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Italian AIDS patients. Clinical outcome is influenced by dihydropteroate synthase and not by internal transcribed spacer genotype. *J Acquir Immune Defic Syndr* **2007** Aug 15; 45(5): 521-8.
- Van der Meer M.G., & Brug, S.L.** Infection a *Pneumocystis* chez l'homme et chez les animaux. *Ann Soc Belg Med Trop* **1942**; 22 :301-9.
- Vanek, M.J.** Atypická (intersticiální) pneumonia deti, vyvolaná *Pneumocystis carinii*. *Cas Lek Cesk* **1951** ; 38 : 1121-4.

- Vanek, J., Jírovec, O., & Lukes, J.** Interstitial plasma cell pneumonia in infants. *Ann Paediatr* **1953**; 180: 1-21.
- Vedantam, G., Guay, G.G., Austria, N.E., Doktor, S.Z., & Nichols, B.P.** Characterization of mutations contributing to sulfathiazole resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* **1998**; 42: 88-93.
- Vetter, K.M., Djomand, G., Zadi, F., et al.** Clinical spectrum of human immunodeficiency virus disease in children in a West African city. *Pediatr Infect Dis J* **1996**; 15: 438-42.
- Visconti, E., Ortona, E., Mencarini, P., et al.** Mutations in dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis carinii* in HIV patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* **2001**; 18: 547-51.
- W**
- Wachter, R.M., Luce, J.M., Turner, J., Volberding, P., & Hopewell, P.C.** Intensive care of patients with the acquired immunodeficiency syndrome. Outcome and changing patterns of utilization. *Am Rev Respir Dis* **1986**; 134: 891-6.
- Wachter, R.M., Russi, M.B., Bloch, D.A., Hopewell, P.C., & Luce, J.M.** *Pneumocystis carinii* pneumonia and respiratory failure in AIDS. Improved outcomes and increased use of intensive care units. *Am Rev Respir Dis* **1991**; 143: 251-6.
- Wachter, R.M., Luce, J.M., Safrin, S., Berrios, D.C., Charlebois, E., & Scitovsky, A.A.** Cost and outcome of intensive care of patients with AIDS, *Pneumocystis carinii* pneumonia, and severe respiratory failure. *JAMA* **1995**; 273: 230-5.
- Wakefield, A.E., Pixley, F.J., Barneji, S. et al.** Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* **1990**; 336: 451-3.
- Wakefield, A.E.** Genetic heterogeneity in *Pneumocystis carinii*: an introduction. *FEMS Immunol Med Microbiol* **1998**; 22: 5-13.
- Wakefield, A.E.** *Pneumocystis carinii*. *Br Med Bull* **2002**; 61: 175-88.
- Walker, D.J., Wakefield, A.E., Dohn, M.N., et al.** Sequence of polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J Infect Dis* **1998**; 178: 1767-75.
- Walzer, P.D., Perl, D.P. Krogstead, D.J., Rawson, P.C., & Schultz, M.G.** *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. *Ann Intern Med* **1974**; 80: 83-93.
- Walzer, P.D., Schnelle, V., Armstrong, D., & Rose, P.P.** Nude mouse: a new experimental model for *Pneumocystis carinii* infection. *Science* **1977**; 197(4299): 177-9.

- Walzer, P.D., Powell, R.D., Yoneda, K., Rutledge, M.E., & Middler, J.E.** Growth characteristics and pathogenesis of experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun* **1980**; 27: 929-37.
- Walzer, P.D., Kim, C.K., & Cushion, M.T.** *Pneumocystis carinii*: In Walzer, PD, Genta, RM, eds. Parasitic Infections in the Compromised Host. New York: Marcel Dekker; **1989**: 83-178.
- Walzer, P.D.** *Pneumocystis carinii*-new clinical spectrum? *N Engl J Med* **1991**; 324: 263-5.
- Walzer, P.D., Foy, J. Steele, P. et al.,** Activities of antifolate, antiviral, and othe drugs in an immunosuppressed rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* **1992**; 36: 1935-42.
- Walzer D.J., Wakefield, A.E., Dohn, M.N., et al.** Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J Infect Dis* **1998**; 178: 1767-5.
- Walzer, P.** Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in humans. *Clin Diag Lab Immunol* **1999**; 6: 149-55.
- Walzer, P.** Pneumocystosis. In Guerrant, R.L., Walzer, D.H., Weller, P.F., Eds. Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, and Practice. Philadelphia: Churchill Livingstone, **1999(b)**: 673-84.
- Walzer, P.D., & Smulian, A.G.** Género *Pneumocystis*. En: Mandell G.L. Enfermedades Infecciosas. Principios y Prácticas, 6ed. Vol 3. Elsevier ed, **2006**; 3080-3094.
- Walzer, P.D., Evans, H.E.R., Copas, A.J., Edwards, S.G., Grant, A. D., & Miller, R.F.** Early Predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients 1985-2006. *Clin Infect Dis* **2008**; 46: 625-33.
- Wannamethee, S.G., Sirivichayakul, S., Phillips, A.N., et al.** Clinical and immunological features of human immunodeficiency virus infection in patients from Bangkok, Thailand. *Int J Epidemiol* **1998**; 27: 289-95.
- Weinberg, A., & Duarte, M.I.S.** Respiratory complications in Brazilian patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **1993**; 34:129-39.
- Weller, R.** Production of pneumocystoses in animals. *Kinderchir* **1955**; 76: 366-78.
- Wiktor, S.Z., Sassan-Morokro, M., Grant, A.D., et al.** Efficacy of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis to decrease morbidity and mortality in HIV-1-infected patients with tuberculosis in Abidjan, Côte d'Ivoire: a randomised controlled trial. *Lancet* **1999**; 353: 1469-75.

Wiley, J.A., & Harsen, A.G. CD 40 ligand is required for resolution of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J Immunol* **1995**; 155: 3525-9.

Williams, P.L., Currier, J.S., & Swindells, S. Joint effects of HIV-1 RNA levels and CD4 lymphocyte cells on the risk of specific opportunistic infections. *AIDS* **1999**; 13: 1035-44.

Wiselogle, F.Y. National Research Council (U.S.). A survey of Antimalarial Drugs, 1941-1945. Ann Arbor, MI: Edwards, **1946**.

Wislez, M., Bergot, E., Antonie, M., et al. Acute respiratory failure following HAART introduction in patients treated for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**; 164: 847-51.

Wolff, M., Diomedi, A., Olivares, R. et al. Prospective follow-up of a cohort of HIV + patients with and without access to antiretroviral therapy: survival and conclusions (abstr 85). *In: Program and abstracts of the 8th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, Chicago, 2001*.

World Health Organization, UNAIDS. Provisional WHO/UNAIDS recommendations on the use of cotrimoxazole prophylaxis in adults and children living with HIV/AIDS in Africa. *Afr Health Sci* **2001**; 1: 30-1.

Y

Yale, S.H., & Limper, A.H. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc* **1996**; 71: 5-13.

Yerly, S., Perneger, T.V., Hirschel, B., et al. A critical assessment of the prognostic value of HIV-1 RNA levels and CD4+ cell counts in HIV-infected patients. The Swiss HIV Cohort Study. *Arch Intern Med* **1998**; 158: 247-52.

Yoneda, K., & Walzer, P.D. Mechanism of alveolar injury in experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in the rat. *Br J Exp Pathol* **1981**; 62: 339-46.

Yoneda, K., & Walzer, P.D. Attachment of *Pneumocystis carinii* to type I alveolar cells: study by freeze fracture electron microscopy. *Infect Immun* **1983**; 40: 812-5.

Z

Zaman, M.K., & White, D.A. Serum lactate dehydrogenase levels and *Pneumocystis carinii* pneumonia. Diagnostic and prognostic significance. *Am Rev Respir Dis* **1988**; 137:796-800.

**Zar, H.J., Dechaboon, A., Hanslo, D.,
et al.** *Pneumocystis jirovecii*
pneumonia in South African
children infected with human
immunodeficiency virus. *Pediatr
Infect Dis J* **2000**; 19: 603-7.

**Zheng, M., Shellito J.E., Marrero, L.,
et al.** CD4+ T cell-independent
vaccination against *Pneumocystis
carinii* in mice. *J Clin Invest* **2001**;
108: 1469-74.

IX. ANEXO

Anexo 1- CUADERNO DE RECOGIDA DE DATOS (CRD).

1. DATOS DEMOGRÁFICOS:

Nombre Hospital (ciudad):Hospital Clínic (Barcelona) Código Hospital: 06 N° paciente (en cada hosp):

N° Historia: _____ Nombre del paciente: _____ Apellido 1:
 _____ Apellido 2: _____ Fecha nacimiento: ___/___/___ Sexo:
 ____ (V/M) (V = varón; M = mujer)

Ciudad de residencia habitual: _____

2. HISTORIA INFECCIÓN VIH PREVIA AL EPISODIO ACTUAL:

2.1. Práctica de riesgo VIH:

Uso de drogas por vía parenteral:
 Conducta sexual: (Homosexual: Heterosexual:)
 Hemofilia:
 Otros: Especificar: _____

2.2. Fecha de seropositividad VIH: ___/___/___ ¿Evolución a Sida? SI / NO

Fecha: ___/___/___

2.3. ¿Eventos C previos? SI / NO; Si eventos C previos, especificar cuáles y fecha:

1. _____ Fecha: ___/___/___ 3. _____ Fecha:
 ___/___/___
 2. _____ Fecha: ___/___/___ 4. _____ Fecha:
 ___/___/___

2.4. Fecha CD4<200/mm³ (por primera vez): ___/___/___ Cifra absoluta/porcentaje: ___/___

2.5. Fecha CD4 más bajo: ___/___/___ Cifra absoluta/porcentaje ___/___

2.6. TARV previos: SI / NO (AZT/ ddI/ ddC/ d4T /3TC/ ABA / NEVI/ EFA/ SAQUI/ RITO/ INDI/ NELFI, otros)

Régimen	Fecha inicio	Fecha final
1.	___/___/___	___/___/___
2.	___/___/___	___/___/___
3.	___/___/___	___/___/___
4.	___/___/___	___/___/___

2.6.1. ¿Ha suspendido el paciente en más de 1 ocasión durante más de un mes el TARV sin causa justificada? SÍ / NO / desconocido

2.6.2. ¿Ha faltado el paciente a una visita de control en más de 2 ocasiones sin causa justificada? SÍ / NO / desconocido

2.6.3. ¿Se considera que el paciente es un buen cumplidor del TARV? (cumplimiento de más del 95% de la medicación prescrita): SÍ / NO / desconocido

2.7. Profilaxis primaria frente a *P. carinii*:

¿Ha recibido profilaxis primaria frente a *P. carinii* en alguna ocasión? SÍ / NO / desconocido

Fecha de inicio: ____ / ____ / ____

¿Ha suspendido voluntariamente la profilaxis > 1 mes sin causa justificada? SÍ/NO/ desconocido

CD4 al inicio (nº/%)	Fármaco	Dosis semanal mg*	Fecha inicio	Fecha final	Causa supresión†	Cumplimiento‡
			__/__/__	__/__/__		
			__/__/__	__/__/__		
			__/__/__	__/__/__		

* Dosis mensual en el caso de la pentamidina † 1=Efectos secundarios: especificar;

2=Voluntaria sin causa justificada; 3=CD4 > 200; 4=Otras: especificar

‡ 1=Buen cumplidor: más del 80% de la dosis prescrita; 2=Mal cumplidor: menos del 80% de la dosis prescrita

2.8. Episodios de neumonía por *P. carinii* (NPC) previos al episodio actual:

2.8.1. ¿Ha tenido algún episodio previo de NPC?: SÍ / NO / desconocido

2.8.2. Fecha diagnóstico: ____ / ____ / ____ CD4 al diagnóstico (nº/%) : ____ / ____

2.8.3. ¿Diagnóstico “clínico”? (no diagnóstico etiológico): SÍ / NO / desconocido

2.8.4. Procedimiento diagnóstico:

2.8.5. Tratamiento del episodio:

Antibiótico	Dosis (mg/día)	Fecha inicio	Fecha final	Motivo cambio*

* 1=Efectos secundarios: especificar; 2=Falta de respuesta (mala evolución); 3=Inadecuado; 4=Otros: especificar

2.9. Profilaxis secundaria frente a *P. carinii*:

¿Ha recibido profilaxis secundaria frente a *P. carinii* en alguna ocasión? SÍ / NO / desconocido

Fecha de inicio: ____ / ____ / ____

¿Ha suspendido voluntariamente la profilaxis > 1 mes sin causa justificada? SÍ / NO / desconocido

CD4 al inicio (nº/%)	Fármaco	Dosis semanal mg*	Fecha inicio	Fecha final	Causa supresión†	Cumplimiento‡
			__/__/__	__/__/__		
			__/__/__	__/__/__		
			__/__/__	__/__/__		

* Dosis mensual en el caso de la pentamidina† 1=Efectos secundarios: especificar; 2=Voluntaria sin causa justificada; 3=CD4 > 200; 4=Otras: especificar‡ 1=Buen cumplidor: más del 80% de la dosis prescrita; 2=Mal cumplidor: menos del 80% de la dosis prescrita

3. EPISODIO ACTUAL DE NPC:

3.1. ¿Constituye un “debut” de su infección por el VIH? SÍ / NO / desconocido

Si no es así, ¿estaba recibiendo TARV previamente al episodio actual?: SÍ / NO / desconocido

Si la respuesta es afirmativa, ¿considera que el paciente era un buen cumplidor del TARV? (cumplimiento de más del 95% de la medicación prescrita): SÍ / NO / desconocido

3.2. Exposición a sulfamidas previa al episodio:

3.2.1. ¿Había recibido sulfamidas/sulfonas ≥ 1 mes durante los cuatro meses previos al diagnóstico del episodio actual de NPC? SÍ / NO / desconocido

3.2.2. Si la respuesta es afirmativa, ¿cuál fue la causa?:

- Profilaxis NPC (especificar datos en los apartados 2.7 y/o 2.9)
- Otras causas: especificar:

Fármaco	Dosis semanal mg	Fecha inicio	Fecha final	Causa supresión†	Cumplimiento‡
		__/__/__	__/__/__		
		__/__/__	__/__/__		
		__/__/__	__/__/__		

† 1=Efectos secundarios: especificar; 2=Voluntaria sin causa justificada; 3=CD4>200; 4=Otras: especificar ‡ 1=Buen cumplidor: más del 80% dosis prescrita; 2=Mal cumplidor: menos del 80% dosis prescrita

3.3. Datos del episodio actual de NPC:

CD4 últimos antes del diagnóstico (3 últimos meses): nº absoluto/%: ____ / ____

Carga viral VIH (nº copias) antes del diagnóstico (3 últimos meses): _____

Fecha inicio síntomas: ____ / ____ / ____

Síntomas: Tos Fiebre Disnea Otros: _____

Fecha ingreso: ____ / ____ / ____ Fecha de consulta (si no ingresa): ____ / ____ / ____

Datos al ingreso:

Temperatura ____ °C Frecuencia respiratoria (por minuto) _____

Hemograma: Leucocitos _____ Hb _____ Plaquetas _____

Proteína C reactiva (mg/dl): _____ Albúmina (mg/dl): _____

LDH (rango normal en el centro hospitalario): _____ (____)

pH: _____ pO2 _____ pCO2 _____ FIO2: _____

CD4: nº absoluto/%: ____ / ____ Carga viral VIH (nº copias): _____

Radiología: Condensación SÍ / NO. Infiltrado: alveolar / intersticial / mixto/nódulos

Afectación: Un lóbulo / varios lóbulos / difusa

Unilateral / bilateral

Señalar si procede: adenopatías / derrame pleural / cavitación

Diagnóstico NPC:

Procedimiento/s diagnóstico/s: _____

Fecha diagnóstico: ____ / ____ / ____

3.4. Tratamiento episodio actual NPC: Fecha inicio tratamiento correcto:

____ / ____ / ____

Antibiótico	Empírico / tras diagnóstico	Fecha inicio	Fecha supresión	Cambio: motivo ¹
1.				
2.				
3.				
4.				
5.				
6.				
7.				
8.				

1=Efectos secundarios: especificar; 2=Falta de respuesta (mala evolución); 3=Inadecuado; 4=Otros: especificar

¿Recibió **corticoides**? SÍ/NO/ desconocido; dosis más elevada (mg): _____; días duración:

3.5. Evolución del episodio actual de NPC

7º día desde el inicio de un tratamiento adecuado:

Frecuencia respiratoria (por minuto): _____

¿Desaparición de la fiebre?: SÍ / NO

pH: _____ pO2 _____ pCO2 _____ FIO2: _____

¿Ha requerido ingreso en UCI?: SÍ / NO. ¿Ha requerido ventilación mecánica (VM)?: SÍ / NO

Al finalizar el tratamiento / al fallecimiento:

Días totales duración fiebre: _____

¿Ha requerido ingreso en UCI?: SÍ / NO / desconocido. Fecha ingreso: ___/___/___; alta: ___/___/___

¿Ha requerido VM?: SÍ/NO/desconocido. Fecha intubación: ___/___/___; destete: ___/___/___

Fallecimiento: SÍ / NO Fecha fallecimiento: ___/___/___

Fallecimiento relacionado con NPC (criterio médico responsable): SÍ / NO

Fallecimiento **no** relacionado con NPC: SÍ; causa:

Fecha de alta: ___/___/___

Estudio necropsico: SI/NO/desconocido. Resultados:

3.6. Seguimiento a los 3 y 6 meses

A los 3 meses: Exitus SI/NO/desconocido Profilaxis secundaria: SI/NO/desconocido

Motivo de la supresión _____ Recidiva: SI/NO Fecha: ___/___/___

A los 6 meses: Exitus SI/NO/desconocido Profilaxis secundaria: SI/NO/desconocido

Motivo de la supresión _____ Recidiva: SI/NO Fecha: ___/___/___

Anexo 2- FACTOR DE IMPACTO 2006 DE LOS ARTÍCULOS INCLUIDOS: 13,568

- **Artículo 1.**
Sensitivity and Specificity of Nested and Real-time PCR for the Detection of *Pneumocystis jiroveci* in Clinical Specimens.
Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 2,553
- **Artículo 2.**
Pneumocystis jirovecii Pneumonia in Spanish HIV-Infected Patients in the Combined Antiretroviral Therapy Era: Prevalencia of DHPS Mutations and Prognostic Factor of Mortality.
Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases 2,553
- **Artículo 3.**
Influence of Combined Antiretroviral Therapy and Dihydropteroate Synthase Genotypes in the Outcome of *Pneumocystis* Pneumonia in HIV-Patients.
Journal of Acquired ImmuneDeficiency Syndromes (pendiente de aceptación) -
- **Artículo 4.**
Prevalence of Dihydropteroate Synthase Mutants in HIV-Infected South African Children with *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia.
Clinical Infectious Diseases. 6,186
- **Artículo 5.**
Absence of Dihydropteroate Synthase Mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS Patients.
Journal of Eukaryotic Microbiology 2,288
- **Artículo 6.**
Pneumocystis Pneumonia in HIV-Positive Adults, Malawi.
Emerging Infectious Diseases 5,094

Anexo 3- OTRAS PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.

Cartas al Director.

Prevalencia de mutaciones en el gen de la dihidropteroato sintetasa de *Pneumocystis jiroveci* en pacientes con SIDA en España.

Míriam J. Álvarez, José M. Miró, Asunción Moreno, Steven R. Meshnick y el Grupo Español de Estudio de *Pneumocystis*. Med Clin (Bar), **2005**; 124 (1): 37-9.

Artículos de revisión.

Utilidad de la biología molecular en el diagnóstico microbiológico de la infecciones en el inmunodeprimido (*CMV*, *virus JC*, *Pneumocystis jirovecii* y *Toxoplasma gondii*).

M. A. Marcos, M. J. Álvarez-Martínez, J. Nuibó, T. Pumarola. Enferm Infec Microb Clin, **2008** (en prensa).

Comunicaciones a Congresos.

1. XV International AIDS Conference. Bangkok, Thailand, 11-16 July, 2004.

Alvarez M*, Miró JM, Moreno A, Valls ME, Rivas P, Benito N, Domingo P, Ribera E, Cordero ME, Sirera G, Riera M, Vidal F, Sala M, Arrizabalaga J, Arribas JR, García F, Jiménez de Anta MT, Gatell JM, Wilson P, Meshnick S and the Spanish NPC Working Group. **Low prevalence of *Pneumocystis jiroveci* Dihydropteroate Synthase (DHPS) mutations in Spanish HIV-1 infected patients with *P. jiroveci* Pneumonia (Abstract MoPeB3216).**

2. 12th CROI (Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections), Boston, USA, February 22-27th, 2005.

M. Alvarez*, O. Sued, J.M. Miró, A. Moreno, M.E. Valls, M. Solé, P. Rivas, N. Benito, M.T. Jiménez de Anta, J.M.Gatell, P.E. Wilson, S. Meshnick and the Spanish PCP Working Group. **Mutations in the *Pneumocystis jiroveci* Dihydropteroate Synthase Gene in Spanish HIV-1-infected Patients (Abstract 882).**

3. **XI Reunión SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica), Zaragoza, 27-29 Abril, 2005.**

M. Álvarez*, J.M. Miró, M.E. Valls, A. Moreno, P. Rivas, M. Solé, N. de Benito, F. García, P. Domingo, E. Ribera, M.E. Cordero, M.T. Jiménez de Anta, J.M. Gatell, P.E. Wilson, S.R. Meshnick y el Grupo de Trabajo Español de Neumonía por *Pneumocystis jiroveci*. **Diagnóstico de la neumonía de por *Pneumocystis jiroveci* en pacientes VIH-1 mediante PCR cuantitativa a tiempo real.**

4. **XI Reunión SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica), Zaragoza, 27-29 Abril, 2005.**

M. Álvarez *, J.M. Miró, A. Moreno, M.E. Valls, P. Rivas, O. Sued, E de Lazzari, N. Benito, F. García, P. Domingo, E. Ribera, M.E. Cordero, G. Sirera, M. Riera, F. Vidal, F. Segura, F. Rodríguez, J.R. Arribas, M. Santin, M.T. Jiménez de Anta, J.M. Gatell, P.E. Wilson, S.R. Meshnick y el Grupo de Trabajo Español de Neumonía por *P. jiroveci*. **Baja prevalencia de mutaciones en el gen de la dihidropteroato sintetasa (DHPS) de *Pneumocystis jiroveci* en pacientes españoles HIV-1 con neumonía por *P. jiroveci*.**

5. **7th Bulgarian Parasitology Conference. Sofia, Bulgaria, September 2005.**

M. J. Álvarez, J.M. Miró, M.E. Valls, A. Moreno, P. Rivas, M. Solé, N. de Benito, F. García, P. Domingo, E. Ribera, M.T. Jiménez de Anta, J.M. Gatell, P.E. Wilson, S. R. Meshnick and the Spanish PCP Working Group. **Quantitative Real-time PCR for the Diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia in HIV-1 infected patients.**

6. **XII Congreso SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica), Valencia, 10-13 Mayo, 2006.**

M. Álvarez *, J.M. Miró, A. Moreno, M.E. Valls, P. Rivas, O. Sued, E de Lazzari, N. Benito, F. García, P. Domingo, E. Ribera, M.E. Cordero, G. Sirera, M. Riera, F. Vidal, F. Segura, F. Rodríguez, J.R. Arribas, M. Santin, M.T. Jiménez de Anta, J.M. Gatell, P.E. Wilson, S.R. Meshnick y el Grupo de Trabajo Español de Neumonía por *P. jiroveci*. **Factores pronósticos de la neumonía por *Pneumocystis jiroveci* (PCP) en pacientes VIH-1 en la era tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en España. (Comunicación 552).**

7. XIII Congreso SEIMC (Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica), Madrid, Mayo 2008.

Miriam J. Álvarez-Martínez, José M. Miró, María Eugenia Valls, Omar Sued, Manel Solé, Paula V. Rivas, Elisa de Lazzari, Natividad Benito, Felipe García, Carlos Agustí, Paul E Wilson, José M. Gatell, María Teresa Jiménez de Anta, Steven R Meshnick, y Asunción Moreno. Nemonía por *Pneumocystis jirovecii* en Pacientes VIH-1 Antes y Después de la Terapia Antiretroviral Combinada. Influencia de los Genotipos de Dihidropteroato Sintetasa en el Pronóstico (Comunicación 208).



Prevalencia de mutaciones en el gen de la dihidropteroato sintetasa de *Pneumocystis jiroveci* en pacientes con sida en España

Sr. Editor: Hemos leído con atención el interesante artículo de Calderón et al¹ en el que 3 de los 9 pacientes con neumonía por *Pneumocystis jiroveci* (PCP) en los que se pudo amplificar el gen de la dihidropteroato sintetasa (DHPS) presentaron mutaciones asociadas a resistencia a las sulfamidias. Dado que este estudio se ha efectuado en un solo centro y con un reducido número de pacientes, y puesto que no existen otros estudios similares en España, nos gustaría aportar los resultados preliminares² de un estudio prospectivo y multicéntrico que ha incluido a 135 pacientes con PCP infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) de 12 hospitales españoles de Badalona, Barcelona, Madrid, Palma de Mallorca, Sabadell, San Sebastián, Sevilla y Tarragona durante el mismo período (años 2001-2003). Al incluir a un mayor número de pacientes y de una distribución geográfica más amplia, creemos que nuestros resultados pueden ser más representativos de la situación real de este problema en nuestro ámbito.

El diagnóstico de PCP se realizó mediante la tinción de plata metenamina de Gomori y tinción de Giemsa en muestras respiratorias, tanto de lavado broncoalveolar como en esputo inducido. Las muestras se congelaron en alícuotas a -20 °C o se fijaron en un portaobjetos en alcohol y se conservaron a temperatura ambiente. La genotipificación de *P. jiroveci*, a diferencia del análisis de los polimorfismos de restricción, igualmente eficaz, que realizaron en su estudio Calderón et al¹, se llevó a cabo mediante 2 protocolos diferentes³ de doble reacción en cadena de la polimerasa (Nested-PCR), amplificando el gen de la DHPS y posteriormente secuenciando el amplicón resultante y comparándolo con la secuencia consenso de la DHPS de *P. jiroveci*⁴. Esta enzima es el principal sitio de la acción anti-*Pneumocystis* del sulfametoxazol y donde se han descrito mutaciones puntuales en los aminoácidos 55 Thr → Ala y 57 Pro → Ser, que determinan resistencia a la profilaxis con dichos fármacos⁵⁻¹⁰.

En nuestro estudio la tasa de amplificación fue superior y se logró genotipificar 130 de 135 muestras (96%). Con respecto a las características de los pacientes con PCP cuyo aislamiento se amplificó, el 72% eran varones con una edad media de 40 años (extremos: 28-55). La conducta de riesgo para la infección por el VIH fue la adicción a drogas por vía parenteral en el 35% de los casos, las relaciones homosexuales en el 13% y las heterosexuales en el 39%. La infección por el VIH-1 y la PCP se diagnosticaron al mismo tiempo en el 44% de los casos. Solamente el 20% de los pacientes recibieron profilaxis primaria con cotrimoxazol. Ciento veintitrés pacientes (95%) mostraron una secuencia no mutada para el gen de la DHPS (55Thr, 57Pro). Siete pacientes (5%; intervalo de confianza del 95%, 2,1-10,4%) presentaron mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jiroveci*. De éstos, 6 contenían una población homogénea de *P. jiroveci*, uno con una doble mutación en DHPS consistente en un cambio en los aminoácidos 55 y 57 (55 Ala, 57 Ser), 3 de ellos con una mutación sencilla en el aminoácido 57 (55 Thr, 57 Ser) y 2 de los 6 presentaron una mutación única en el aminoácido 55 (55 Ala, 57 Pro). El séptimo presentó una población heterogénea consistente en una cepa no mutada (55 Thr, 57 Pro) y otra cepa con una mutación sencilla en la posición 55 (55 Ala, 57 Pro). Sólo 2 de estos 7 pacientes habían estado expuestos previamente al cotrimoxazol. El origen de los casos, que fue diverso, se identificó en 5 de las 8 poblaciones participantes en el estudio. Todos los pacientes con mutaciones se

curaron y no hubo ningún fallecimiento durante los 6 meses siguientes al alta. Seis recibieron tratamiento con cotrimoxazol y uno con pentamidina por vía intravenosa. Por el contrario, fallecieron durante el ingreso hospitalario 18 (15%) de los 130 pacientes con PCP con una cepa no mutada.

La baja tasa de pacientes con mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jiroveci* en España probablemente se deba a la baja exposición previa a las sulfamidias en nuestro ámbito. A pesar de que algunos estudios han relacionado la presencia de mutaciones con un aumento de mortalidad⁷, que otros no han podido comprobar¹⁰, los datos preliminares de nuestra serie indican que los pacientes con mutaciones en el gen de la DHPS de *P. jiroveci* no tienen una mayor mortalidad.

Este estudio ha sido financiado por la beca FIPSE 24198/01. El Dr. Miró recibió una beca de investigación del Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona.

Agradecemos la colaboración de los centros de la Red Temática Cooperativa de Investigación en SIDA del FIS (Red de Grupos 173) que han participado en este estudio, de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC) y del Hospital Clínic-IDIBAPS de Barcelona.

Grupo de Trabajo Español de Neumonía por Pneumocystis jiroveci: M. Álvarez, J.M. Miró, A. Moreno, M.E. Valls, M. Solé, N. de Benito, P. Rivas, O. Sued, F. García, E. Martínez, J. Mallolas, E. de Lazzari, M.T. Jiménez de Anta, J.M. Gatell (Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer-Hospital Clínic. Universitat de Barcelona. Barcelona); P. Domingo, C. Muñoz (Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona); E. Ribera (Hospital General Universitari Vall d'Hebron. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona); F. Rodríguez, J. Arribas (Hospital Nuestra Señora de Aránzazu. Donostia); B. Valera, M.E. Cordero (Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla); G. Sirera, C. Tural, B. Clotet (Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona) J.R. Arribas (Hospital La Paz, Madrid); M. Saumoy, F. Vidal (Hospital Juan XIII. Universitat Rovira i Virgili, Tarragona); G. Navarro, F. Segura (Hospital de Sabadell. Sabadell. Barcelona); M. Riera, J. Murillas (Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca).

Miriam J. Álvarez^{a,b}, José M. Miró^a,
Asunción Moreno^a, Steve R. Meshnick^b
y el Grupo de Trabajo Español de Neumonía
por *Pneumocystis jiroveci*

^aHospital Clínic-IDIBAPS. Universitat de Barcelona. Barcelona, España. ^bDepartments of Epidemiology, and Microbiology & Immunology. University of North Carolina. Chapel Hill. EE.UU.

1. Calderón E, De la Horra C, Montes-Cano MA, Respaldiza N, Martín-Juan J, Varela JM. Resistencia genotípica a sulfamidias en pacientes con neumonía por *Pneumocystis jiroveci*. *Med Clin (Barc)*. 2004;122:617-9.
2. Álvarez M, Miró JM, Moreno A, Valls ME, Rivas P, Benito N, et al, and the Spanish NPC Working Group. Low prevalence of *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase (DHPS) mutations in Spanish HIV-1 infected patients with *P. jiroveci* Pneumonia [resumen MoPeB3216]. Proceedings of XV International AIDS Conference; 2004; July 11-16; Bangkok.
3. Zar H, Álvarez-Martínez M, Harrison A, Meshnick SR. Prevalence of dihydropteroate synthase (DHPS) mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. *Clin Infect Dis*. 2004;39:1047-51.
4. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis*. 1997;175:482-5.
5. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, et al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS*. 1998; 12:873-8.
6. Mei Q, Gurunathan S, Masur H, Kovacs JA. Failure of cotrimoxazole in *Pneumocystis carinii* infection and mutations in dihydropteroate synthase gene. *Lancet*. 1998;351:1631-2.
7. Helweg-Larsen J, Benfield TL, Eugen-Olsen J, Lundgren JD, Lundgren B. Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *Lancet*. 1999;354:1347-51.
8. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee CH, et al. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis*. 2000;182:551-7.
9. Beard C, Carter J, Keely S, Huang L, Pieniazek N, Moura I, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis*. 2000;6:265-72.
10. Navin T, Beard C, Huang L, Del Río C, Lee S, Pieniazek NJ, et al. Effect of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P. carinii* pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study. *Lancet*. 2001; 358:545-9.

Utilidad de la Biología Molecular en el Diagnóstico Microbiológico

Infecciones en el Inmunodeprimido

M^a Angeles Marcos¹

Miriam J. Alvarez-Martínez¹

Jordi Niubó²

Tomàs Pumarola¹

¹**Servicio de Microbiología, Hospital Clínic, Barcelona**

²**Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Bellvitge, Barcelona**

Resumen

Las técnicas de biología molecular han representado un importante avance en el diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas, al ser capaces de detectar el microorganismo causal con elevada sensibilidad y establecer marcadores pronósticos y de eficacia terapéutica, en un tiempo lo suficientemente breve para que los resultados generados tengan un impacto determinante en la evolución clínica del paciente inmunodeprimido. Sin embargo, continúan teniendo importantes limitaciones que deberán solucionarse en el futuro, de tal forma que no son excluyentes de otras metodologías utilizadas en Microbiología: falta de estandarización; variabilidad intra e inter ensayo; dificultad de comparar resultados entre diferentes laboratorios y bajo valor predictivo positivo, debido a su elevada sensibilidad, que dificultan la interpretación de los resultados. En el presente trabajo se revisa la utilidad de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico y seguimiento de la infección en el paciente inmunodeprimido por citomegalovirus humano, virus de Epstein Barr, virus del herpes simple 6 y 7, virus JC y BK, *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis jirovecii*.

Palabras clave: Diagnóstico microbiológico, Biología molecular, paciente inmunodeprimido, trasplante, infección oportunista.

Abstract

Molecular biology techniques have become an important break through in the microbiologic diagnosis of infectious diseases, since they are able to detect the aetiological microorganisms with a high sensitivity. Moreover, they can also establish prognostic and therapeutic efficacy markers with a turnaround time to generate results shorter enough to be determinant in the clinical management of the patient. However they still have important limitations that should be solved in the near future: lack of standardization; inter and intra-assay variability; difficulty to compare results between different laboratories and low positive predictive value, as a result of their high sensitivity, leading to problems in the interpretation of the results.

The present work, reviews the usefulness of the molecular biology techniques for the diagnosis and clinical management of the infectious diseases caused by human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human herpes viruses 6 and 7, JC and BK viruses, *Toxoplasma gondii* and *Pneumocystis jirovecii* in the immunosuppressed patient.

Key words: Microbiologic diagnosis, Molecular Biology Techniques, immunosuppressed patient, transplant, oportunist infections

El laboratorio de Microbiología Clínica posee un papel determinante en el manejo clínico del paciente inmunodeprimido a través de la detección de los diferentes microorganismos causales, diagnóstico de elevada complejidad, derivada de la propia inmunosupresión. En los últimos años, los laboratorios de Microbiología también han implementado marcadores pronósticos, que permiten establecer la evolución del paciente y el inicio del tratamiento específico, y de eficacia terapéutica. Sin embargo, para que la actuación microbiológica tenga un impacto positivo en la evolución del paciente inmunodeprimido, debe generar resultados idealmente en menos de 24-48 horas desde la recepción de las muestras. En este sentido, las técnicas microbiológicas convencionales, en general, tan sólo aportan detección de microorganismos y en la mayoría de las ocasiones, tardíamente. Las actuales técnicas de biología molecular están demostrando su capacidad para generar la información microbiológica necesaria en la clínica y en un breve período de tiempo. Pero la propia sensibilidad de estas técnicas dificulta en ocasiones su interpretación, lo que no las hace en absoluto excluyentes de otras metodologías utilizadas en microbiología clínica.

En el presente trabajo se revisa la utilidad de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico y seguimiento de la infección en el paciente inmunodeprimido por citomegalovirus humano, virus de Epstein Barr, virus del herpes simple 6 y 7, virus JC y BK, *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis jirovecii*.

Citomegalovirus

El citomegalovirus humano (CMVH) continúa siendo uno de los microorganismos patógenos más importantes en el trasplante. La enfermedad suele producirse por reactivación de una infección latente, aunque la gravedad de las primoinfecciones es mayor, de ahí la necesidad del cribado serológico de donante y receptor. Si bien la serología es importante para la determinación del estado serológico pretrasplante, su utilidad es muy limitada en el diagnóstico de la infección aguda en los pacientes inmunodeprimidos. El aislamiento en cultivo celular es también de poca ayuda debido al importante retraso en la generación de resultados y su baja sensibilidad.

El CMVH se reactiva en ocasiones sin producir síntomas, por lo que se ha establecido la distinción teórica entre infección activa y enfermedad por CMVH. Esta distinción es clave para la profilaxis, pero también condiciona el diagnóstico. Implica la necesidad de disponer de pruebas que cuantifiquen la carga vírica del CMVH en sangre periférica como un marcador de riesgo, donde la tendencia es más útil que el análisis individualizado, ya que su cuantificación inicial y la cinética de incremento son factores independientes en el riesgo de desarrollar enfermedad por CMVH. Así, la determinación de la carga vírica es una

herramienta diagnóstica clave en el manejo clínico de la enfermedad por CMVH. Para ello debe utilizarse una técnica sensible, cuantificable, rápida y reproducible.

Históricamente, la determinación de la antigenemia pp65-CMVH ha sido la técnica más ampliamente utilizada para este propósito y continúa siendo de gran utilidad en centros con un bajo número de muestras. Sin embargo, el incremento progresivo en el número de muestras a analizar, la interpretación subjetiva que conlleva una pobre estandarización y precisión, la necesidad de procesar las muestras en menos de 6-8 horas después de su obtención, la dificultad de la interpretación en presencia de leucopenia (<1.000 leucocitos/ul) y la importante dedicación en personal, han llevado a la gran mayoría de los laboratorios a la utilización de ensayos de biología molecular, propios o comerciales, para la determinación de la carga vírica de CMVH. En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas de amplificación genética cuantitativa del ADN-CMVH, pero las publicaciones más recientes con estas técnicas no consiguen mejorar los resultados de la antigenemia (1-3).

Los ensayos de cuantificación de la carga vírica mediante técnicas de amplificación de ADN-CMVH, tanto por PCR convencional como en tiempo real, han demostrado ser de gran utilidad en el seguimiento de los pacientes cuando se utilizan protocolos de tratamiento preventivo, de diagnóstico de enfermedad y de seguimiento del tratamiento. Los estudios basados en técnicas de biología molecular han utilizado sangre total o plasma sin que exista variabilidad significativa en los resultados obtenidos. La determinación en plasma es más simple y sus resultados se correlacionan bien con los obtenidos en sangre total.

Para los ensayos de cuantificación de ADN-CMVH no existe un estándar de referencia externo ni programas de control de calidad, siendo muy difícil determinar la variabilidad intra laboratorio, lo que dificulta la comparación de resultados, que tan sólo será posible cuando se disponga de un estándar con unidades internacionales, como ya ocurre con los virus de las hepatitis. Pero además, presentan una significativa variabilidad intra ensayo que no permite discriminar entre niveles de carga vírica de 3 a 5 veces. Las nuevas técnicas de PCR en tiempo real han demostrado poseer menor variabilidad intra e inter ensayo (2). Otro aspecto importante es la falta de un valor umbral concreto que permita predecir el desarrollo de enfermedad y por tanto iniciar el tratamiento preventivo. Hoy por hoy, este valor tiene que establecerlo cada centro en función del riesgo del paciente y de la propia experiencia. Para la PCR cuantitativa el valor umbral puede variar entre 400 y 5.000 copias. Los estudios de historia natural para determinar los niveles de carga vírica predictivos de enfermedad son escasos y deberían establecerse para cada tipo de ensayo y de trasplante. Sin embargo, el riesgo de enfermedad no depende tan sólo del valor umbral, sino también de otros parámetros

de la cinética viral, como el incremento semanal de la carga vírica, para los que todavía no existen datos concluyentes.

Otra importante limitación en la determinación de la viremia es su bajo valor predictivo negativo en la enfermedad localizada por CMVH, particularmente en el tracto gastrointestinal y en el pulmón. Adicionalmente, el valor predictivo positivo de las técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedad localizada en biopsias de tejido o lavado broncoalveolar (4) también es bajo, por lo que debe utilizarse el aislamiento en cultivo o el análisis histopatológico del tejido mediante técnicas inmunohistoquímicas o de hibridación *in situ* para identificar las células infectadas.

La resistencia de CMVH a los fármacos antivíricos es un problema emergente en el trasplante (5). Es posible la realización de secuenciación de UL97, gen responsable de la resistencia a ganciclovir, directamente a partir de las muestras biológicas del paciente y obtener resultados en 24-48 horas, sin que se hayan observado diferencias con los resultados de secuenciación a partir de aislados clínicos (6). Probablemente se obtendrán resultados similares en la secuenciación de UK54, gen de la ADN polimerasa, que contiene las mutaciones de resistencia a cidofovir y foscarnet.

Virus de Epstein-Barr

Más del 90% de la población adulta ha sido infectada por el virus de Epstein-Barr (VEB) y ha desarrollado anticuerpos. El VEB se trasmite fundamentalmente mediante el contacto con las secreciones bucales, pero también hay referencias de transmisión por transfusiones de sangre y trasplante de órganos. Después de la infección primaria, el VEB permanece en los linfocitos B de forma latente. En el control de la infección por el VEB es más importante la inmunidad celular que la humoral, así, si la inmunidad de las células T está afectada como ocurre en los pacientes trasplantados, los linfocitos B infectados por el VEB comienzan a proliferar, pudiendo derivar en una enfermedad linfoproliferativa post-trasplante (ELPPT), que en general tiene mal pronóstico. Aunque la infección por VEB en pacientes trasplantados puede aparecer como una infección primaria, lo más frecuente son las reactivaciones. La mayor incidencia de ELPPT aparece entre el primer y quinto mes postrasplante, con un pico máximo en el tercer mes. Como factores implicados en el desarrollo de la ELPPT se han descrito: el tipo de órgano trasplantado, el tipo, duración e intensidad de la inmunosupresión, la edad del receptor y la seronegatividad frente al VEB previa al trasplante, el tratamiento con sueros antilinfocitarios mono o policlonales tanto en la inducción como en el tratamiento del rechazo agudo, y el “mismatch” para citomegalovirus

entre donante y receptor. A pesar de existir diferentes tratamientos, la mortalidad es muy alta, por lo que el diagnóstico precoz es fundamental en la prevención de la ELPPT (7).

El diagnóstico de la infección por VEB desde el punto de vista microbiológico, está basado fundamentalmente en las pruebas serológicas y en métodos directos moleculares, principalmente mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las técnicas serológicas tienen discreta utilidad diagnóstica en pacientes trasplantados ya que estos pacientes presentan una respuesta serológica deficiente. Únicamente tendría interés antes del trasplante, sobre todo en el caso del trasplante hematológico, conocer el estado serológico tanto del donante como del receptor, ya que el trasplante de un donador seropositivo a un receptor seronegativo es un riesgo para el desarrollo de ELPPT posterior.

Se ha evaluado una gran variedad de procedimientos de PCR para detectar y cuantificar el VEB en muestras clínicas. El mayor inconveniente de estas técnicas es su falta de estandarización. Los datos publicados difieren en el tipo de muestra, el método elegido, la sensibilidad, e incluso en el número de copias utilizado como valor umbral para empezar con un tratamiento anticipado. Respecto al tipo de muestra, tanto el plasma como la sangre total o las células mononucleadas de sangre periférica son muestras adecuadas para la detección de VEB. La sangre total y las células mononucleadas de sangre periférica presentan una sensibilidad similar y existe una buena correlación entre ellas en los valores de carga viral (8). El plasma tiene mayor especificidad que la sangre y las células mononucleadas para el diagnóstico de ELPPT ya que no detecta infección latente. Sin embargo, es menos sensible; así, un incremento en el número de copias aparece más precozmente en sangre total que en plasma y no todos los pacientes con reactivación tienen resultados positivos en plasma. No obstante, el plasma es una muestra útil en la monitorización del tratamiento (9).

La técnica de PCR puede ser cualitativa y cuantitativa. La PCR cualitativa tiene una utilidad bastante limitada ya que sólo es un método de detección y cuando se aplica a sangre total es incapaz de distinguir entre infección activa y latente. Respecto a la PCR cuantitativa, existen varias modalidades, semicuantitativa (10), cuantitativa competitiva (11), o en tiempo real (12). La PCR cuantitativa, a diferencia de la cualitativa, permite la monitorización de la carga viral post-trasplante, la monitorización de la eficacia del tratamiento (9), y puede ser de ayuda en el diagnóstico diferencial de ELPPT y rechazo agudo, que tienen un abordaje terapéutico opuesto (disminución versus incremento de la inmunosupresión) (13). En los últimos años, fundamentalmente en el campo del diagnóstico de la infección en el paciente trasplantado, la PCR en tiempo real está reemplazando a los otros tipos de PCR. La principal ventaja de la PCR en tiempo real es su rapidez, ya que los procesos de amplificación y

detección se realizan simultáneamente, aproximadamente en 1 hora. Otra ventaja muy importante es que al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Además, los sistemas en tiempo real permiten cuantificar la cantidad de ADN viral en la muestra de una manera más sencilla, precisa y en un rango mucho mayor que en los métodos convencionales. Aunque existe un incremento significativo en la carga viral del VEB en el momento del diagnóstico de ELPPT (9), no hay un nivel umbral de ADN viral que pueda predecir la ELPTT (9, 12).

En conclusión, la reactivación del VEB es un hecho frecuente en pacientes trasplantados, especialmente hematológicos. La monitorización seriada de la carga viral en los pacientes con mayor riesgo es fundamental para la predicción de la ELPTT, permitiendo aplicar cuanto antes un tratamiento preventivo y disminuir la incidencia de la enfermedad linfoproliferativa.

Virus del herpes humano 6 y 7 (VHH-6 y VHH-7)

Se consideran virus de distribución universal, que causan infecciones frecuentes en la infancia, se mantienen en estado de latencia y son capaces de reactivarse en situaciones de inmunodepresión, como ocurre después de un trasplante. El modo de transmisión es fundamentalmente a través de la saliva. Tras la infección primaria, el genoma vírico persiste de forma latente en los linfocitos, en las células mononucleadas de sangre periférica, en las células epiteliales de las glándulas salivares y en otros muchos tejidos y órganos. En España, la seroprevalencia en la población adulta es alta, alrededor del 90% para el VHH-6 y del 70% para el VHH-7. La incidencia de la infección por VHH-6 y VHH-7 en pacientes trasplantados tiene una enorme variabilidad, dependiendo fundamentalmente del tipo de trasplante y de la metodología y muestras utilizadas para su diagnóstico (14-16). Las infecciones ocurren típicamente de forma precoz, dentro de las primeras 4 semanas postrasplante, antes que la infección por citomegalovirus. En la mayoría de los casos las infecciones son debidas a la reactivación del virus, aunque también se han descrito casos de primoinfección debidos a la transmisión del virus a partir de transfusiones sanguíneas o del órgano del donante (15). La asociación entre infección activa y sintomatología clínica no está bien establecida. Probablemente, la mayoría de las infecciones cursa de forma asintomática, aunque puede aparecer fiebre, exantema cutáneo, neumonía intersticial, hepatitis, encefalitis y citopenias por supresión medular. Además de estos efectos directos, estos virus pueden dar lugar a efectos indirectos como resultado de la activación de fenómenos inmunológicos o de otros herpesvirus como CMVH, e incluyen fundamentalmente una mayor frecuencia de enfermedad por CMVH, aumento de las infecciones oportunistas, el rechazo y la disfunción del injerto.

El diagnóstico de la infección por VHH-6 y VHH-7 puede realizarse de forma directa mediante el aislamiento del virus, la detección de antígeno en sangre y la detección de ADN vírico, o bien, de forma indirecta mediante la demostración de anticuerpos específicos. La utilización de medios de cultivo para obtener el crecimiento del virus es un método poco utilizado debido a la lentitud en obtener un resultado y a la laboriosidad de la técnica. La determinación de antigenemia en leucocitos de sangre periférica, aunque es una técnica rápida, tiene utilidad limitada debido a la difícil estandarización e interpretación de los resultados; además, en el paciente inmunodeprimido, el número de leucocitos puede estar disminuido y por tanto también la sensibilidad de la prueba. Respecto a la serología, su utilidad prácticamente queda restringida al conocimiento de la seroprevalencia pretrasplante, ya que presenta una serie de inconvenientes: no diferencia la reinfección o reactivación de la infección latente, en la mayoría de las veces en el paciente inmunodeprimido no hay respuesta inmunológica detectable, y puede existir reactividad cruzada en la respuesta de anticuerpos frente a antígenos comunes del VHH-6 y VHH-7.

Por todo lo comentado anteriormente, las técnicas de detección de ADN mediante PCR son las ideales para el estudio de la infección por VHH-6 y VHH-7 en pacientes trasplantados. Entre sus ventajas se encuentra la rapidez del diagnóstico, el empleo de muestras no invasivas, su elevada sensibilidad y la posibilidad de monitorizar la carga vírica. Debido a que estos virus permanecen latentes en una proporción elevada de la población, es imprescindible que estas técnicas diferencien entre infección latente y activa. La detección de ADN en orina o saliva puede reflejar infección latente y por tanto sobreestimar la incidencia de infección activa. La detección de ADN viral en muestras acelulares como el plasma y líquido cefalorraquídeo (LCR) indica que existe infección activa (17). Así, la presencia de ADN viral en LCR ha sido asociada a encefalitis en ausencia de otra etiología (18). El significado de la detección de ADN viral en el lavado broncoalveolar en los pacientes inmunodeprimidos con neumonía intersticial no está claro (19). Cuando se detecta virus en sangre total o células mononucleares en sangre periférica hay que ser muy cauteloso en la interpretación de los resultados, ya que se puede detectar infección latente. Por tanto, estas muestras no serán útiles a menos que se utilice una PCR cuantitativa.

Existe una gran variedad de procedimientos de PCR. La PCR cualitativa en cualquiera de sus modalidades, técnicas anidadas con detección en gel de agarosa, hibridación con sonda e incluso la novedosa técnica de los microarrays (20), sólo permite la detección, de uno o más virus. Sin embargo, en el paciente trasplantado es imprescindible realizar una monitorización seriada de la carga vírica para conocer el verdadero significado de dicha detección. En los

últimos años, el desarrollo de técnicas de detección cuantitativa por PCR en tiempo real, utilizando diversas tecnologías (LightCycler, Taqman) (21), ha permitido mejorar realmente el manejo del paciente trasplantado. El estudio de la carga viral permite realizar la monitorización de los niveles de ADN prediciendo la evolución de la infección y la respuesta al tratamiento. En la actualidad, se dispone de PCR múltiples que de manera cualitativa o cuantitativa pueden detectar simultáneamente varios virus, como por ejemplo VHH-6 y VHH-7; las dos variantes de VHH-6; VHH-6, VHH-7, VHH-8 y CMVH (22). La detección de varios virus de manera simultánea es de gran interés en el postrasplante, ya que se han descrito interacciones entre miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* (23). Sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan crear guías y recomendaciones que ayuden a los microbiólogos en la estandarización de las técnicas y al clínico en la utilización correcta de los resultados obtenidos.

Virus BK y JC

Los virus BK (VBK, *Polyomavirus hominis* 1) y JC (VJC, *Polyomavirus hominis* 2) infectan naturalmente a los humanos de forma muy prevalente en la población mundial (35-85%). La infección por ambos virus suele producirse de forma subclínica en la primera infancia y persiste de por vida de forma asintomática. La actividad viral aumenta en gran medida en situaciones de inmunodepresión, llegando a causar enfermedades renales (VBK) y del sistema nervioso central (SNC) por VJC. Otros *Polyomavirus* (PV) que pueden infectar a humanos son los virus KI y WU, recientemente descritos en infecciones respiratorias, y el virus de simios SV40. A los 5-8 años de edad el 70% de la población ha seroconvertido para los virus JC y BK. La infección primaria es asintomática o leve, aunque se han descrito casos aislados graves. La latencia se realiza en células epiteliales del endotelio urinario y renal (VBK y VJC) con excreción esporádica de virus por orina (5-15% para el VBK y 5-40% para el VJC en inmunocompetentes (24). El VJC puede persistir además en linfocitos B de médula ósea, desde donde puede diseminarse al SNC.

El VBK causa nefropatía asociada a poliomavirus (NPV) en receptores de trasplante renal, raramente en receptores de otros órganos. La NPV puede conducir a disfunción e incluso a pérdida del injerto (10% a >80%) (25,26) y, por otra parte, puede ser difícil de distinguir del rechazo. En un subgrupo de pacientes con NPV se ha observado coinfección por VBK y VJC, y en raras ocasiones coinfección por VBK y SV40; en ambos casos el papel etiológico del virus coinfectante resta por definir. También ha sido descrita para VJC en solitario (<3%), aunque con menor virulencia ya que en ninguno de estos pacientes se perdió el injerto (27). La NPV es más frecuente durante el primer año postrasplante. El VBK puede

causar además hematuria asintomática, cistitis hemorrágica (CH) y estenosis ureteral en pacientes trasplantados de médula ósea y de órgano sólido. El VJC es el agente causal de la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una enfermedad grave, bastante rara antes de la pandemia de VIH-1. El 80% de los casos se observan en pacientes seropositivos para VIH-1 con deterioro de su inmunidad celular; el resto son pacientes con enfermedades linfoproliferativas y receptores de trasplante con intensa terapia inmunodepresora.

En el diagnóstico de NPV por VBK, dado que la infección activa con replicación viral es el único factor común en los trasplantados renales con NPV y que precede a la enfermedad, se ha postulado el cribado periódico de los pacientes mediante diversas pruebas de laboratorio para el diagnóstico precoz que permita la intervención clínica con el fin de conseguir una menor pérdida de injertos (25,26). Las pruebas de cribado son negativas en el 60-80 % de los pacientes trasplantados renales (25), siendo su valor predictivo negativo >99%, por lo que una prueba negativa prácticamente excluye la enfermedad. Las técnicas de cribado que han demostrado mayor precocidad y utilidad clínica son la citología urinaria y las pruebas de detección de ácidos nucleicos en orina o en plasma, aunque también se puede demostrar la actividad viral por cultivo o microscopía electrónica. La viruria precede a la viremia en una media de cuatro semanas y en una media de 12 semanas a la NPV (25). Una prueba de cribado positiva debe repetirse a las 2-4 semanas y, si persiste, ha de ser confirmada por PCR en plasma y/o examen de biopsia renal. El cultivo celular convencional es poco práctico, dado que el crecimiento del VBK es lento y su efecto citopático poco prominente (26); la centrifugación-cultivo (*shell-vial*), aunque más rápida, tampoco se ha utilizado en la práctica. La microscopía electrónica de orina, aunque específica de PV, es poco factible en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica y no permite la cuantificación. La citología urinaria requiere procesar la muestra antes que degenera la morfología celular. Las extensiones se observan en contraste de fases o con tinción de Papanicolau para detectar las células del epitelio transicional infectadas, con el núcleo agrandado e inclusiones intranucleares basofílicas (*decoy cells*), siendo su sensibilidad de 100%, con valor predictivo negativo de 100% y positivo de 30%. La citología no permite diferenciar entre los distintos PV y existe la potencial confusión con adenovirus, CMVH o células malignas; puede ser realizada de forma semicuantitativa: un punto de corte de >10 *decoy cells*/preparación en presencia de células inflamatorias, aumentaría la especificidad (25,26).

La orina destinada a la realización de las pruebas de amplificación genética puede ser utilizada sin ningún procesamiento previo. No obstante, es preciso tener en cuenta que la cuantificación puede variar por fluctuaciones en la concentración de la orina, o también si se

utiliza la orina simplemente resuspendida, el sobrenadante de orina centrifugada, o el sedimento urinario (3); no existe un consenso al respecto aunque es obvio que cada laboratorio debe estandarizar el procesamiento de la muestra. Siempre que se trabaje con métodos moleculares deberá conservarse la muestra congelada, en especial si se va a realizar cuantificación de ARNm. La excreción urinaria de VBK, aunque poco común en inmunocompetentes, es muy frecuente en trasplantados (10-45% en los de riñón y >50% en los de médula ósea) (26). La mayoría de los estudios utilizan PCR para amplificar el ADN genómico del VBK en orina ya sea de forma cualitativa o cuantitativa. Por su elevada sensibilidad, las pruebas cualitativas, sobre todo si se utiliza PCR anidada, obligan a realizar pruebas de confirmación en muchas ocasiones, para lo que se ha propuesto que se realicen de forma semicuantitativa, usando como umbral la dilución 10^6 de la orina con un técnica de PCR cuya sensibilidad esté en 1-10 copias/mL.

La PCR cuantitativa realizada mediante PCR en tiempo real correlaciona con la NPV, y niveles mantenidos por encima de 10^7 copias/mL orina durante más de tres semanas se asocian a NPV (25,26). La cuantificación de ARNm de VP1 (gen tardío) es solo posible si existen células infectadas de forma activa, siendo el umbral propuesto en orina para correlación con NPV de $\geq 6,5 \times 10^5$ copias ARNm/ng de ARN total (25,26). La viremia detectada por PCR correlaciona mejor con la NPV, aunque es menos precoz que la viruria. Niveles mantenidos por encima de 10^4 copias/mL plasma durante más de tres semanas se asocian a NPV con una sensibilidad cercana al 100% y una especificidad del 90% aproximadamente, siendo los valores predictivos negativo y positivo de 100% y 50% respectivamente.

Se han descrito raros casos de NPV con viremia negativa pero viruria positiva posiblemente debidos al uso de una técnica de PCR ineficiente o al uso de cebadores inadecuados para la cepa viral. En otros casos persiste un nivel de viremia bajo con biopsia negativa para NPV. En estas ocasiones sería recomendable monitorizar de cerca los niveles de viremia y si se cree conveniente, repetir la biopsia. Plasma (EDTA) o suero pueden utilizarse para la determinación de la viremia. No obstante, es recomendable utilizar siempre el mismo tipo de muestra para el seguimiento de los pacientes. Para las técnicas de PCR, tanto en sangre como en orina, es preciso descartar la presencia de inhibidores mediante el uso de controles internos o por amplificación de un gen humano en el mismo extracto de la muestra. Es necesario desarrollar estándares internacionales para establecer la reproducibilidad y validez de los resultados. Un panel internacional de expertos (25) ha recomendado el cribado de todos los trasplantados renales cada 3 meses durante los dos primeros años postrasplante y

anualmente hasta el 5º año. Además siempre que se observe disfunción del injerto con elevación de los niveles de creatinina y siempre que se realice biopsia del injerto por cualquier motivo deberían realizarse pruebas de cribado para VBK (25,26). El coste/beneficio de esta estrategia debe valorarse en cada centro dependiendo de la prevalencia de NPV observada.

El examen histológico e inmunohistoquímico de la biopsia renal sigue siendo necesario para el diagnóstico definitivo de NPV (25,26). El diagnóstico diferencial debe hacerse con el rechazo, cuyo tratamiento es la administración de inmunodepresores. Por el contrario, la NPV se trata con la reducción de éstos combinada con la vigilancia activa frente al rechazo. Los cambios citopáticos causados por el virus son los que permiten la diferenciación con el rechazo, aunque rechazo y NPV se pueden presentar de forma concomitante. Por otra parte, la NPV puede ser focal, por lo que se postula el examen de dos cores. De todas formas, un resultado negativo en la biopsia no excluye totalmente la NPV y no se descarta la repetición de la misma si persisten niveles de ADN por encima del umbral. Durante la reducción del tratamiento inmunodepresor debe monitorizarse el ADN de PV en plasma y orina cada 2-4 semanas (disminución $>2 \log_{10}$ en 8-12 semanas) (25). A pesar del cribado activo algunos pacientes pueden perder el injerto a causa de NPV. El trasplante es posible pero la recurrencia de NPV es más elevada (15%). Por este motivo es recomendable esperar a la negativización de la replicación viral antes del trasplante (25).

Respecto a la CH por VBK, un 77-90% de los pacientes adultos trasplantados de médula ósea excretan VBK en orina, en muchos casos sin CH (28); en niños alrededor del 60%. La CH con >7 días de duración que se inicia en las 2-12 semanas postrasplante se ha asociado con viruria por VBK (26). Otras causas de CH son la toxicidad a fármacos (radioterapia, quimioterapia) o infecciones víricas (adenovirus o CMVH). La cuantificación en orina del VBK muestra correlación con la CH aunque no se han podido establecer unos valores umbral porque las variaciones individuales son muy pronunciadas. De todas formas, los pacientes con CH tienen unos valores máximos de viruria superiores (media 6×10^{12} copias/mL) que los pacientes sin CH ($5,7 \times 10^7$ c/mL), por lo que se ha propuesto un umbral de 10^{10} c/mL, aunque no todos los pacientes que superan este umbral desarrollan CH. La viremia también se ha correlacionado con CH, siendo el umbral propuesto 10^4 c/mL de plasma para riesgo de sufrir CH por VBK (28).

El diagnóstico de LMP por VJC es inicialmente clínico y radiológico (resonancia magnética o tomografía computerizada). La confirmación de laboratorio puede hacerse por el examen histopatológico de biopsia de las lesiones o, de forma menos invasiva, por la detección del ADN de VJC en LCR. El LCR obtenido por punción lumbar en los pacientes

con sospecha de LMP deberá ser conservado congelado en alícuotas hasta el momento de su procesamiento. La PCR cualitativa o cuantitativa son los métodos más utilizados. En el caso del LCR la cuantificación es de una importancia relativa, siendo más necesario obtener la máxima sensibilidad de la prueba. Por otra parte, en los pocos casos de NPV atribuidos en exclusiva al VJC, la cuantificación de la carga viral puede ser de importancia, dada la mayor frecuencia de excreción de VJC en inmunocompetentes. Los umbrales propuestos son similares a los del VBK: 10^7 copias/mL en orina y 10^4 c/mL en plasma (27).

Toxoplasma gondii

La toxoplasmosis es una infección endémica, de distribución mundial, causada por *Toxoplasma gondii*, protozoo intracelular obligado del orden *Coccidia*, phylum *Apicomplexa*. La infección en el hombre se adquiere por vía oral (ingestión de agua o alimentos contaminados con ooquistes, o de carne poco cocinada que contenga quistes titulares), por vía transplacentaria, siendo también posible la transmisión a través de órganos de donantes seropositivos a receptores seronegativos. En los pacientes inmunodeprimidos, como aquellos con SIDA, trasplantados y pacientes con inmunosupresión por neoplasia, la enfermedad es consecuencia de la reactivación de una infección latente. La toxoplasmosis en estos pacientes evoluciona muy rápidamente y tiene morbi-mortalidad elevada (29).

Hasta la aparición de las técnicas de biología molecular, el diagnóstico etiológico de la toxoplasmosis se ha realizado, casi exclusivamente, mediante serología. Sin embargo, si el paciente presenta una afectación inmunológica, la serología puede fallar o dar resultados equívocos. El principal problema de la PCR en el diagnóstico de la toxoplasmosis es la falta de protocolos estandarizados. Se han empleado varios tipos de PCR (29-33): la PCR convencional (*nested* y *seminested* PCR), PCR en tiempo real y PCR seguida de oligocromatografía. Así mismo, se han usado varios genes (30) de *T. gondii* como diana de amplificación. El más empleado es el gen *B1*, con 35 copias en el genoma, siendo otros: el gen *P30*, gen unicopia que codifica el antígeno mayor de superficie; el gen ARNr que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosómico, con 110 copias en el genoma; el fragmento de 529 pb con 300 copias por genoma; los genes unicopia α -tubulina y β -tubulina, y un fragmento repetitivo de ADN, no codificante, el TGR1E. Respecto al tipo de muestra utilizada en pacientes inmunodeprimidos, se ha demostrado la utilidad del LCR, lavado broncoalveolar (LBA), humor vítreo y acuoso, líquido pleural y peritoneal, aspirado de médula ósea, sangre periférica y tejidos afectados.

La encefalitis por *Toxoplasma* (31) es la infección oportunista del sistema nervioso central más frecuente en pacientes inmunodeprimidos, siendo la enfermedad diagnóstica de

SIDA en el 6,4% de los casos nuevos en nuestro país. Hasta la aparición de la PCR, la biopsia cerebral era la muestra en la que se efectuaba el diagnóstico de confirmación. En la actualidad, se confirma el diagnóstico mediante PCR en sangre o LCR, lo que evita la morbi-mortalidad intraoperatoria de la toma de biopsia. La sensibilidad de la PCR en sangre varía entre 16% y 86%, según el tipo de ensayo utilizado. En LCR, la sensibilidad también es muy variable, entre 17% y 100%. Para ambas muestras la sensibilidad de las técnicas disminuye drásticamente si el paciente ha recibido previamente tratamiento antitoxoplasma. Sin embargo, la quimioprofilaxis no parece afectar a los resultados. La especificidad en todos los estudios es del 100%. A pesar de la variable sensibilidad, la elevada especificidad y elevado valor predictivo positivo, hacen de la PCR una técnica muy útil en el diagnóstico de las lesiones cerebrales focales en pacientes inmunodeprimidos cuando existe sospecha clínica y radiológica.

La forma de toxoplasmosis extracerebral más frecuente en pacientes inmunodeprimidos es la pulmonar. La detección de *T. gondii* en LBA, en los casos pulmonares, mediante PCR, tiene una sensibilidad y especificidad del 100%, independientemente de la técnica utilizada, mientras que en sangre la sensibilidad disminuye al 75%. En el diagnóstico de la forma diseminada, la PCR en sangre tiene una sensibilidad y especificidad del 100% (30). En la toxoplasmosis ocular, la detección de ADN del parásito en el humor acuoso es menos sensible que la detección local de anticuerpos, y la PCR tiene una sensibilidad entre 18% y 37%. Sin embargo, cuando el diagnóstico se realiza en humor vítreo la sensibilidad es del 100% (31).

Por tanto, podemos concluir que, a pesar de la falta de estandarización de los métodos de diagnóstico molecular de toxoplasmosis, deben ser considerados para complementar o confirmar el diagnóstico clínico, radiológico y serológico en los pacientes inmunodeprimidos, además de ser útiles en el seguimiento de la evolución del paciente con toxoplasmosis, o con riesgo de padecerla.

Pneumocystis jirovecii

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, antes *P. carinii*, (PcP), sigue siendo una importante causa de morbi-mortalidad en los pacientes VIH-positivos y en inmunodeprimidos por otras causas, a pesar del descenso observado tras la introducción de la profilaxis frente a *Pneumocystis*, y la terapia antirretroviral combinada (c-ART) (34). En los últimos 15 años, el uso de las técnicas moleculares ha aportado una valiosa información sobre la genética de *Pneumocystis*, facilitando la comprensión de la biología del organismo y la epidemiología de la infección en humanos. El impacto de los estudios moleculares ha tenido especial

importancia en el conocimiento de su taxonomía, hoy reclasificado como un hongo, así como en el del reservorio de la enfermedad y la fuente de la infección, habiéndose determinado que el hombre es el reservorio de *P. jirovecii*, que la transmisión es persona a persona, a través de aerosoles, y que presumiblemente es colonizado transitoriamente a lo largo de la vida (34).

En la actualidad, el diagnóstico en LBA mediante la tinción de plata-metenamina de Gomori, está considerado la técnica de referencia. Sin embargo, los métodos moleculares han revolucionado el diagnóstico. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica muy sensible, y permite la detección de *P. jirovecii* incluso cuando se encuentra en número tan bajo que la tinción es incapaz de demostrar. Puede también determinar su presencia en pacientes sin manifestaciones clínicas, definiendo el estado de portador o colonizado asintomático. Así mismo, permite la utilización de muestras no invasivas para la detección de *P. jirovecii*, como los enjuagues orales o el esputo simple, evitando la realización de técnicas agresivas para el paciente.

Aproximadamente se han estudiado (34) unos 15 genes de *Pneumocystis* con diferentes objetivos, incluyendo el diagnóstico, el estudio de los patrones de transmisión, la severidad de la infección, y el fracaso del tratamiento y de la profilaxis. El primer gen que se identificó y evaluó para uso diagnóstico, fue el que codifica la subunidad del ARN ribosómico grande (mtLSU rRNA). Otro de los genes mitocondriales estudiados es el que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosómico (mtSSU rRNA). El tercero estudiado es el gen del citocromo b mitocondrial. Respecto a los genes nucleares, ITS1 e ITS2 (espaciador interno de transcripción 1 y 2 del ARN ribosómico) son los más utilizados. Entre los genes que codifican dianas específicas de fármacos, dos han sido estudiados en los últimos años, por su implicación con la resistencia emergente a las drogas anti-*Pneumocystis*: el gen de la *Dihidrofolato reductasa* (DHFR) y el de la *Dihidropteroato sintetasa* (DHPS). Ambos genes codifican enzimas claves en el metabolismo del ácido fólico. La combinación de trimetoprim (TMP) y sulfametoxazol (SMX), cotrimoxazol, es de elección en el tratamiento y profilaxis de la PcP, aunque parece que tan sólo el SMX tiene actividad anti-*Pneumocystis*. La DHFR es el sitio activo del TMP y la DHPS del SMX. El uso prolongado del TMP-SMX, tanto para profilaxis como para tratamiento, ha ejercido una gran presión sobre la DHPS, determinando la aparición de mutaciones en dicho gen, que se han asociado a resistencia a las sulfamidas (35). Por último, la glucoproteína mayor de superficie (MSG), es la principal proteína antigénica de la superficie de la membrana de todas las especies de *Pneumocystis*. Desempeña un importante papel en la adherencia del organismo a las células del epitelio alveolar. La MSG está codificada por una familia de genes multicopia. Con el cambio de expresión de

MSG, el organismo cambia los antígenos de superficie, escapando de la respuesta inmune del huésped. Existen estudios preliminares del multilocus de la MSG que se han utilizado para discernir entre el cuadro clínico de PcP y el estado de portador de *Pneumocystis* (34).

Diferentes técnicas de PCR, PCR convencional, nested PCR y PCR en-tiempo real, han sido utilizadas en el diagnóstico de PcP, en LBA, esputo inducido y enjuagues orales. Los valores de sensibilidad oscilan entre 84% y 100%, y los de especificidad entre 58% y 100% para LBA, según la técnica utilizada (36). En la actualidad hay publicados diversos trabajos (37,38) que han comparado la sensibilidad y especificidad de los enjuagues orales, frente al LBA, para el diagnóstico de la PcP mediante PCR convencional, presentando unos valores de 90% y 95% para los enjuagues orales, y 100% y 90% para LBA, respectivamente. Dada la rentabilidad de los enjuagues orales en el diagnóstico de la PcP mediante PCR convencional, podría utilizarse esta muestra no invasiva en el diagnóstico de rutina con PCR en tiempo real. Hasta el momento sólo hay publicado un estudio (38) que ha usado los enjuagues orales en el diagnóstico de la PcP mediante PCR en tiempo real. Los valores de sensibilidad y especificidad fueron de 88% y 85%, respectivamente.

Bibliografía

1. Lengerke C, Ljubicic T, Meisner C, Loeffler J, Sinzger G, Einsele H, *et al.* Evaluation of the COBAS Amplicor HCMV Monitor for early detection and monitoring of human cytomegalovirus infection after allogenic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2006; 38: 53–60.
2. Alice T, Enrietto M, Pittaluga F, Varetto S, Franchello A, Colucci G, *et al.* Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood specimens of patients with solid organ transplants: comparison with end-point PCR and pp65 antigen test. *J Med Virol* 2006; 78:915–22.
3. Pumannova M, Roubalova K, Vitek A, Sajdova J. Comparison of quantitative competitive polymerase chain reaction–enzyme-linked immunosorbent assay with LightCycler-based polymerase chain reaction for measuring cytomegalovirus DNA in patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 54:115–20.
4. Chemaly RF, Yen-Lieberman B, Chapman J, Reilly A, Bekele BN, Gordon SM *et al.* Clinical utility of cytomegalovirus viral load in bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. *Am J Transplant* 2005; 5: 544–48.
5. Chou S, Lurain NS, Thompson KD, Miner RC, Drew WL. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J Infect Dis* 2003; 188: 32–9.

6. Jabs DA, Martin BK, Ricks MO, Forman MS. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance study group. Detection of ganciclovir resistance in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis: correlation of genotypic methods with viral phenotype and clinical outcome. *J Infect Dis* 2006; 193: 1728–37.
7. Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, Kieff E, Green M, Gores G, *et al* Epstein Barr virus-induced post-transplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD task force and the Mayo clinic organized international consensus development meeting. *Transplantation* 1999; 68: 1517-25.
8. Hakim H, Gibson C, Pan j, Srivastava K, Gu Z, Bankowki MJ, *et al*. Comparison of various blood compartments and reporting units for detection and quantification of Epstein-Barr virus in peripheral blood. *J Clin Microb* 2007; 45: 2151-55.
9. Meerbach A, Wutzler P, Häfer R, Zintl F, Gruhn B. Monitoring of Epstein-Barr virus load after hematopoietic stem cell transplantation for early intervention in post-transplant lymphoproliferative disease. *J Med Virol* 2008; 80: 441-54.
10. Fellner MD, Durand K, Correa M, Bes D, Alonso LV, Teyssié AR, *et al*. A semiquantitative PCR method (SQ-PCR) to measure Epstein-Barr virus load: its application in trasplant patients. *J Clin Virol* 2003; 28: 323-30.
11. Gärtner BC, Schäfer H, Marggraff K, Eisele G, Schäfer M, Dilloo D, *et al*. Evaluation of use of Epstein-Barr viral load in patients after allogeneic stem cell transplantation to diagnose and monitor posttransplant lymphoproliferative disease. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 351-58.
12. Yancoski J, Danielian S, Ibanez J, Turconi A, Cuarterolo M, Zelazko M, *et al*. Quantification of Epstein-Barr virus load in Argentinean transplant recipients using real-time PCR. *J Clin Virol* 2004; 31: 58-65.
13. Van Esser J W, Niesters HG, van der Holt E, Meijer E, Osterhaus AD, Gratama JW, *et al*. Prevention of Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogenic stem cell transplantation. *Blood* 2002; 99: 4364-69.
14. Cervera C, Marcos MA, Linares L, Roig E, Benito N, Pumarola T, *et al*. A prospective survey of human herpesvirus-6 primary infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2006; 82: 979-84.
15. Anton A, Cervera C, Pumarola T, Moreno A, Benito N, Linares L, *et al*. Human herpesvirus 7 primary infection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2008; 85: 298-02.

16. Dockrell DH and Paya CV. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev Med Virol* 2001; 11: 23-36.
17. Zerr DM, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nquy L, Boeckh M, *et al.* Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2005; 40: 932-40.
18. Bouvin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes* 2004; 11 (S11): 48A-56A.
19. Nagate A, Ohyashiki JH, Kasuga I, Minemura K, Abe K, Yamamoto K, *et al.* Detection and quantification of human herpesvirus 6 genome using bronchoalveolar lavage fluid in immunocompromised patients with interstitial pneumonia. *Int J Mol Med* 2001; 8: 379-83.
20. Földes-Papp Z, Egerer R, Birch-Hirschfeld E, Striebel HM, Demel U, Tilz GP, *et al.* Detection of multiple human herpes viruses by DNA microarray technology. *Mol Diagn* 2004; 8: 1-9.
21. Stöcher M, Hölzl G, Stekel H, Berg J. Automated detection of five human herpes virus DNAs by a set of LightCycler PCRs complemented with a single multiple internal control. *J Clin Virol* 2004; 29: 171-78.
22. Deback C, Agbalika F, Scieux C, Marcelin AG, Gautheret-Dejean A, Cherot J, *et al.* Detection of herpesvirus HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in whole blood by real-time PCR using the new CMV, HHV-6, 7, 8 R-gene kit. *J Virol Methods* 2008; 149: 285-91.
23. Kidd IM, Clark DA, Sabin CA, Andrew D, Hassan-Walker F, Sweny P, *et al.* Prospective study of human betaherpesviruses after renal transplantation: association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co-infection with cytomegalovirus disease and increased rejection. *Transplantation* 2000; 69:2400-04.
24. Polo C, Pérez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubò J, Tenorio A. Prevalence and patterns of polyomavirus excretion in immunocompetent adults and children. *Clin Microbiol Infect.* 2005; 10: 640-44.
25. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri G, Gordon J, Limaye AP, *et al.* Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation* 2005; 79:1277-86.
26. Ferreira-González A, Sidiqi R. BK virus in the transplant patient. *Clinical Microbiology Newsletter* 2007;29:121-28.
27. Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Munivenkatappa R, *et al.* Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation* 2007; 84: 323-30.

28. Priftakis P, Bogdanovic G, Kokhaei P, Mellstedt H, Dalianis T. BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis, although wide individual variations exist. *J Clin Virol* 2003;26:71-7.
29. Edvinsson, B. Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. Dissertations from Karolinska Institutet. 2006; <http://diss.kib.ki.se/2006/91-7140-877-0/>
30. Montoya, J.G. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis* 2002;185 Suppl 1:S73-S82.
31. Bastien, P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96 Suppl 1: S205-S215.
32. Remington, J.S., Thulliez, P., & Montoya, J.G. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol* 2004;42:941-5.
33. Switaj, K., Master, A., Skrzypczak, M., & Zaborowski, P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microb Infect* 2005; 11:170-6.
34. Beard, C.B. Molecular typing and epidemiological insights. *In: Walzer PD & Cushion MT. Pneumocystis pneumonia*. Marcel Dekkers eds. 2005; p. 479-504.
35. Alvarez-Martínez, M.J., Moreno, A., Miró, J.M., Valls ME, Rivas PV, de Lazzari E, *et al.* *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Spanish HIV-Infected Patients in the Combined Antiretroviral Therapy Era: Prevalence of DHPS Mutations and Prognostic Factors of Mortality. *Diag Microb Infec Dis* 2008 June 11, [Epub ahead of print].
36. Alvarez-Martínez, M.J., Miró, J.M., Valls, M.E., Moreno A, Rivas PV, Solé M, *et al.* Sensitivity and Specificity of Nested and Real-time PCR in the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diag Microb Infec Dis* 2006;56: 153-160.
37. Helweg-Larsen, J. J. S., Jensen, Benfield, T., Svendsen, U. G., Lundgren, J. D., & Lundgren, B. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2068-72.
38. Larsen, H. H., Masur, H., Kovacs JA, Gill VJ, Silcott VA, Kogulan P, *et al.* Development and evaluation of Quantitative, Touch-Down Real-Time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 490-4.

RESUMEN DE LAS COMUNICACIONES A CONGRESOS.**1. Low prevalence of *Pneumocystis jiroveci* Dihydropteroate Synthase (DHPS) mutations in Spanish HIV-1 infected patients with *P. jiroveci* Pneumonia.**

Background: There are no data on the prevalence of *P. jiroveci* DHPS mutations in Spanish HIV-1 infected patients with *P. jiroveci* Pneumonia (PCP).

Methods: Prospective, multicenter, longitudinal study that enrolled consecutive HIV-1 infected patients with PCP from 10 Spanish hospitals during 2001-2003. Diagnosis of *P. jiroveci* was made following methenamine silver stain in respiratory samples either from bronchoalveolar lavage (BAL) or induced sputum. Samples were alcohol-fixed on unstained slides or frozen as aliquots. The *P. jiroveci* DHPS locus was amplified with a modified nested PCR procedure. Resulting amplicon sequences were compared to the *P. jiroveci* DHPS consensus sequence. Clinicians were blinded to laboratory results.

Results: We successfully genotyped the *P. jiroveci* DHPS gene from 91 out of 95 (96%) HIV-1 infected patients with PCP. Of these, 73% of cases were male with a mean age was 42 (28-55) years. HIV-1 risk factors included drug use (34%), homosexuality (13%) and heterosexuality (39%). HIV-1 infection and PCP were diagnosed together in 44% of cases. The mean (range) CD4 cell count and plasma RNA HIV-1 viral load were 39 (1-219) cells/mm³ and 5.6 (3.3-6.0) log₁₀/mL, respectively. Rates of ICU admission, mechanical ventilation requirement and crude mortality were 17%, 8.5% and 13%, respectively. Only 27% of all cases received TMP-SMZ prophylaxis. Five patients (5%) had mutations in the *P. jiroveci* DHPS gene. All presented single mutations, two at position 55 (Thr-Ala, one mixed infection) and three at position 57 (Pro-Ala). Four of these patients had previously received TMP-SMZ prophylaxis. All patients were cured, two with i.v. pentamidine and three with TMP-SMZ. One TMP-SMZ treated patient had a new PCP episode eight months after initial treatment. The remaining cases were alive six months after the PCP episode.

Conclusions: The low *P. jiroveci* DHPS mutation rate was probably due to the fact that few patients underwent previous TMP-SMZ prophylaxis. None of the patients infected with DHPS mutant *P. jiroveci* died.

2. Mutations in the *Pneumocystis jiroveci* Dihydropteroate Synthase Gene in Spanish HIV-1-infected Patients.

Background: Mutations in the *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase (DHPS) gene have been associated with prophylaxis failure. However, it is controversial whether these mutations are associated with poor outcome. We investigated, in Spanish HIV-1-infected *Pneumocystis carinii* pneumonia (PCP) patients, if DHPS mutations are associated with a poor outcome and whether the prevalence of mutations changed after the introduction of HAART.

Methods: We studied consecutive PCP episodes in HIV-1-infected patients from a single institution in Spain during the pre-HAART (1989-1995) and HAART (2001-2004) periods. Diagnosis of *P. jiroveci* was made by Gomori, Giemsa, or Papanicolaou stains in respiratory samples either from bronchoalveolar lavage or induced sputum. The *P. jiroveci* DHPS locus was amplified by nested PCR and sequenced. Clinicians were blinded to laboratory results. We compared the presence of mutations at the DHPS gene with survival, relapses and response to anti-PCP drugs.

Results: We successfully genotyped the *P. jiroveci* DHPS gene from 43 of 110 (39%) pre-HAART patients and from 60 of 63 (95%) HAART patients, of which 17 (16.5%) had mutations in the *P. jiroveci* DHPS gene (14 [33%] in the pre-HAART period vs 3 [6%] in the HAART period; $p = 0.001$). The pre-HAART group had 5 single (3 T55A, 2 P57S) and 9 double mutations; the HAART group, 2 single and 1 double mutations. Patients with DHPS mutations had similar median age (40 years vs 36), gender (male 76% vs 79%) and median CD4 cell counts (13 cells/mm³ vs 25) than those with a wild type genotype. Patients with mutations were more likely to be homosexual (47% vs 17%, $p = 0.03$), to have previous AIDS criteria (53% vs 25%, $p = 0.02$), previous PCP episodes (24% vs 6%, $p = 0.03$), to be ART-experienced (71% vs 34%, $p = 0.006$) and to be on TMP-SMZ or dapsona/pyrimethamine prophylaxis (59% vs 23%, $p = 0.005$). Overall, 95% of patients were treated with TMP-SMZ. In-hospital mortality (6% vs 10%, $p = 0.57$) and 3-month (13% vs 10%, $p = 0.80$) and 6-month (19% vs 16%, $p = 0.75$) mortality ratios were low and similar in both groups. There were only 3 relapses (6%) at 6 months in the group of patients with wild type genotypes ($p = 0.37$).

Conclusions: Mutations in the DHPS gene were higher in the pre-HAART period and were associated with previous exposure to sulfa drugs. However, their presence did not worsen the prognosis of PCP. Response to TMP-SMZ was successful in most cases.

3. Diagnóstico de la neumonía de por *Pneumocystis jiroveci* en pacientes VIH-1 mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Introducción: A pesar de que la incidencia de la neumonía por *Pneumocystis jiroveci* (PcP) ha disminuido con el uso de la profilaxis con cotrimoxazol y el tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA), sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes infectados con el VIH-1. El diagnóstico de *P. jiroveci* se realiza mediante tinciones específicas en esputo inducido (EI) y/o lavado broncoalveolar (LBA).

Objetivo: Desarrollo de un nuevo método diagnóstico de *P. jiroveci* mediante PCR a tiempo real que permita su cuantificación en las muestras respiratorias (EI o LBA).

Material y métodos: El gen de la dihidropteroato sintetasa (DHPS) de *P. jiroveci* fue clonado en un vector pCR 2.1. propagado en la cepa BL21 de *E. coli* y purificado. Se utilizaron diluciones seriadas del plásmido ($1, 88 \times 10^{-2}$ a $1,88 \times 10^{10}$) como estándar de la cuantificación. Se diseñaron cebadores específicos (DHPS_F y DHPS_R), y una sonda, con el fluorocromo VIC en 5' y TAMRA en 3'. Se incluyeron en el estudio 71 muestras de EI o LBA de pacientes VIH-1 con PCP confirmada microscópicamente, así como 70 EI o LBA con microscopía negativa. Se usaron como controles negativos ADN de *P. falciparum* y agua. Las amplificaciones se realizaron por duplicado en un sistema de detección ABI Prism 7000, con un volumen final de 25 μ l y un programa de 45 ciclos.

Resultados: En 67 de las 71 muestras microscópicamente positivas se detectó *P. jiroveci* mediante PCR a tiempo real. Las muestras fueron consideradas positivas si su Ct (ciclo en el cual la fluorescencia pasa un umbral definido) estaba comprendido entre 23 y 42 ciclos; correspondiendo entre $1,8 \times 10^4$ y $1,8 \times 10^{-1}$ copias de DHPS por μ l de muestra clínica. 67 de las 70 muestras microscópicamente negativas fueron diagnosticadas de negativas, con concentraciones de DHPS por μ l de muestra indetectables o inferiores a $1,8 \times 10^{-1}$. Los valores de S, E, VPP y VPN fueron de 95%, 96%, 96% y 95% respectivamente.

Conclusiones: La PCR cuantitativa a tiempo real presenta una fiabilidad diagnóstica muy próxima a la microscopía utilizada como técnica de referencia. Es más rápida (3h) que la PCR convencional; aporta la cuantificación exacta de *P. jiroveci* en la muestra, y podría utilizarse para el diagnóstico de la PCP en muestras orales y como parámetro de diferenciación entre infección y colonización.

4. Baja prevalencia de mutaciones en el gen de la dihidropteroato sintetasa (DHPS) de *Pneumocystis jiroveci* en pacientes españoles VIH-1 con neumonía por *P. jiroveci*.

Introducción: Estudios en EUA y Europa han mostrado una alta prevalencia de mutaciones en la DHPS de *P. jiroveci* en pacientes con neumonía por *P. jiroveci* (PCP) con exposición previa a sulfamidas. Por el contrario, no hay publicado ningún estudio multicéntrico que evalúe este problema en España.

Objetivo: Conocer la prevalencia de las mutaciones en la DHPS de *P. jiroveci* en pacientes infectados por el VIH-1 con PCP en España, su asociación con las sulfamidas y el factor pronóstico de las mismas.

Material y métodos: Estudio prospectivo, multicéntrico de casos consecutivos que incluyó a pacientes infectados por el VIH-1 con PCP de 12 hospitales españoles durante 2001-2004. El diagnóstico de *P. jiroveci* se realizó mediante microscopía en muestras respiratorias, esputo inducido y/o lavado broncoalveolar. Las muestras se conservaron sin teñir fijadas en alcohol o congeladas. El gen DHPS de *P. jiroveci* fue amplificado con nested-PCR; el ADN secuenciado y comparado con la secuencia consenso DHPS de *P. jiroveci*.

Resultados: El gen DHPS de *P. jiroveci* se amplificó en 200 de 220 pacientes VIH-1 con PCP (91%). La edad media (rango) fue de 38 (34-45) años, siendo el 78% varones. Los factores de riesgo para VIH fueron el uso de drogas por vía parenteral, la homosexualidad y la heterosexualidad en el 37%, 15% y 35% respectivamente. La infección por VIH-1 se diagnosticó a la vez que la PCP en el 47% de los casos. Sólo un 18% de pacientes recibieron profilaxis primaria para PCP con TMP-SMZ. La mediana de linfocitos CD4 (rango) fue de 21 (7-42) cél/ mm³ y la mediana de la carga viral (rango) de 5,43 (4,76- >6) log₁₀ copias/mL. Las tasas de ingreso en UCI, necesidad de ventilación asistida y mortalidad cruda fueron de 15%, 9% y 14% respectivamente. Siete pacientes (3,5%; IC95% 1,4-6,8%) presentaron mutaciones en el gen de DHPS de *P. jiroveci*, cinco mutaciones únicas: dos Thr55Ala y tres Pro57Ser; una doble en 55 y 57; y una infección mixta de cepa salvaje y mutación en 55. Dos de los siete casos (28,5%) habían recibido profilaxis con TMP- SMZ. Todos los pacientes se curaron, 6 con TMP-SMZ y uno con pentamidina iv y permanecen vivos seis meses después del tratamiento. Un paciente recidivó a los 8 meses.

Conclusiones: La baja prevalencia de mutaciones puede ser debida a que la mayoría de pacientes no recibieron profilaxis previa con TMP-SMZ. Ninguno de los pacientes con mutaciones falleció.

5. Quantitative Real-time PCR for the Diagnosis of *Pneumocystis jiroveci* Pneumonia in HIV-1 infected patients.

Introduction: Although the prevalence of *Pneumocystis jiroveci* pneumonia (PCP) has declined due to the sulfa prophylaxis and HAART therapy, PCP is an important cause of morbidity and mortality in HIV-1 infected patients. PCP diagnosis is made by classical microscopy stains in bronchoalveolar lavage (BAL) or induced sputum (IS).

Objective: Development of a new quantitative real-time PCR method for the diagnosis of *P. jiroveci* in BAL and IS specimens.

Material and methods: The *P. jiroveci* DHPS gene, cloned into the pCR 2.1 vector was used as standard. The plasmid was propagated. Tenfold serial dilutions (10^{10} to 10^{-2} DHPS copies/ μ l) of plasmid were used as a standard for quantification. DHPS-specific primers and a probe with VIC in the 5' position, and TAMRA in the 3' end, were designed. 71 *P. jiroveci* microscopy positive specimens from HIV-1 infected patients were included, as were 70 microscopy negative samples. Real-time PCR reactions were run on an ABI Prism 7000 with a program of 45 cycles and carried out in duplicate in a 25 μ l final volume. Results: In 67 out of 71 positive samples were detected *P. jiroveci* by real-time PCR. Specimens were considered positive if their ct value were between 23 and 42. That corresponded to *P. jiroveci* concentration between 10^6 and 1 copies of DHPS per μ l of sample. 67 out of 70 negative samples were detected as negative by real-time PCR, their DHPS concentrations were undetectable or lower to 10^{-1} copies. Sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were 95%, 96%, 96% and 95 % respectively.

Conclusions: Quantitative real-time PCR could detect low concentrations of *P. jiroveci*, has a low cost and might be useful for the clinical diagnosis of PCP.

6. Factores pronósticos de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PCP) en pacientes VIH-1 en la era del tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en España.

Introducción: La incidencia de la PCP en pacientes VIH-1 ha disminuído por el uso de la profilaxis y el TARGA. Sin embargo, la PCP continúa siendo relativamente frecuente en nuestro medio y su mortalidad se mantiene elevada. **Objetivo:** Conocer las características y factores pronósticos que condicionan la evolución de la PCP en pacientes VIH-1 en España en la era del TARGA. **Material y métodos:** Estudio prospectivo, multicéntrico de casos consecutivos que incluyó 207 pacientes infectados por el VIH-1 con PCP de 12 hospitales españoles entre 2001-2004. El diagnóstico de PCP se realizó mediante microscopía en lavado broncoalveolar y/o esputo inducido, y el genotipado del gen de la dihidropteroato sintetasa (DHPS). Las variables clínico-epidemiológicas fueron recogidas en un cuaderno de datos estandarizado. **Resultados:** La edad media (rango) fue de 38 (34-44) años, siendo el 77% varones. El uso de drogas por vía parenteral, la homosexualidad y la heterosexualidad se observaron en el 37%, 16% y 39%, respectivamente. La PCP fue debut del VIH en 47% de los casos. La mediana de linfocitos CD4 (rango) fue 21 (8-48) cél/mm³ y la mediana de la carga viral (rango) del VIH en plasma de 5,43 (4,76->6) log₁₀ copias/ml. Las tasas de ingreso en UCI y la necesidad de ventilación asistida fueron 17% y 12%, respectivamente. Siete pacientes (3,5%; IC95% 1,4-6,8) presentaron mutaciones en el gen de la DHPS. La mortalidad cruda fue del 31/207 (15%; IC95% 10-21). En el análisis univariado las siguientes variables se asociaron a un mayor riesgo de morir en relación a ese episodio: afectación pulmonar bilateral (p=0,004), uso de corticoides (p=0,034), albúmina baja (p=0,031), ingreso en UCI o necesidad de ventilación asistida (p<0,05 para ambos). La mala adhesión al TARGA, no haber recibido sulfamidas en los 4 meses previos, hipoxemia (pO₂<60) y LDH basales elevadas se asociaron a una tendencia a mayor riesgo de muerte. La edad, presencia de mutaciones en el gen de la DHPS, la conducta de riesgo para el VIH, la cifra de linfocitos CD4 y la carga viral en plasma basales no se asociaron a peor pronóstico.

Conclusiones: La PCP continúa siendo relativamente frecuente en España debido a que casi en la mitad de los casos fue la forma de debut de VIH. La mortalidad sigue siendo elevada (15%), siendo los marcadores radiológicos, analíticos o gasométricos que reflejan la gravedad de la afectación pulmonar y la necesidad de ingreso en UCI o de VM los principales factores pronósticos.

7. Nemonía por *Pneumocystis jirovecii* en Pacientes VIH-1 Antes y Después de la Terapia Antiretroviral Combinada. Influencia de los Genotipos de Dihidropteroato Sintetasa en el Pronóstico.

Introducción: Las mutaciones en la dihidropteroato sintetasa (DHPS) de *Pneumocystis jirovecii* se han asociado al fallo de la profilaxis con sulfamidas. Sin embargo, es controvertido si su presencia se asocia a mal pronóstico.

Objetivo: Determinar si la prevalencia de mutaciones en el gen de la DHPS ha cambiado tras la introducción de la terapia antiretroviral combinada (cART), y si se asocian a peor pronóstico en los pacientes VIH-1 con neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PCP).

Material y métodos: Se incluyeron 167 pacientes infectados por el VIH-1 con PCP diagnosticados durante los periodos pre-cART (1989-1995) y cART (2001-2004) en el Hospital Clínic de Barcelona. El diagnóstico de PCP se realizó mediante microscopía en lavado broncoalveolar y/o esputo inducido, y el genotipado de DHPS. Las variables clínico-epidemiológicas fueron recogidas en un cuaderno de datos estandarizado.

Resultados: El 17% de los pacientes presentó mutaciones en el gen de la DHPS (33% en el periodo pre-cART y 5.5% en el cART, $p < 0.01$). Los pacientes con mutaciones tenían edad (40 vs.39 años), sexo (76% vs.80%) y media de linfocitos CD4 (13 vs.21 cel/mm³) similar a los que los que no las presentaron. Los pacientes con mutaciones tenían más tendencia a ser homosexuales (47% vs.17%, $P < 0.01$), a tener criterios previos de SIDA (53% vs.25%, $P = 0.04$) y tratamiento previo con antiretrovirales (71% vs. 36%, $P = 0.01$). Además, habían recibido más profilaxis primaria (65% vs. 26%, $P < 0.01$) que los pacientes con genotipo *wild-type*, siendo la profilaxis con sulfamidas en el 60% vs. el 22% de los casos, respectivamente. El 95% de los pacientes recibió tratamiento con TMP-SMX. Hubo 3 recaídas (4%) a los 3 meses, y 5 (6%) a los 6 meses, todas en el grupo con genotipo *wild-type*. La mortalidad intrahospitalaria (11% vs. 6%, $P = 1.00$), a los 3 meses (1% vs. 6%, $P = 0.33$), y a los 6 meses (7% vs. 12%, $P = 0.63$) fue baja y similar en ambos grupos, independientemente de la presencia de mutaciones. **Conclusiones:** Las mutaciones en el gen de la DHPS eran mucho más frecuentes en el periodo pre-cART, cuando los pacientes estaban sometidos a una mayor presión con sulfamidas, que en la actualidad. Sin embargo, su presencia no empeora el pronóstico de la PCP y la mayoría de los pacientes responden satisfactoriamente al tratamiento con TMP-SMX.

