

Artículo original

Detección de *Pneumocystis carinii* (*P. jiroveci*), por técnica inmunocitoquímica, en pacientes con fibrosis quística

Dres. Eduardo R. Lentini,* Ana M. Lores,* Daniel Ciocca,** María R. Pesciullesi* y Carlos Stran*

RESUMEN

La aparición de nuevas técnicas de laboratorio para detectar patógenos habituales y no habituales, ha ampliado el campo diagnóstico en numerosas enfermedades. Hallazgos de algunos autores, han motivado la búsqueda de patógenos no usuales en nuestros enfermos con fibrosis quística.

Objetivo. Investigar la presencia de *Pneumocystis carinii* en enfermos con fibrosis quística con exacerbaciones graves o persistentes.

Población, material y métodos. El *Pneumocystis carinii* se estudió en forma prospectiva en nuestra población de enfermos fibroquísticos (57 pacientes desde enero de 1995 a julio de 2002) en pacientes con exacerbaciones graves o con mala respuesta al tratamiento. Se realizaron selectivamente 41 lavados broncoalveolares con un broncofibroscopio Pentax de 3,5 mm.

Técnica de tinción para *Pneumocystis carinii*: método anticuerpo monoclonal primario y secundario biotinilado (Dako).

Resultados. Se detectó *Pneumocystis carinii* en 5 enfermos fibroquísticos sobre un total de 41 lavados realizados; esto constituyó el 12,19% de hallazgos positivos en pacientes con esta patología sobre una población de 57 enfermos atendidos desde enero de 1995 a julio de 2000. Estos enfermos presentaban diferentes estados de gravedad de su exacerbación, no estaban inmunosuprimidos y tenían serología negativa para el virus de la inmunodeficiencia humana.

Todos se trataron con trimetoprima-sulfisoxazol, excepto uno que refería alergia importante a este fármaco.

Conclusiones. Se encontró *Pneumocystis carinii* en el 12,19% de 41 lavados realizados en enfermos fibroquísticos con exacerbaciones graves o prolongadas. De acuerdo con esta frecuencia de hallazgos positivos se sugiere tener en cuenta a este germen entre los patógenos poco habituales en estos pacientes. A la vez, proponemos cambiar el método tradicional de búsqueda de este patógeno por las nuevas técnicas (reacción en cadena de la polimerasa, inmunocitoquímica). La evolución clínica de algunos de estos pacientes sugiere que quizás hayan estado colonizados por el *Pneumocystis carinii* y que no sería necesario un tratamiento específico.

Palabras clave: *Pneumocystis carinii*, lavado broncoalveolar, fibrosis quística, inmunocitoquímica.

SUMMARY

Introduction. Difficulties in treating cystic fibrosis patients prompted us to investigate uncommon

pathogens in severe or unremitting cystic fibrosis exacerbations.

Objective. We searched for *Pneumocystis carinii* (PC) in severe or difficult to control exacerbations of our cystic fibrosis patients population.

Population, material and methods. We investigated the presence of (PC) in our cystic fibrosis population (57 patients), from January 1995 until July 2002. We performed 41 bronchoalveolar lavage (BAL) and immunostained for PC by the avidin-biotin with biotinylated secondary antibody.

Results. PC was detected in 5 patients out of 41 BAL examined. All patients were HIV-negative and were non-immunocompromised (Dako).

Conclusions. We found a frequency 12.19% of PC in 41 bronchoalveolar lavage of CF patients with severe or persistent exacerbations. PC as well as other uncommon pathogens must be sought in patients with severe CF exacerbations. Current epidemiological knowledge and serological difficulties do not allow to draw definitive conclusions regarding medical treatment of such patients.

Clinical outcome suggests that some of these patients might only be colonized by PC and specific medication may be unnecessary.

Key words: *Pneumocystis carinii*, bronchoalveolar lavage, cystic fibrosis.

* Servicio de Neumonología y Fibrosis Quística. Hospital de Niños (H.J. Notti). Mendoza. Argentina.
** Laboratorio de Referencia en Biología Molecular. Mendoza.

Correspondencia: Eduardo R. Lentini. Paso de los Andes 55. Mendoza 5500. Argentina.
Correo electrónico: elentini@arnet.com.ar

INTRODUCCIÓN

La aparición de nuevas técnicas de laboratorio, como la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y la inmunocitoquímica (ICQ), con mayor sensibilidad y especificidad para detección de patógenos que las usadas históricamente, ha creado la necesidad de modificar anteriores conceptos sobre patrones de referencia, patogenicidad, y ha creado nuevos desafíos a la hora de considerar el tratamiento de pacientes con ciertas infecciones.

En nuestros enfermos con fibrosis quística (FQ) nos propusimos investigar prospectivamente y en forma sistemática, por medio de lavado broncoalveolar (LBA) e ICQ, la existencia de *Pneumocystis*

carinii (PC) (actual nomenclatura: *Pneumocystis jiroveci*) en exacerbaciones graves o persistentes, alentados por la literatura existente.^{1,2} También se realizó la búsqueda habitual de bacterias y hongos, comunes en esta patología.^{1,3}

POBLACIÓN, MATERIAL Y MÉTODOS

Desde enero de 1995 hasta julio del 2002 se realizaron 380 procedimientos broncoscópicos en diferentes patologías en nuestro servicio. Sobre una población de 57 pacientes con FQ en el período citado, 41 de estos procedimientos fueron LBA realizados a enfermos con FQ que presentaban exacerbaciones graves o difíciles de controlar. En todos estos enfermos se buscó PC aparte de la búsqueda habitual de bacterias y hongos. Se solicitó consentimiento previo a la realización del procedimiento.

Técnica de LBA

Se utilizó un broncofibroscopio Pentax de 3,5 mm, bajo anestesia general, con respiración espontánea. El broncoscopio se enclava en el lóbulo o segmento más comprometido si el proceso es focalizado o preferentemente en el lóbulo medio y el lóbulo superior izquierdo (lígula) si es difuso. Se usa anestesia local simultánea. Con volúmenes totales de 3 ml/kg y de 1 ml/kg por vez,⁴ se reúnen las muestras que se analizan para el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC): (se considera significativo un valor de 1×10^4),⁵ micológico, estudio porcentual diferencial de

leucocitos, macrófagos, células epiteliales y gérmenes fagocitados. Simultáneamente se envía una muestra para ICQ.

La técnica inmunocitoquímica empleada fue la siguiente: se agrega formol al 10% al líquido de LBA; se deja decantar por 6-8 horas, se toman las células del fondo del frasco y se hace un frotis sobre portaobjetos. El procedimiento inmunocitoquímico se describió previamente.⁶ Se usó un sistema altamente sensible que emplea al complejo avidina-biotina marcada con peroxidasa (Dako Corporation, Carpintería, CA).⁷ Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario (monoclonal hecho en ratón contra *Pneumocystis carinii*, Dako Corporation) en una cámara húmeda durante toda la noche a 4° C, a una dilución de 1:40. Anticuerpo secundario: IgG antirratón (molécula completa) conjugada con biotina (Dako Corporation). Las células se tiñeron suavemente con verde de metilo al 0,5% (para observar los núcleos celulares) o con hematoxilina. La reacción positiva aparece como círculos homogéneos (quistes) o como trofozoítos libres extracelulares.

RESULTADOS

Se encontró PC en 5 de estos 41 procedimientos de LBA, lo que constituye el 12,19% de los LBA realizados en FQ para ese período de tiempo (enero 1995- julio 2002). El rango de edades de los pacientes con hallazgos positivos fue de 9 a 19 años, con una media de 13,5 años. No hubo complicaciones inherentes al procedimiento, excepto desaturaciones transitorias. Las características principales de los enfermos, hallazgos y tratamientos se presentan en las Tablas 1 y 2.

Evolución de los pacientes con hallazgos positivos

Paciente 1: La paciente, de 8 años de edad, falleció como resultado de una exacerbación pulmonar grave. Estuvo colonizada durante muchos años por *Pseudomonas aeruginosa* (PA) y su evolución ya había sido grave en otras oportunidades. No pudimos atribuir el fallecimiento exclusivamente a la presencia de PC. Presentó un recuento de leucocitos de $5.900 \times \text{mm}^3$ (N: 36%, E: 3%, L:51%, M: 4%, B: 0%). No se realizaron otros estudios inmunológicos.

Paciente 2: Paciente de sexo masculino,

TABLA 1. Características de los pacientes positivos para *Pneumocystis carinii*

Paciente	Edad (años)	Sexo	VIH	Estudios inmunológicos	VEF1 Pretratamiento	VEF1 Postratamiento
1	8	F	(-)	No disponibles	No	
2	19	M	(-)	normales	88%	100%
3	19	M	(-)	normales	42%	39%
4	9	F	(-)	normales	82%	89%
5	12	F	(-)	normales	61%	70%

VIH: virus de la inmunodeficiencia humana; VEF1: volumen espiratorio forzado en 1 segundo (% de teórico).

de 19 años. Cuando se administró TMP-SMX, ya estaba mejorando con antibióticos dirigidos a su patógeno de base (PA), por lo que no podemos atribuir la mejoría al tratamiento con TMP-SMX. Es posible suponer que sólo era portador del PC. Los datos de laboratorio mostraron: hemograma: hematíes: $5.180.000 \times \text{mm}^3$, leucocitos $17.100 \times \text{mm}^3$ (N: 75%, L: 13%, M: 7%, E: 0%). Serología para HIV (-). La evaluación inmunológica incluyó: nitroblue-tetrazolio (NBT): 75% de los neutrófilos reducen el NBT (normal), poblaciones linfocitarias: CD3 (no valorado), CD4, CD8, CD19 y CD56: normales, dosaje de IgG, IgM, IgA, IgA secretoria e IgE, dentro de límites normales.

Paciente 3: Varón de 19 años, la evolución clínica fue similar a la del paciente 2. Los datos de laboratorio incluyeron: hemograma: hematíes: $4.500.000 \times \text{mm}^3$, leucocitos: $8.700 \times \text{mm}^3$ (N: 64%, E: 0%, B: 0%, M: 2%, L: 34%). Evaluación inmunológica: IgG, IgM, IgA, IgA sec. e IgE: normales.

Complemento: CH50, 148 U (N: 70-150); C3, 200 mg% (N: 80-160); C4, 44 mg% (N: 20-40). Fenotipificación linfocitaria: CD4, 54%; CD8, 20%; CD19, 26%; CD56, 4% (normales).

Paciente 4: Niña de 9 años con una exacerbación persistente, aunque leve. El cuadro clínico no fue muy importante y no pudimos determinar si el PC tuvo alguna influencia en su evolución.

Los datos de laboratorio incluyeron: hemograma: hematíes: $4.180.000 \times \text{mm}^3$, leucocitos: 9600 (N 56%, E 3%, B 0%, L 37%, M 4%). Evaluación inmunológica: IgG, IgM, IgA dentro de límites normales. Complemento: CH50 68 (N 70-150). Fenotipificación linfocitaria: CD3, CD4, CD19 y CD56 normales.

Paciente 5: Se trata de una niña de 12 años que representa uno de los casos más ilustrativos. No pudo medicarse con TMP-SMX por alergia grave a sulfas. Tenía un LBA, del año anterior, negativo para PC. Debido a su mejoría con antibióticos para otros patógenos, a los que el PC no es sensible, debemos suponer que sólo era portadora de este hongo. Hemograma: GR: $4.300.000 \times \text{mm}^3$, leucocitos: $9.900 \times \text{mm}^3$ (N: 45%, E: 0% B: 0% L: 52%, M: 3%). Evaluación inmunológica: IgG, IgM, IgA e IgE dentro de límites normales, CH50 127 mg% (N: 70-150). NBT > 50% (normal).

Cabe hacer notar que todos los enfermos eran inmunocompetentes por las evaluaciones realizadas o por sus evoluciones previas y posteriores. El tratamiento con corticoides fue muy breve, por vía oral o inhalatorio, sin producir inmunosupresión en las dosis, tiempos y formas utilizadas.⁸

CONCLUSIONES

Sobre 380 procedimientos broncoscópicos realizados por distintas indicaciones desde enero de 1995 hasta julio de 2002, 41 correspondieron a enfermos con FQ. En 5 de estos enfermos se detectó PC por ICQ; esta es una importante frecuencia de hallazgos positivos (12,19%) en exacerbaciones de FQ graves o persistentes. Sobre la base de este hallazgo, se sugiere tener en cuenta a este germen entre los patógenos poco habituales en estos pacientes. La evolución clínica de algunos de estos pacientes sugiere que quizás hayan estado colonizados por el PC y que no sería necesario un tratamiento específico.

DISCUSIÓN

Epidemiología del hongo PC

El PC se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza y se ha encontrado en aire filtrado de huertos así como en habitaciones de pacientes con neumonía por PC.⁹

La serología positiva para PC en amplias franjas de población muestra lo habitual que es el contacto asintomático ya desde tempranas edades.⁹⁻¹¹ La aceptación del estado de portador, ya de por sí implica la posibilidad de hallazgo del hongo, sin enfermedad.⁹

TABLA 2. Gérmenes aislados y tratamiento recibido

Paciente	Otros gérmenes encontrados	PC	Corticoides	Tratamiento con antibióticos	TMP-SMX
1	PA, ASP	Sí	EV.	Fep- akn	Sí
2	PA	Sí	No	Fep-akn	Sí
3	PA, SA	Sí	Oral 5 días	Cfp-van	Sí
4	Ninguno	Sí	Inhalados	cft	Sí
5	PA, CHL.	Sí	Oral 5 días	Mr, akn, caf, clrt	No

PA: *Pseudomonas aeruginosa*; ASP: *Aspergillus* sp.; SA: *Staphylococcus aureus*; CHL: *Chlamydia* sp.; PC: *Pneumocystis carinii*; IV: intravenoso; O: oral; INH: inhalado; Fep: ceftazidima; akn: ampicacina; cfp: cefoperazona; van: vancomicina; Cft: cefalotina; mr: meropenem; caf: cloranfenicol; clrt: claritromicina.

Durante mucho tiempo se pensó que las manifestaciones neumónicas por PC en pacientes inmunosuprimidos eran reactivaciones de infecciones latentes.⁹ Sin embargo, la detección de PC genéticamente diferentes, en distintas oportunidades, en el mismo paciente y experimentos con ratas han demostrado que las infecciones no siempre se deben a reactivaciones endógenas y que existe la posibilidad de transmisión huésped-huésped.^{9,10,12} La comprobación de la posibilidad de la existencia del hongo en individuos normales,^{10,11,13} la ubicuidad de su distribución en la naturaleza,⁹ el hallazgo del patógeno en pacientes no inmunocomprometidos,^{10,11,14,15} en necropsias realizadas por otras razones^{13,14} y, finalmente, la gran frecuencia de serología positiva para PC en individuos normales,^{9,11,15} desafía anteriores suposiciones que planteaban que sólo se lo encontraba en el grupo con compromiso inmunológico.

Sobre las nuevas técnicas de laboratorio

La reacción en cadena de la polimerasa (RCP) y la tinción ICQ han aumentado la capacidad de detección de bajo número de unidades infecciosas,¹⁶ lo que crea un problema de interpretación de hallazgos, en pacientes sintomáticos y asintomáticos, inmunocomprometidos o no,¹⁶ cuando se las compara con los patrones de referencia históricos.¹⁶ En el PC, este patrón de referencia es su detección por tinciones (por ejemplo: plata metenamina de Gomori) y microscopia en tejidos o muestras de LBA.¹⁷ La clínica y la radiología, por su inespecificidad, no certifican el diagnóstico definitivo.

Sobre nuestros enfermos

El hallazgo del PC en enfermos graves no permite especulaciones a la hora del tratamiento. Aun cuando se considere que estos pacientes no estaban inmunocomprometidos, debido a la posible extensión y agravamiento rápido, no queda otra alternativa que medicar con trime-tropina-sulfimetoxazol (TMP-SMX).¹⁸ En los casos moderados estudiados por la persistencia de su exacerbación con LBA, en pacientes no inmunocomprometidos, como los nuestros y también en los VIH negativos, es muy probable que se puedan esperar durante algunos días los resultados de la investigación con indicación de antibióticos dirigidos a sus patógenos habi-

tuales antes de iniciar la terapéutica específica para PC, como lo demuestra el análisis ulterior de dos casos con estas características en nuestra casuística.

Finalmente, en cuanto a la terapéutica, podemos sugerir lo siguiente:

- a) Debido a la alta frecuencia de hallazgo de PC en FQ graves (12,19%), sugerimos buscar este patógeno en pacientes con estas características.
- b) Si el cuadro del FQ es grave, no queda otra alternativa que usar el tratamiento específico con TMP-SMX junto a antibióticos dirigidos a los gérmenes concomitantes, ya que el cuadro no admite demora.
- c) En casos de exacerbaciones de difícil control en enfermos no inmunocomprometidos, sin gran compromiso del estado general, quizás se pueda esperar un breve período con la medicación habitual. Si se estuviera produciendo una mejoría no sería necesario agregar medicación contra PC.

Seguramente habrá que cambiar el patrón de referencia actual¹⁶ y aceptar que el diagnóstico de la patología por PC requiere un cambio de la tecnología tradicional por tinciones por la detección en las mismas muestras con las nuevas técnicas. A éstas debería referirse posiblemente la positividad o no del hallazgo del hongo.

Nuevas técnicas serológicas como la RCP e ICQ,¹² recuentos semicuantitativos por anticuerpos monoclonales y la correlación clínica y de laboratorio permitirán definir mejor el diagnóstico y el modo de actuar. Este es el desafío actual para la investigación en esta área. ■

REFERENCIAS

1. Orenstein D, Stern R. Inpatient treatment. En: Treatment of the hospitalized cystic fibrosis patient. Nueva York, NY: Marcel Dekker, Inc, 1998.
2. Royce FH. *Pneumocystis carinii* isolated from lung lavage fluid in an infant with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 2000; 29: 235-38.
3. Gilligan PH. Microbiology of cystic fibrosis lung disease. En: Yankaskas J, Knowles M (ed). Cystic fibrosis in adults. London: Lippincott-Raven, 1999.
4. Rengelmann W, Gregg E. Bronchoalveolar lavage in pediatric respiratory disease. Philadelphia: W.B. Saunders Co, 1993.
5. Helmer RA, Pisarni RJ. Bronchoalveolar lavage. En: Bronchoscopy. Prakash B.S. (ed) Raven Press.
6. Ciocca DR, Bjercke RJ. Immunohistochemical techniques using monoclonal antibodies. En:

- Langone JJ, van Vunakis E, eds. *Methods Enzymol.* Vol 121. Miami FL: J Academic Press, 1986: 562-579.
7. Elias JM, Margiotta M, Gabore D. Sensitivity and detection efficiency of the peroxidase antiperoxidase (PAP), avidin-biotin peroxidase complex (ABC), and peroxidase-labeled avidin-biotin (LAB) methods. *Am J Clin Pathol* 1989; 92:62.
 8. National asthma education and prevention program. Expert Panel Report II. Guidelines for the diagnosis and management of asthma. NIH. 1997. Disseminated Varicella 3a- 11.
 9. Beard C, Navin T. Molecular epidemiology of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *CDC Emerging infectious diseases* 1996; 2 N°2.
 10. Metersky M. *Pneumocystis carinii*. Forgotten but not gone? *Chest* 1998; 114:1232-33.
 11. Vargas LV, Hughes W, Santolaya M, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal healthy infants. *CID* 2001; 32:855-61.
 12. Walzer PD. Mini reviews. Immunological features of *Pneumocystis carinii* infection in humans. *Clin Diagn Lab Immun* 1999; 6:149-55.
 13. Kasolo F, Kennedy L, Chintu C, et al. Identification of *Pneumocystis carinii* DNA by polymerase chain reaction in necropsy lung samples from children dying of respiratory tract illnesses. *J Pediatr* 140: 367-69.
 14. Sheldon WH. Subclinical *Pneumocystis* pneumonitis. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1959; 97: 287-97.
 15. Sing A, Karlheinz T, Roggenkamp A et al. Evaluation of diagnostic value and epidemiological implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in different immunosuppressed and immunocompetent patient groups. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1461-67.
 16. Yoken RH. Nucleic acid amplification assays for microbial diagnosis: Challenges and opportunities. *J Pediatr* 2002; 140:290-2.
 17. Ribes JA, Limper AH, Espy MJ. PCR detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 1997; 35:830-35.
 18. Fishman JA, Mini-review. Treatment of infection due to *Pneumocystis carinii*. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:1309-14.