



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina

**COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* EN  
EMBARAZADAS Y SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA  
PREMATURIDAD Y EL ABORTO ESPONTÁNEO**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor

**Vicente Friaza Patiño**

Sevilla, Mayo 2017

**COLONIZACIÓN POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII* EN EMBARAZADAS Y  
SU POSIBLE IMPLICACIÓN EN LA PREMATURIDAD Y EL ABORTO  
ESPONTÁNEO.**

Memoria presentada por **Vicente Friaiza Patiño** para optar al grado de Doctor

Sevilla, mayo de 2017

**Directores**



**Enrique José Calderón Sandubete**

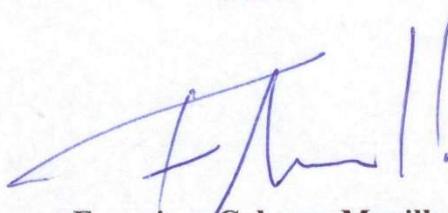
Doctor en Medicina



**Rafael Torrejón Cardoso**

Doctor en Medicina

**Tutor**



**Francisco Cabezas Murillo**

Doctor en Medicina

**Departamento de Medicina  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincero agradecimiento a mis directores, los Doctores Enrique Calderón y Rafael Torrejón no solo por la confianza depositada en mi al brindarme esta oportunidad, sino también por su continuo apoyo personal y la inmensa experiencia profesional que me han transmitido. Y especialmente al “jefe” que, por su comprensión, tolerancia, respeto y trabajo cuenta con toda mi admiración y mi más sincera amistad.

A mi tutor el Doctor Francisco Cabezas Murillo por sus sabios consejos y guía durante este periplo que espero me lleve a buen puerto.

A la Unidad de Gestión Clínica de Neonatología especialmente al Doctor Antonio Pavón, y a la Doctora Vieites del Servicio de Anatomía patológica sin cuya ayuda y cooperación no hubiera sido posible este trabajo.

A Juan Manuel Praena por su ayuda inestimable con la estadística,

A Rubén Morilla, Elena Campano y Carmen de la Horra por ser amigos más que compañeros de trabajo.

Y finalmente a mi familia y en especial a mis padres, a los que todo les debo, por su incondicional apoyo y cariño, y por aguantarme cuando ni yo mismo lo hago.

## GLOSARIO DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>BAL</b>	del inglés Bronchoalveolar lavage, Lavado Broncoalveolar
<b>CD</b>	del inglés Cluster of differentiation, Conjunto de diferenciación.
<b>CD4+</b>	Conjunto de linfocitos con diferenciación 4
<b>CD8+</b>	Conjunto de linfocitos con diferenciación 8
<b>ddATP</b>	Dideoxiadenosíntrifosfato
<b>ddCTP</b>	Dideoxicitosíntrifosfato
<b>ddGTP</b>	Dideoxiguanosíntrifosfato
<b>ddTTP</b>	Dideoximidíntrifosfato
<b>ddNTP</b>	Dideoxinucleótidofofosfato
<b>dNTP</b>	Deoxinucleótidostrifosfato
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPOC</b>	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
<b>HE</b>	Hematoxilona y Eosina
<b>ITS</b>	del inglés Internal Transcribed Spacer
<b>LOF</b>	Lavado Orofaringeo
<b>mm Hg</b>	milímetros de mercurio
<b>mtLSU</b>	Subunidad mayor del ribosoma mitocondrial
<b>mtLSU rRNA</b>	ARN ribosómico de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	del inglés Nuclear Factor $\kappa$ B, factor nuclear $\kappa$ B
<b>PcP</b>	del inglés <i>Pneumocystis</i> Pneumonia, neumonía por <i>Pneumocystis</i>
<b>PCR</b>	del inglés Polymerase Chain Reaction
<b>TBE</b>	Tris, Borato y EDTA

## ÍNDICE

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
1.1. Antecedentes históricos	10
1.2. <i>Pneumocystis</i> : Filogenia y Taxonomía	13
1.3. Colonización por <i>Pneumocystis</i>	16
1.4. Adquisición de <i>Pneumocystis</i>	23
1.4.1. Hipótesis de la reactivación	23
1.4.2. Hipótesis de la adquisición reciente	24
1.5. Transmisión de <i>Pneumocystis</i>	26
1.5.1. Transmisión Horizontal	27
1.5.2. Transmisión Vertical	27
<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO</b>	<b>29</b>
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
3.1. Hipótesis	33
3.2. Objetivos	34
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1. Diseño y Población	36
4.1.1. Diseño del Estudio	36
4.1.2. Ámbito del Estudio	36
4.2. Población de Estudio	36
4.3. Tamaño Muestral	38
4.4. Obtención de muestras	39
4.4.1. Embarazadas	39
4.4.2. Recién Nacidos	40
4.4.3. Mujeres no gestantes	40
4.5. Extracción y purificación de ADN	41
4.6. Amplificación de ADN	43
4.6.1. Amplificación del gen mtLSU rRNA de <i>Pneumocystis</i>	43
4.6.2. Amplificación de la región ITS	45

4.6.3. Visualización de los productos de amplificación	47
4.6.4 Criterios de interpretación	48
4.7. Clonación de los productos de PCR	49
4.8. Secuenciación	52
4.9. Controles de calidad	55
4.10. Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos	56
4.11. Recogida y análisis de datos	57
4.12. Aspectos éticos	57
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>59</b>
5.1. Prevalencia de colonización por <i>Pneumocystis</i> en embarazadas	60
5.2. Prevalencia de colonización por <i>Pneumocystis</i> en recién nacidos	64
5.3. Relación entre Colonización en la madre y el recién nacido	67
5.4. Abortos y partos múltiples	68
5.5 Presencia de ADN de <i>Pneumocystis</i> en tejidos placentarios y fetales	69
5.6. Presencia de ADN de <i>Pneumocystis</i> en sangre de embarazadas	71
5.7. Estudios Histológicos e inmunohistoquímicos	71
5.8. Determinación de otras especies fúngicas	74
5.9. Biodiversidad	79
<b>6. DISCUSIÓN</b>	<b>81</b>
6.1. Limitaciones	81
6.2. Prevalencia de colonización por <i>Pneumocystis</i> en embarazadas	84
6.3. Prevalencia de colonización por <i>Pneumocystis</i> en recién nacidos	86
6.4. Relación entre Colonización en la Madre y el Recién Nacido	87
6.5. Efectos de la Colonización por <i>Pneumocystis</i> en el embarazo	88
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>93</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>95</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>109</b>



## Resumen de la Memoria

**Antecedentes:** *Pneumocystis jirovecii* es un hongo atípico, ubicuo, con tropismo pulmonar y gran estenoxenismo cuya principal vía de transmisión es aérea. Se considera un patógeno oportunista que causa neumonía grave en pacientes inmunodeprimidos, habiendo sido ampliamente investigado en el contexto de la infección por VIH. La utilización de herramientas de diagnóstico molecular ha permitido demostrar la presencia de *Pneumocystis* en sujetos que no presentan manifestaciones clínicas ni radiológicas de neumonía, situación conocida como colonización. Un estudio previo ha puesto de manifiesto la presencia de este microorganismo en las mujeres embarazadas como un grupo susceptible a la colonización. Existen evidencias que llevan a pensar que la colonización por *Pneumocystis* podría jugar un papel importante en la fisiopatología de diversas enfermedades por su capacidad, demostrada en modelos animales, de inducir en fases muy tempranas de la infección activación de macrófagos alveolares con elevación de interleuquinas proinflamatorias. La demostración por parte de nuestro grupo en pacientes con EPOC colonizados de un aumento en la respuesta inflamatoria sistémica, junto con la reciente evidencia de la capacidad de transmitirse verticalmente y la elevada tasa de infección documentada en abortos espontáneos obligan a plantear el posible papel que *P. jirovecii* puede desempeñar a través de estos mecanismos en la alteración del desarrollo normal del embarazo.

**Población y métodos:** Para abordar esta cuestión se ha desarrollado un estudio clínico observacional donde se han incluido 82 gestantes, con sus respectivos recién nacidos, de los que se obtuvieron datos clínicos y muestras biológicas respiratorias y sanguíneas después de obtener el correspondiente consentimiento informado. Como grupo control se incluyeron 36 mujeres en edad fértil no embarazadas. Además se incluyeron en el estudio 26 muestras de tejido placentario procedentes de partos a término y 20 muestras de placentas procedentes de abortos espontáneos con el correspondiente tejido fetal. La detección de la presencia de colonización por *Pneumocystis* se realizó utilizando técnicas moleculares específicas en los diferentes tipos de muestras. Se completó el estudio utilizando técnicas de metagenómica para identificar la microbiota presente en el tejido placentario y se realizaron los correspondientes estudios histológicos utilizando técnicas de tinción convencionales.

**Resultados:** Los datos obtenidos revelan una tasa de colonización significativamente mayor en mujeres embarazadas en el momento del parto de un 39% (46,9% en el caso de parto prematuro; 27,3% en parto a término) frente a un 13,9% en mujeres no gestantes en edad fértil.

En los recién nacidos también encontramos tasas de colonización elevadas, del 33,3% en prematuros y del 23,1% en recién nacidos a término, observándose concordancia entre la presencia de colonización en la madres y sus recién nacidos. La tasa de colonización en los recién nacidos al aumentar las semanas de gestación sigue una distribución decreciente, similar a la de la madre. En este estudio también se identificó ADN de *Pneumocystis* en el 50% de las placentas a término, en el 55 % de las placentas procedentes de abortos y en un 70 % de fetos. La identificación de otras especies de hongos mediante técnicas de metagenómica pone de manifiesto la existencia de una microbiota fúngica en la placenta donde predomina *P. jirovecci* y pueden estar presentes otros hongos como *Cladosporium spp.*

**Conclusiones:** Este estudio muestra una elevada tasa de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en gestantes en el momento del parto identificando el embarazo como un factor de riesgo para la colonización. Se observa una elevada concordancia en la colonización por *Pneumocystis* entre las madres y sus recién nacidos, sugiriendo una transmisión vertical desde las gestantes a sus hijos. Además se demuestra una asociación significativa entre la presencia de colonización por *Pneumocystis* en las gestantes y una reducción en la duración del embarazo, asociación que se mantiene al evaluar en un análisis multivariante otras circunstancias como la edad de las madres o la presencia de diabetes o hipertensión, lo que sugiere que la colonización por *Pneumocystis* durante el embarazo podría representar un factor de riesgo de prematuridad, y probablemente de aborto, ignorado hasta ahora que abre una nueva línea de investigación que podría contribuir a mejorar la salud tanto de las gestantes como de sus recién nacidos.



# **1.INTRODUCCIÓN**

*Pneumocystis jirovecii*, conocido previamente como *Pneumocystis carinii* sp.f. *hominis* (Stringer et al. 2002), es un hongo atípico, ubicuo, con tropismo pulmonar y gran estenoxenismo que parece transmitirse por vía aérea (Dei-Cas 2000). Su capacidad patogénica en el hombre se demostró por primera vez al vincular este patógeno con la neumonía intersticial de células plasmáticas que afectó en forma epidémica a niños malnutridos y prematuros en Centroeuropa durante los años de la Segunda Guerra mundial. Sería con la eclosión de la epidemia de SIDA cuando este microorganismo adquiriría notoriedad al ocupar un lugar prominente como uno de los mayores problemas de salud pública a escala mundial (Calderón-Sandubete et al. 2002). En la actualidad, la neumonía por *Pneumocystis* (PcP) se mantiene todavía como un importante problema sanitario con una alta morbilidad y mortalidad entre los pacientes inmunodeprimidos, sobre todo en los infectados por el VIH, donde constituye aún la primera causa definitoria de SIDA junto a la tuberculosis (A. Morris et al. 2004). Sin embargo, en el momento actual la relevancia de esta infección trasciende el campo de la patología oportunista en el paciente con VIH, dado el aumento en las dos últimas décadas de los pacientes sometidos a inmunodepresión farmacológica como tratamiento de patologías autoinmunes o como requisito imprescindible para los trasplantes, así como la mayor agresividad de los protocolos terapéuticos en oncología y hematología, motivando un aumento importante de las infecciones por este patógeno en pacientes inmunodeprimidos sin infección por VIH (Cardenal et al. 2001) , cuyo control constituye un importante reto de la medicina actual. Por otra parte, la descripción creciente en los últimos años de casos de neumonía por *Pneumocystis* en sujetos sin patología inmunodepresora de base demuestra que esta enfermedad puede afectar también a sujetos no inmunodeprimidos (Cano et al. 1993; Calderón et al. 1996; Sing et al. 1999), y sugiere que el impacto epidemiológico de esta infección podría ser mucho más importante de lo que se pensaba.

## 1.1. Antecedentes históricos

Nos remontamos hasta principios del siglo XX, cuando el Dr. Carlos Chagas, médico e investigador brasileño del Instituto Oswaldo Cruz fue enviado al estado brasileño de Minas Gerais para combatir una epidemia de malaria que afectaba a los trabajadores que construían la línea de ferrocarril en 1909. Allí, el Dr. Carlos Chagas investigó la aparición de una nueva enfermedad, la tripanosomiasis americana, que no sólo se limitó a describir, sino que también descubrió el vector de la infección, un insecto hematófago del género *Triatoma*, y el agente causante de dicha infección, un protozoo flagelado del género *Trypanosoma* y que llamó *Schizotrypanum cruzi* (más adelante *Trypanosoma cruzi*) en honor al Dr. Oswaldo Cruz, colega suyo y creador del instituto para el que trabajaba (Chagas 1909).

Este nombre de *Schizotrypanum* para el *Trypanosoma*, se debió a la observación de numerosas formas esquizogónicas presentes en los pulmones de cobayas inoculadas con sangre de pacientes con tripanosomiasis, y que también estaban presentes en el tejido pulmonar del primer caso de Tripanosomiasis americana aguda, quistes que erróneamente interpretó como parte del ciclo vital del *Trypanosoma cruzi*, y que como posteriormente se descubrió fueron la primera evidencia de la existencia de los microorganismos englobados hoy día en el género *Pneumocystis*.

Pero para que esta evidencia fuera demostrada, y por tanto su identificación como microorganismo independiente, debieron pasar todavía un par de años, empezando por Antonio Carini, director del Instituto Pasteur de Sao Paulo, quien en 1910 observó unas formas quísticas similares en pulmones de ratas infectadas con *Trypanosomas Lewisi* (Carini 1910), pero quizás ante la sospecha de que estos quistes pertenecieran a una especie diferente y desconocida hasta entonces envió muestras de tejido pulmonar a su colega del Instituto Pasteur de Paris Charles Louis Alphonse Laveran. Allí, en Paris, el matrimonio Delanöe, discípulos de Laveran, encontraron formaciones quísticas similares a las descritas por Chagas y Carini, en ratas que no estaban infectadas por *Trypanosoma* y comprobaron como la inoculación de estos quistes no provocaban la aparición de tripanosomas circulantes, demostrando, revisando las publicaciones previas y las muestras de Carini, que estos quistes correspondían a una nueva especie hasta ahora desconocida y sin relación con los tripanosomas. Tras estos hallazgos Chagas y Carini se retractaron públicamente (Carini A., Maciel 1914) y aportaron datos que corroboraron el hallazgo del matrimonio Delanöe, que continuaron sus investigaciones y

plantearon ya entonces la transmisión por vía aérea y confirmaron el tropismo pulmonar de este microorganismo.

El matrimonio Delanöe encuadró la nueva especie, aceptada ya como patógeno independiente, como un protozoo relacionado con la familia de las *Coccidia* y la bautizó con el nombre de *Pneumocystis carinii*, “pneumo” por su tropismo pulmonar, “cystis” por su morfología característica, y “carinii” en honor al Dr. Antonio Carini (Delanoe, M. , Delanoe 1912) que fue quien les envió las muestras histológicas al Instituto Pasteur de Paris.

Los estudios que siguieron sobre *Pneumocystis* dieron a conocer su presencia en gran variedad de mamíferos (ratones, ratas, cobayas, monos y conejos) así como su distribución a nivel mundial, pero la falta de evidencias de que produjera algún tipo de enfermedad cuestionó su patogenicidad, disminuyendo así el interés científico por este microorganismo y por tanto las publicaciones clínicas sobre él (Calderón-Sandubete et al. 2002).

A finales de los años 30 Ammich y Benecke describieron una forma de neumonía de origen desconocido que denominaron neumonía intersticial de células plasmáticas que afectaba a niños prematuros y/o malnutridos, que adquirió proporciones epidémicas en la Europa Central durante el transcurso de la Segunda Guerra Mundial que sería la primera infección relacionada con *Pneumocystis* en humanos.

*Pneumocystis* no fue identificado en humanos hasta 1942 cuando los investigadores holandeses van der Meer y Brug lo identificaron en un niño de cuatro meses que padecía una enfermedad cardíaca congénita, así como en otras muestras de autopsias, y fueron los primeros en dar a conocer la presencia de formas tróficas de *Pneumocystis*, así como los primeros en publicar una imagen al microscopio de este microorganismo confirmando su presencia en humanos, aunque no está del todo claro si correlacionaron la presencia del patógeno con la neumonía intersticial subyacente.

Vanek, Jirovec y Lukes, tres investigadores checos, son a quienes se les otorga el descubrimiento de la capacidad patogénica de *Pneumocystis* en el hombre, al correlacionar la presencia de *Pneumocystis* con este tipo de neumonía intersticial (Calderón-Sandubete et al. 2002).

Se consideró una enfermedad infantil hasta que en los años 60 del siglo XX aparecieron las primeras publicaciones con casos de pacientes adultos con neumonías por *Pneumocystis* (PcP) asociados a estados de inmunodepresión ya fuera por estar sometidos a tratamientos de

quimio o radioterapia por padecer procesos neoplásicos o por presentar problemas congénitos de inmunidad (Rubin & Zak 1960). En 1974 se publicó el primer estudio amplio en el que se recopilaron 194 casos de PcP, revelando la malnutrición como un factor de riesgo, así como constatando su presencia en pacientes con síndromes de inmunodeficiencias o situaciones de intensa inmunosupresión, particularmente con la quimioterapia del cáncer (Walzer et al. 1974).

Los siguientes años fueron muy productivos en la comprensión de *Pneumocystis*, por el estudio de estos nuevos grupos poblacionales, el conocimiento estructural alcanzado mediante el uso de la microscopia electrónica y por la aparición de los primeros estudios con anticuerpos aislados de sueros de ratas, que no reconocían los microorganismos aislados a partir del hombre, lo que llevó a Frenkel a plantear la hipótesis de que *Pneumocystis* era un microorganismo estenoxénico y que por tanto a pesar de sus similitudes morfológicas la especie que infectaba a las ratas era diferente de la que infectaba al hombre (Frenkel 1976), proponiendo el nombre de *Pneumocystis jiroveci* para la especie que afectaba al hombre, en honor al científico checo Otto Jirovec, quien en 1951 relacionara al patógeno con la neumonía que aparecía en los niños prematuros y malnutridos.

Pero no fue hasta la década de los 80 cuando el estudio de la neumocistosis adquirió una creciente importancia, al ser la infección por este patógeno oportunista la que indirectamente reveló los primeros casos de SIDA; en febrero de 1981 Sandra Ford, una auxiliar de farmacia de los centros para la prevención y el control de las enfermedades (CDC, siglas en inglés) de EE. UU., alertó de un incremento inusual de las peticiones de pentamidina para el tratamiento de neumonías por *Pneumocystis*, que además se estaban dando en a sujetos sin causas conocidas de inmunodepresión y que constituyó la primera evidencia de la eclosión de la epidemia de SIDA.

Hoy en día con la aparición de la quimioprofilaxis, primero, y la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) después, la incidencia de infecciones oportunistas, y por tanto de la PcP entre ella, ha sufrido una importante disminución entre los pacientes con infección por VIH, pero aún hoy en día la infección por *Pneumocystis* sigue siendo una de las principales causas definitorias de SIDA, que unido al cada vez más extendido uso de terapias inmunosupresoras en diferentes tipos de pacientes con cáncer, hemopatías malignas, afecciones inflamatorias crónicas, receptores de trasplante de cualquier tipo hace que siga teniendo aun una gran importancia clínica.

## 1.2. *Pneumocystis*: Filogenia y Taxonomía

Durante décadas *Pneumocystis* fue considerado un protozoo, más allá de su inicial descubrimiento como, erróneamente, una etapa del ciclo de vida del protista *Trypanosoma cruzi*, principalmente porque los fármacos antifúngicos se mostraron ineficaces ante la PcP, mientras que los tratamientos contra infecciones protozoarias sí eran efectivos. Pero las limitaciones en su estudio al no conseguir cultivarse, unido al hecho de que por microscopía presentaba similitudes morfológicas con las levaduras hizo que su naturaleza como protozoo fuera cuestionada (Vavra & Kucera 1970), aunque no fue hasta la aparición de las nuevas técnicas de secuenciación de ADN cuando se confirmó su naturaleza fúngica.

En este sentido, diferentes estudios filogenéticos con secuencias de ARN ribosómico muestran una mayor similitud con levaduras, ya sean Ascomicetos como *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pombe*, *Candida albicans*, etc. o incluso Basidiomicetos como *Cryptococcus neoformans*, que con las diferentes secuencias ribosómicas de protozoos por entonces conocidas (Edman et al. 1988; Stringer et al. 1989; Edman, Kovacs, et al. 1989; Edman, Kovacs, et al. 1989). Además, también descubrieron que las secuencias codificantes para las enzimas timidilato sintasa (EC 2.1.1.45) y la dihidrofolato reductasa (EC 1.5.1.3) se encontraban en cromosomas diferentes a diferencia que en protozoos donde ambas actividades comparten una misma cadena polipeptídica (Edman, et al. 1989; Edman U, Edman JC, Lundgren B 1989) situándolo, de esta forma, definitivamente en el Reino Fungi.

Posteriores análisis filogenéticos con las diferentes secuencias que se han ido obteniendo durante estos años ( $\alpha$  y  $\beta$ -tobulina, actina, factor de transcripción TBP, ATPasa tipo P, factores de elongación, etc.) lo situaron en una rama entre los Ascomicetos y los Basidiomicetos. Aunque también por su secuencia ribosómica 5S se sugirió su inclusión entre los Zigomicetos

Confirmándose más recientemente su posición filogenética mediante estudios del transcriptoma que muestran la gran homología entre los transcritos de *Pneumocystis* y levaduras como *S. cerevisiae* y *S. pombe* u hongos filamentosos como *Aspergillus spp.* o *Neurospora crassa* (Cushion & Smulian 2006).

En la actualidad *Pneumocystis* tiene una identidad taxonómica propia dentro de los Ascomicetos como su propio género (Eriksson 1994; Haase 1997):

*Phylum Ascomicota*

*Subphylum Taphrynomicotina*

*Orden Pneumocystisdales*

*Clase Pneumocystisdomycetes*

*Familia Pneumocystidaceae*

La modificación de su clasificación filogenética debido a la aplicación al estudio de *Pneumocystis* de las técnicas moleculares ha conllevado el cambio de su nomenclatura zoológica por la nomenclatura botánica propia de los hongos (Cushion & Stringer 2005; Gigliotti 2006).

En cuanto a las especies que componen el género *Pneumocystis*, aunque se ha encontrado en pulmones de numerosos mamíferos, dado que tanto la morfología del microorganismo como las características patológicas asociadas a la PcP en los diferentes mamíferos que infectaba eran similares se consideró una sola especie con diferentes cepas que colonizaban distintos hospedadores. Con lo que se denominaban mediante una nomenclatura trinomial acorde con el Código Internacional de Nomenclatura Botánica, así cada cepa se denominaba con los descriptores género y especie comunes a todos ellos “*Pneumocystis carinii*” y un tercer identificador que hacía alusión al hospedador.

Sin embargo ahora ya sabemos que se trata de diferentes especies exclusivas para cada hospedador (Gigliotti et al. 1993), por lo que actualmente se ha vuelto a la nomenclatura clásica binomial. En este sentido la especie que infecta al ser humano se denomina *Pneumocystis jirovecii*, en honor al parasitólogo checo Otto Jirovec que fue el primero en relacionar al microorganismo con la enfermedad en humanos, término que fue acuñado por Frenkel que ya incluso en 1976 observó la singularidad de *Pneumocystis carinni sp. f. hominis* como una especie diferente (Frenkel 1976), aunque no fue hasta más recientemente (Frenkel 1999) cuando empezó a ser ampliamente aceptada esta terminología binomial, si bien no carente de un amplio debate (Stringer et al. 2002; Cushion & Stringer 2005; Gigliotti 2006; Limper 2006; Hawksworth 2007; Mohapatra & Aggarwal 2008).

Figura 1. Árbol filogenético de *Pneumocystis* basado en el gen de la  $\beta$ -tubulina

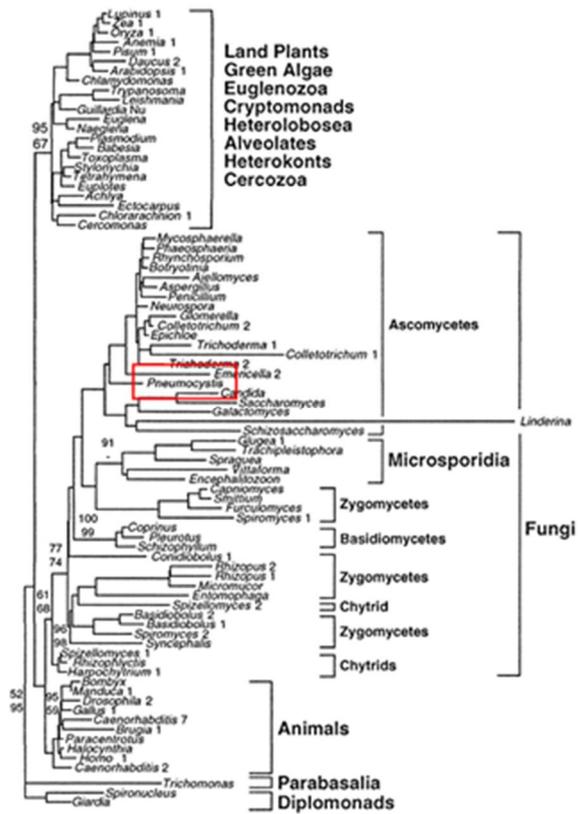
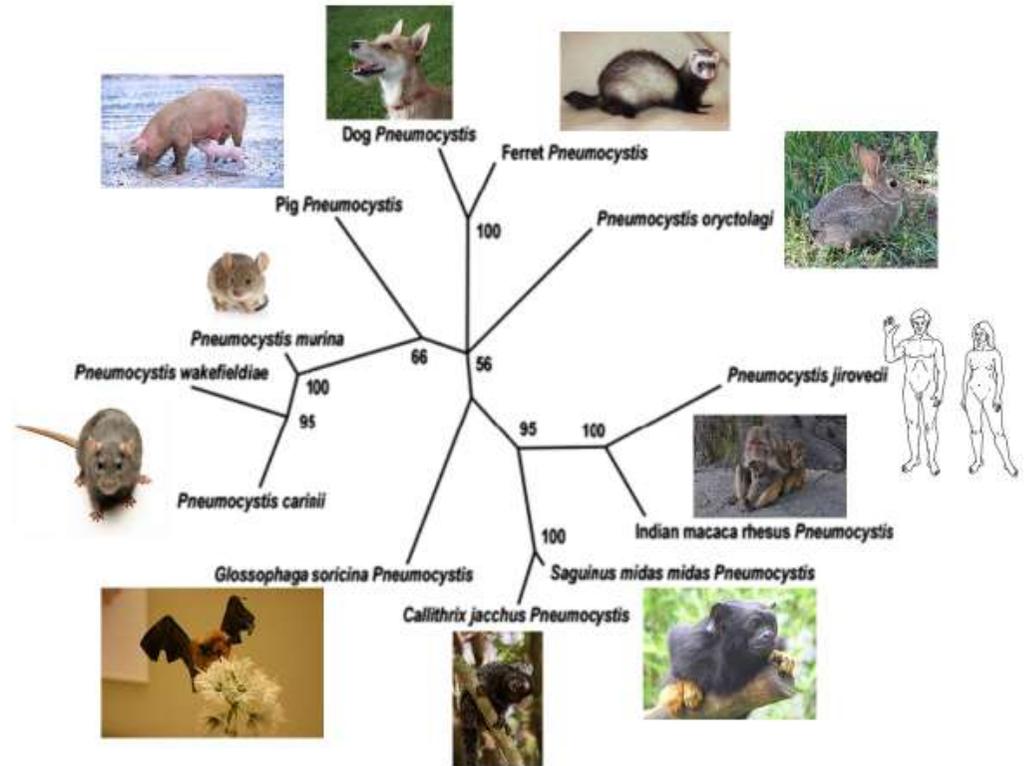


Figura 2. Árbol filogenético de las diferentes especies del género *Pneumocystis*



(Chabé et al. 2011)

### 1.3. Colonización por *Pneumocystis*

La utilización de herramientas de diagnóstico molecular, tales como la PCR anidada para la detección de *Pneumocystis* (Wakefield, Pixley, et al. 1990) ha permitido demostrar la presencia de *Pneumocystis jirovecii* en diferentes muestras biológicas de sujetos sin manifestaciones clínicas ni radiológicas de neumonía. Este fenómeno ha recibido diferentes nombres como portador asintomático o infección subclínica (Peterson & Cushion 2005), pero ya es ampliamente aceptado el termino de colonización (Maskell et al. 2003; Wakefield et al. 2003; Morris & Norris 2012; Calderón-sandubete et al. 2011).

Esta colonización puede ser detectada mediante técnicas de diagnóstico estandarizadas, pero dado la baja carga del microorganismo en la que se presenta en colonización las técnicas moleculares de amplificación de secuencias de ADN se hacen indispensables, siendo la PCR anidada del locus mtLSU la más usada, si bien actualmente también están empezando a utilizarse tanto otros *loci* como PCR a Tiempo Real ya sea por fluorescencia de ADN de doble cadena o mediante sondas específicas.

Por lo que en este sentido se considera que un individuo se encuentra en estado de colonización por *P. jirovecii* cuando sin padecer PcP detectamos ADN del microorganismo mediante el uso de técnicas de amplificación. En cuanto al tipo de muestras utilizadas para determinar la presencia de colonización han sido varias, así se considera como óptimas las muestras de lavado broncoalveolar, pero también está ampliamente extendido y corroborado el uso de cortes histológicos de tejido pulmonar, gargarismos orofaríngeos, esputos y aspirados nasofaríngeos.

El estudio de la colonización por *Pneumocystis* puede tener un impacto significativo no solo para el conocimiento del ciclo de vida del microorganismo sino también para esclarecer sus posibles implicaciones clínicas, tales como el riesgo de que pacientes colonizados puedan desarrollar futuras PcP o ser foco de transmisión a pacientes inmunodeprimidos susceptibles, que la profilaxis a largo plazo contra *Pneumocystis* pueda llevar a la selección de mutaciones asociadas a resistencia a fármacos o que incluso su presencia pueda conducir a una peor progresión de las diferentes enfermedades de base que presenten los sujetos colonizados.

Así, desde la descripción por primera vez en pacientes no inmunodeprimidos (Calderón et al. 1996) numerosos estudios han mostrado la presencia de colonización por *Pneumocystis* en pacientes con diferentes enfermedades pulmonares como la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), la fibrosis quísticas, enfermedades pulmonares intersticiales e incluso en pacientes con cáncer de pulmón (Probst et al. 2000; de la Horra et al. 2004; Montes-Cano 2004; S Gutiérrez et al. 2011). La colonización por *Pneumocystis* también está presente en pacientes inmunodeprimidos o con patologías que requieran de tratamiento con inmunosupresores (Wissmann, et al. 2011), así como en población general tanto infantil como adulta y en personal sanitario.

En animales numerosos estudios han demostrado que la colonización es un fenómeno ampliamente distribuido, detectado en numerosas especies de roedores, ungulados y primates (Laakkonen et al. 2001; Patil et al. 2003, Demanche et al. 2005; Morris & Norris 2012) tanto estabulados como de vida silvestre, presentándose *Pneumocystis* en algunos casos en tasas muy elevadas. Así en roedores hay estudios que muestran tasas de colonización del 98% en muestras orofaríngeas (Icenhour et al. 2001a; Icenhour et al. 2001b). En un grupo de macacos en libertad, también se observaron tasas elevadas de colonización, presentando en algún momento todos los miembros del grupo colonización por *Pneumocystis* durante un estudio longitudinal. Al igual que en un grupo de macacos estabulados para investigación donde también se detectó no solo la presencia microorganismo en individuos sanos sino también que el 95% de ellos presentaba anticuerpos frente a *Pneumocystis* (Kling et al. 2009).

En el ser humano, numerosos estudios han mostrado la presencia de colonización por *Pneumocystis* tanto en pacientes con diversas y variadas patologías como en población sana, encontrando tasas de prevalencia variables que pueden ser explicadas por el tipo y cantidad de muestra utilizada para el análisis y el método de detección empleado, así como por las características de la población estudiada, sus patologías, el tratamiento clínico recibido, su distribución geográfica así como otra serie de factores que se han asociado con un mayor o menor riesgo de colonización como se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Factores de Riesgo de Colonización

<b>Asociados a situaciones clínicas</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Otros</b>
<i>Infección VIH</i>		
<i>EPOC</i>	<i>Corticoesteroides</i>	<i>CD4+ bajo</i>
<i>Embarazo</i>	<i>Inhibidores de TNF-<math>\alpha</math></i>	<i>Tabaco</i>
<i>Inmunodepresión</i>	<i>Uso de Inmunosupresores</i>	<i>Localización geográfica</i>
<i>Infancia</i>		<i>Antecedentes de PcP</i>
<i>Trasplante de órganos</i>		<i>Abandono quimioprofilaxis</i>
<i>Fibrosis Quística</i>		
<i>Infección respiratoria</i>		

En pacientes inmunodeprimidos con infección por el VIH sin neumonía, la colonización por *Pneumocystis* parece ser un fenómeno muy frecuente, aunque las tasas varían enormemente yendo desde poco más del 14% hasta casi el 70% según los diferentes estudios (Nevez et al. 1997; Huang et al. 2003) aunque estas discrepancias en las tasas de colonización son fácilmente explicables tanto por el diferente tipo de muestras y el método de análisis utilizado como por la heterogeneidad de los grupos estudiados.

Algunos estudios han encontrado una asociación entre el incremento en las tasas de colonización y el bajo recuento de linfocitos CD4+ (Leigh et al. 1993), si bien este aspecto es aún debatido, sí parece que la presencia de neumonías no PcP u otras enfermedades asociadas o subyacentes, el hábito tabáquico o la situación geográfica se relacionan con mayores tasas de colonización (Huang et al. 2003; Morris, Kingsley, et al. 2004).

En pacientes inmunocomprometidos o que reciben terapia inmunosupresora también se ha observado colonización por *Pneumocystis*. En un estudio con pacientes que presentaban inmunodeficiencia secundaria causada por diversas patologías se encontró una tasa de colonización del 15% (Nevez et al. 1999). Parece que el recuento de células CD4+ y el tratamiento con corticoesteroides se relacionan con un incremento en la tasa de colonización. Así se ha visto en un estudio con un 16% de colonización total que en los pacientes con menos de 400 células CD4/mm<sup>3</sup> la prevalencia aumentaba hasta un 30% (Mekinian et al. 2011) y en relación al uso de corticoesteroides en un estudio en el que se incluyeron 80 pacientes con neumonía bacteriana, el 75% de los individuos colonizados habían recibido tratamiento con corticoides (Helweg-Larsen et al. 2002) , y en otro estudio a partir de lavado broncoalveolar se encontró tasas de colonización del 44% en pacientes tratados con prednisona frente a un 12% de los no tratados con glucocorticoides (Maskell et al. 2003).

En pacientes con artritis reumatoide tratados con dosis bajas de metotrexato se han encontrado tasas de colonización cercanas al 20% e incluso en el estudio uno de los pacientes acabó desarrollando PcP (Mori et al. 2008) no siendo el único estudio en el que se relaciona este tratamiento con el desarrollo de PcP (Okuda et al. 1995; Stenger et al. 1994; Kaneko et al. 2006). Además tras un seguimiento de los pacientes colonizados del estudio de Mori, los autores señalan el beneficio clínico que podría suponer el uso de profilaxis frente a *Pneumocystis* (Mori et al. 2009). También en este tipo de pacientes parece que la administración de fármacos anti-TNF pueden ser un riesgo en la adquisición de *Pneumocystis*, así se han publicado casos de PcP asociados con el uso de infliximab (Mori et al. 2006) y en nuestro medio se ha encontrado una prevalencia de colonización en torno al 29%, en un estudio en pacientes con artritis reumatoide tratados con este fármaco que muestra una relación estrecha entre el incremento de colonización y el tiempo de uso del infliximab (Wissmann et al. 2011).

En pacientes con enfermedades pulmonares, desde la demostración por parte de nuestro grupo de la existencia de colonización en pacientes no inmunodeprimidos con bronquitis crónica mediante técnicas de microscopía convencionales (Calderón et al. 1996), numerosos estudios han mostrado la presencia de *Pneumocystis* en pacientes con diversas enfermedades respiratorias como son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fibrosis quística, diversas enfermedades pulmonares intersticiales e incluso en cáncer de pulmón (S. Gutiérrez et al. 2011).

En pacientes con EPOC las tasas de colonización varían bastante de unos estudios a otros, variando desde un 16 % hasta un 55% (Nevez et al. 2006; Calderón et al. 2004) . Discrepancias que se han relacionado con el área geográfica sugiriendo que la colonización podría verse afectada por factores ambientales y climáticos existiendo por tanto áreas geográficas de bajo y alto riesgo (Varela et al. 2004).

Existen varios hallazgos que nos hacen pensar que la presencia de *Pneumocystis* podría jugar un papel importante en la fisiopatología de la EPOC, observándose una correlación entre la colonización y el grado de obstrucción de las vías aéreas (Morris, Sciurba, et al. 2004) así como un incremento en la respuesta inflamatoria sistémica (Calderón et al. 2007; Morris et al. 2008). Por otra parte, en referencia al hábito tabáquico, que es considerado una de las principales causas de la EPOC, aunque solo un pequeño porcentaje de los fumadores padezcan dicha enfermedad, se ha observado también que es un riesgo asociado al incremento de la

colonización tanto en personas con infección VIH (Morris, Kingsley, et al. 2004) como en pacientes con enfermedades intersticiales (Vidal 2006). Por otra parte, se ha observado en modelos experimentales de EPOC donde los animales son expuestos al humo del tabaco que se produce un aumento de la carga de *Pneumocystis* y un prematuro desarrollo de enfisema (Christensen et al. 2008).

Dentro del heterogéneo grupo de las enfermedades pulmonares intersticiales, existen estudios que implican a agentes infecciosos en los procesos inflamatorios e inmunológicos que desencadenan en la fibrosis pulmonar (Egan et al. 1997; du Bois et al. 2003), papel que podría desempeñar también *Pneumocystis jirovecii*, dado que los estudios muestran unas tasas de colonización entorno al 30% que no varían ostensiblemente entre las diferentes enfermedades pulmonares intersticiales (Vidal 2006; Shimizu et al. 2009) y se ha observado que los pacientes con neumopatías intersticiales colonizados presentaban niveles elevados de leucocitos y eosinófilos en sangre periférica, así como una razón CD4/CD8 menor en muestras de lavado broncoalveolar (Martín-Juan et al. 2008).

En otro tipo de patología pulmonar, como es el caso de los pacientes con fibrosis quística también se han encontrado tasas de colonización variables, mostrando tasas que van desde el 7 al 20 % en Europa (Respaldiza et al. 2005; Sing et al. 2001) hasta el 38% en Brasil (M. A. Pederiva et al. 2012), diferencias explicables por las diferencias climatológicas entre zonas geográficas, así como por el diferente tratamiento administrado. La colonización por *Pneumocystis* no parece ser un factor de riesgo para producir PcP en este tipo de pacientes, aunque la frecuencia con la que las personas con fibrosis quística sufren infecciones bacterianas podría promover un nicho adecuado para que *Pneumocystis* pudiera actuar como factor de comorbilidad estimulando la inflamación pulmonar (Morris et al. 2008), si bien no es conocida su interacción con las bacterias patógenas del tracto respiratorio en estos pacientes, sí que se ha observado una potencial relación antagonista entre la colonización por *P. jirovecii* y la microbiota en el tracto respiratorio de pacientes con neumopatía intersticial (Friaiza et al. 2010).

Por último, sobre pacientes, con enfermedades pulmonares, nuestro grupo puso en evidencia la asociación entre el cáncer de células pequeñas de pulmón y la colonización por *Pneumocystis* en un estudio donde todas las muestras procedentes de autopsias de pacientes con carcinoma de células pequeñas fueron positivas frente al 20% de las muestras procedentes de otros tipos de cáncer de pulmón (de la Horra et al. 2004). En otro estudio más reciente la

tasa de colonización en pacientes con cáncer de pulmón fue del 31% frente al 5% obtenido en pacientes con tumores sólidos no pulmonares (Mori et al. 2010). Hechos que hay que tener en cuenta dado que el hábito tabáquico, asociado a prevalencias altas de *Pneumocystis*, es el factor de riesgo más importante en cáncer de pulmón y además actualmente se considera que en torno a un 15% de los tumores en el hombre podrían tener un origen infeccioso (Pisani et al. 1997).

En población sana adulta, nuestro grupo puso por primera vez en relevancia la presencia de ADN del patógeno en un estudio en el que se evaluaron muestras de enjuagues orofaríngeos de 50 profesionales sanos del personal del Hospital Universitario Virgen del Rocío no expuestos al contacto directo con pacientes, encontrándose una tasa de colonización cercana al 20% y observando que durante un seguimiento de seis meses todos los sujetos permanecían asintomáticos y que solo dos casos continuaron colonizados al finalizar el estudio (Medrano et al. 2005), demostrando de este modo que el ADN de *P. jirovecii* podía ser amplificado a partir de muestras no invasivas del tracto respiratorio de sujetos sanos, así como la transitoriedad del estado de colonización.

Con anterioridad se habían publicado otros estudios en los que no encontró este fenómeno de colonización en población sana, posiblemente debido al reducido número de sujetos incluidos, así como la sensibilidad de las técnicas empleadas para la detección del microorganismo, en algunos casos microscopía convencional (Peters et al. 1992) o amplificación de ADN por PCR simple (Wakefield, Pixley, et al. 1990). Ya utilizando la PCR anidada no se encontró colonización en un estudio en el que usaron muestras de esputo de 20 hombres sin infección por el VIH como grupo de control (Leigh et al. 1993), ni en Chile donde se estudiaron como población control 33 mujeres inmunocompetentes (Vargas et al. 2003a).

Sin embargo, recientes hallazgos han confirmado como un fenómeno relativamente frecuente la colonización en adultos sanos, así una cohorte de 110 adultos mayores de 65 años inmunocompetentes presentó una tasa de colonización del 13% a partir de muestras de lavado orofaríngeo (Vargas et al. 2010) y en otro estudio a partir de autopsias se encontró un 64,9% de colonización (Carolina A. Ponce et al. 2010). Todo esto sugiere que puede ser más común la colonización por *Pneumocystis*, aunque sea en niveles bajos, en sujetos inmunocompetentes de lo que se pensaba (Morris & Norris 2012).

En lo referente a la población infantil, la exposición a *Pneumocystis* durante los primeros años de vida es un fenómeno bastante conocido desde finales de los años 70 gracias a los trabajos de serología, que ya ponían de manifiesto en un estudio realizado con 120 niños

que dos tercios de ellos presentaban anticuerpos anti-*Pneumocystis* (Pifer et al. 1978). Siendo estas altas tasas de anticuerpos frente el microorganismo corroboradas en posteriores estudios serológicos llevados a cabo en niños sanos de diferentes áreas geográficas (Wakefield et al. 1990; S L Vargas et al. 2001; Respaldiza et al. 2004).

Pero no fue hasta 1999 cuando con la utilización de técnicas inmunohistoquímicas se puso de manifiesto la presencia de *Pneumocystis* en tejido pulmonar infantil (Vargas et al. 1999) y los primeros estudios con PCR anidada datan de 2001 en los que se encontró una frecuencia de colonización del 24% en niños con bronquiolitis (Nevez et al. 2001). Estudios posteriores han confirmado que la colonización también está presente en niños sanos y que aparece frecuentemente en infantes con enfermedades pulmonares o con patologías inmunosupresoras, encontrándose prevalencias del 32% en niños con infecciones respiratorias leves (S. L. Vargas et al. 2001) o del 24,6% en otro estudio de niños con bronquiolitis (Totet et al. 2003).

La asociación de la muerte súbita del lactante ha sido ampliamente debatida, ya en 1999 el Dr. Vargas encontró tasas de colonización del 35% en niños chilenos y del 15 % en niños británicos fallecidos por esta causa (Vargas et al. 1999), Morgan encontró un 14% en niños estadounidenses (Morgan et al. 2001), en otro estudio en Norteamérica, el 100% de 58 niños fallecidos con menos de un año de edad, tanto por muerte súbita como por otras causas fueron positivos para el gen mtLSU de rRNA de *Pneumocystis* (Beard et al. 2005). Sin embargo este mismo grupo no encontró en otro estudio más reciente, diferencias significativas entre colonización en niños fallecidos por muerte súbita y los fallecidos por causa accidental (Vargas et al. 2007) por lo que la relación entre *Pneumocystis* y la muerte súbita del lactante sigue siendo muy controvertida.

Por último, un grupo poblacional que también se ha demostrado muy susceptible a la colonización por *Pneumocystis* son las mujeres embarazadas, posiblemente por las alteraciones en el sistema inmune que conllevan un estado de inmunotolerancia con cierto grado de inmunodepresión (Wissmann et al. 2010; Lapinsky 2013). El análisis de las secreciones nasales de las mujeres embarazadas mostró que el 15 % de las mujeres incluidas en el estudio estaban colonizadas (n =33) en el tercer trimestre, en cambio en ninguna de las no embarazadas se identificó la presencia de *Pneumocystis* (Vargas et al. 2003b). En esta línea, también se han descrito episodios concomitantes de PcP en una madre y su hijo de un mes de vida, y en modelos animales se ha observado colonización en el 80% de ratones a las dos horas de su

nacimiento y prácticamente de un 100% a las 48 horas (Icenhour et al. 2002a), lo que apoya la hipótesis de la transmisión materno-filial, por lo que las mujeres embarazadas podrían tener una especial relevancia como reservorio y fuente de transmisión de *Pneumocystis* al recién nacido.

#### **1.4. Adquisición de *Pneumocystis***

La vía de adquisición de la infección por *Pneumocystis*, ha sido un tema ampliamente debatido durante décadas, planteándose dos hipótesis principales: la infección por medio de la reactivación de un foco latente del microorganismo como causante de la PcP en estados de inmunodepresión del paciente o la teoría de la adquisición reciente.

##### **1.4.1. Hipótesis de la reactivación**

Las primeras corrientes de pensamientos defendían la hipótesis de la reactivación y que por tanto, la adquisición de la infección se producía en los primeros años de vida y los episodios de neumonía se daban en estadios de inmunosupresión del paciente por reactivación de organismos preexistentes en el tejido pulmonar (Herrag et al. 2010). Apoyada inicialmente por el descubrimiento de *Pneumocystis* en ratas sanas e inmunocompetentes (Frenkel 1976) y por los trabajos del Dr. Walzer con modelos animales, en los que a diferentes estirpes de ratones sanos, aparentemente libres de *Pneumocystis*, con el uso de corticoides inducían un estado de inmunosupresión que los llevaba a desarrollar PcP (Walzer et al. 1979), lo que al no conocerse aún el fenómeno de colonización, hacía pensar que el patógeno se encontraba latente en el pulmón del animal.

También se ve apoyada esta teoría por la elevada colonización y seroprevalencia frente a *Pneumocystis* observada tanto en niños sanos como inmunodeprimidos (Pifer et al. 1978; Wakefield, Stewart, et al. 1990; S. L. Vargas et al. 2001), aunque es probable que este fenómeno sea debido a que en los primeros años de vida aún no se encuentra totalmente maduro el sistema inmune favoreciendo la primoinfección y el mal aclaramiento del microorganismo como se ha demostrado en modelos animales (Allaert et al. 1996).

Todo esto unido al hecho de que aún no existen cultivos continuos en los que *Pneumocystis*, sea cual sea la especie, pueda proliferar in vitro pueden llevarnos a pensar que la viabilidad de este microorganismo más allá del pulmón del huésped es muy breve, sino imposible.

### 1.4.2. Hipótesis de la adquisición reciente

Por otro lado también son numerosas las evidencias que corroboran la hipótesis de la adquisición reciente, ya en 1996 se publicó un estudio en el que se ponía de relevancia la falta de concordancia en los genotipos de *P. jirovecii* encontrados en pacientes con SIDA que habían sufrido episodios de recurrentes PcP (Keely & Stringer 1996). En 1998 en un estudio llevado a cabo mediante inmunofluorescencia en muestras de esputo mostraba que a las seis semanas de un episodio de PcP solo en el 24% de los pacientes se detectaron quistes de *Pneumocystis jirovecii*, habiendo aclarado el resto de ellos (O'Donnell et al. 1998).

Otros estudios que apoyan la adquisición reciente son la presencia de agrupamientos geográficos en los genotipos de *Pneumocystis* en varios brotes de PcP (de Boer et al. 2007). Así en este sentido, otro estudio en Estados Unidos encuentra una variación geográfica en la distribución de genotipos de *P. jirovecii* revelando que en pacientes con PcP el genotipo se correlacionaba con la ciudad de residencia en el momento del diagnóstico y no con la ciudad natal (Beard et al. 2000). También existen estudios que confirman la presencia de mutaciones en el gen de la DHPS de *Pneumocystis*, mutaciones que en otros organismos están relacionadas con la resistencia al tratamiento con sulfamidas en pacientes con PcP que no habían sido previamente tratados con estos fármacos (Huang et al. 2000). Asimismo, existen estudios serológicos en que la alta tasa de exposición encontrada no se correlaciona con la prevalencia de colonización determinada por técnicas de biología molecular, normalmente más sensibles que las inmunológicas, y en los que se muestra la presencia de ciclos de colonización-aclaramiento (Respaldiza et al. 2005).

Finalmente los trabajos realizados con modelos animales descartan la hipótesis de la reactivación y confirman la teoría de la adquisición reciente, así un estudio en el que se llevó a cabo un seguimiento de un año en ratas, estabuladas en condiciones de esterilidad, a las que se inmunosuprimió con dexametasona para inducirles una primoinfección, se observó que tras recuperarse de la PcP al estabularlas en nuevas cabinas de aislamiento, a intervalos creciente de tiempo, tras volverlas a suprimir inmunológicamente, en aproximadamente el 75% de los casos no se produjo una nueva PcP ni se encontraron pruebas de la presencia del microorganismo transcurrido un año, ya fuera por técnicas histológicas o moleculares, confirmando la erradicación completa del patógeno, lo que implica la ausencia de organismos latentes o que la presencia de estos es limitada en el tiempo (Vargas et al. 1995), Además con el conocimiento actual de la existencia de colonización por *Pneumocystis*, que es ampliamente

aceptada, explicaría de manera fundamentada el estudio del Dr. Peter Walzer en el que ratones sanos desarrollaban PcP al inmutarlos.

Todos estos estudios han llevado a que la teoría de la adquisición reciente sea la más ampliamente aceptada en la actualidad, y quedando prácticamente confirmada en modelos animales.

En cuanto a las posibles fuentes de infección se ha detectado ADN de *Pneumocystis* en agua de charcas, en muestras de aire, principalmente en habitaciones con pacientes con PcP, suponiéndole capacidad infectiva (Bartlett & Lee 2010), sin embargo, nunca se ha podido confirmar la presencia de este microorganismo en el ambiente por técnicas microscópicas. Estudios comparativos de ADN de *Pneumocystis* obtenido a partir de distintos mamíferos, han demostrado que las especies infectivas para cada animal son diferentes y estudios con modelos animales han demostrado la imposibilidad de que se produzcan infecciones cruzadas interespecíficas, poniendo de manifiesto el gran estenoxenismo existente entre las diferentes especies de *Pneumocystis* con su respectivo huésped.

El hecho de que hasta ahora ningún reservorio ambiental haya sido descubierto, aunque no se pueda aún excluir esa posibilidad, descartada la zoonosis por la alta especificidad de *Pneumocystis* (Aliouat et al. 1994; Durand-Joly et al. 2002) y el conocimiento actual de estado de colonización por *P. jirovecii* tanto en individuos sanos como en sujetos con gran diversidad de patologías (Carolina A Ponce et al. 2010; Wissmann et al. 2010), nos lleva a pensar que la PcP en el hombre es una antroponosis donde el único reservorio es el propio ser humano. De hecho existe una hipótesis interesante, que sugiere que los niños en particular son este reservorio, sustentado en la alta seroprevalencia frente a *Pneumocystis*, que llega a alcanzar hasta el 85 % a los 20 meses de edad. Además, también se ha visto una elevada tasa de colonización tanto en niños sanos como en aquellos con síntomas respiratorios (S. L. Vargas et al. 2001).

## 1.5. Transmisión de *Pneumocystis*

### 1.5.1. Transmisión Horizontal

La vía concreta de transmisión de un individuo a otro, así como la forma infectiva del parásito aún no ha sido del todo esclarecida, si bien actualmente la vía aérea es la más comúnmente aceptada y apoyada en la transmisión de *Pneumocystis*. Siendo corroborada por numerosos estudios en modelos animales.

Así, uno de los primeros estudios que apoyaban esta teoría fue llevado a cabo con ratas inmunosuprimidas con dexametasona a las que se expuso de manera selectiva a agua, comida o aire contaminados con el microorganismo; solo los animales expuestos al aire, al no estar estabulados en jaulas con filtro, desarrollaron PcP (Hughes 1982). La existencia de transmisión aérea ha quedado definitivamente corroborada por posteriores y numerosos estudios con modelos animales (Boylan & Current 1992; Sanchez et al. 2007) siendo interesante resaltar los trabajos realizados en Lille bajo la supervisión del Dr. Eduardo Dei-Cas en los que mediante el uso combinado de ratones SCID, susceptibles a las infecciones oportunistas al carecer de linfocitos funcionales, y ratones BALB/c inmunocompetentes, no solo queda demostrada la transmisión por vía aérea, el fenómeno de colonización por *Pneumocystis*, hasta entonces muy debatido, sino también, la capacidad infectiva desde ratones inmunocompetentes colonizados hacia los inmunosuprimidos, así como el tiempo de exposición necesario para adquirir la infección (Dumoulin et al. 2000; Chabé et al. 2004).

Demostrada la transmisión de *Pneumocystis* por vía aérea en animales, se le presupone que debe constituir una de las formas de transmisión en humanos, si bien no está totalmente demostrada, no solo se apoya en las evidencias obtenidas a partir de los estudios con modelos animales. Así, se ha detectado en muestras de aire filtrado, procedente de habitaciones ocupadas por pacientes con PcP, no solo ADN de *P. jirovecii* sino también ARNm, sugiriendo que el patógeno es viable en el ambiente hospitalario (Bartlett et al. 1997; Olsson et al. 1996).

En cuanto a la forma infectiva de *Pneumocystis*, de ser las formas tróficas se plantea un modelo similar al de *Mycobacterium tuberculosis*, dado el tamaño de los trofozoitos que van desde los 2 a los 4  $\mu\text{m}$ , estos serían expectorados como gotitas de Pflugge desde el paciente infectado (Ng et al. 1997), por otro lado parece ser que los quistes maduros presentes en el lumen bronquial podrían alcanzar el medio ambiente y por tanto poder transmitirse, además su

estudio por microscopia electrónica de transmisión demuestra que estarían mejor dotados para mantener la capacidad infectiva durante la transmisión aérea (Nevez et al. 2008). En este sentido, estudios recientes han demostrado que el tratamiento previo con caspofungina que destruye solo los quistes pero no los trofozoitos evita la transmisión de *Pneumocystis* desde ratones con PcP (Cushion et al. 2010).

### 1.5.2. Transmisión vertical

Las infecciones verticales se definen como aquellas adquiridas por el neonato como consecuencia de padecerlas su madre durante la gestación. Esta transmisión puede ser “in utero” o prenatal, ocurriendo antes del nacimiento por la vía transplacentaria o por ruta ascendente a través de la vagina. Pueden ser Perinatal, produciéndose en el momento del nacimiento, al paso del neonato por el canal del parto. Englobando el término también las transmisiones por rutas postnatales tales como las producidas durante la lactancia materna.

Las infecciones que pueden ocurrir durante el embarazo y que signifiquen un riesgo para el feto son muy numerosas y los microorganismos implicados muy variados convirtiéndolo en un tema muy extenso de difícil abordaje. Pero la mayoría de los datos que se tienen sobre eucariotas capaces de provocar infecciones congénitas por vía transplacentaria en el ser humano son parásitos de origen protozoario, entre los que se encuentran *Trypanosoma cruzi* (Fernandez-Aguilar et al. 2005) y siendo el ejemplo más significativo *Toxoplasma gondii* (Barragan & Sibley 2003; Hampton 2015).

En *Pneumocystis* la ruta aérea es reconocida como la más común e importante en modelos animales y como se ha comentado anteriormente parece que también lo es en humanos. Sin embargo, dado las numerosas evidencias indirectas tales como: la temprana adquisición de *Pneumocystis* en diferentes especies, su alta prevalencia en infantes y la presencia de colonización en embarazadas (Vargas et al. 2003b), así como la existencia de neumocistosis extrapulmonares, que evidencian la diseminación hematogena de este patógeno, se ha planteado la posible existencia de transmisión vertical por parte de *Pneumocystis*, mecanismo además por el que podría asegurar su persistencia independientemente de las circunstancias ambientales.

En este sentido, incluso ya antes del comienzo de la epidemia de SIDA se sugiere esta posibilidad ante la existencia de casos de PcP en recién nacidos (Pavlica F. 1962; Bazaz et al. 1970). En 1995 un controvertido estudio mostró la presencia, mediante tinción de cortes histológicos, de quistes de *Pneumocystis* en macrófagos pulmonares obtenidos a partir de la autopsia de un feto de una madre con infección VIH y PcP (E Mortier et al. 1995), que no

pudo ser corroborado utilizando inmunofluorescencia con anticuerpos específicos por lo que dichos resultados fueron bastante cuestionados (W. Hughes 1995).

En modelos animales la transmisión vertical transplacentaria de *Pneumocystis* no parece ocurrir en ratas y ratones con inmunodeficiencia grave (Ito et al. 1991; Sanchez et al. 2007; Icenhour et al. 2002b), sin embargo, sí ha sido demostrada la transmisión *in útero* en conejos donde además se ha visto una mayor carga parasitaria en los animales ¿preñados? Y un aumento en la colonización de las placentas a mayor tiempo de embarazo asociándolo a la mayor permeabilidad de éstas durante la última fase de embarazo estando el feto más expuesto a los parásitos que circulen por el torrente sanguíneo materno (Cere et al. 1997; Sanchez, Chabé, Aliouat, Durand-Joly, Gantois, Conseil, López, Duriez, Dei-Cas, Sergio L. Vargas, et al. 2007). El hecho de que esta transmisión no se dé en ratas y ratones y sí en conejos se puede ser debido por la diferente estructura placentaria de estos mamíferos, siendo la del conejo al menos hasta casi las tres semanas de gestación hemocoriónica, al igual que en humanos y más parecida a la nuestra que a la de ratas y ratones por lo que se postula que esta vía también sería posible en mujeres, y de hecho, recientemente, se ha publicado la primera evidencia molecular de la existencia de transmisión transplacentaria en humanos, que abre las puertas a un nuevo campo de investigación en *Pneumocystis* con profundas implicaciones en la clínica y en la epidemiología del microorganismo (Montes-Cano et al, 2009).

## **1. JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO**

## 2. JUSTIFICACIÓN

Existe una considerable proporción de embarazos, que puede oscilar entre un 12 y un 22%, que no llegan a buen término. El conocimiento actual sobre las causas que explican este fenómeno es limitado. La mayoría de los abortos espontáneos ocurren durante el primer trimestre del embarazo en relación con anomalías cromosómicas del feto, mientras que los que ocurren más tarde se relacionan con factores extrínsecos o de la madre (Brown 2008; García-Enguídanos et al. 2002a). Las infecciones intrauterinas son una causa bien establecida de rotura prematura de las membranas y parto pretérmino, habiéndose identificado una variedad de gérmenes que actuarían produciendo un aumento de citoquinas proinflamatorias, prostaglandinas y metaloproteasas que conduce a la maduración del cuello uterino, la rotura de membranas, las contracciones y el parto prematuro (Han et al. 2009; Romero, Espinoza, L. F. Gonçalves, et al. 2007). En esta misma línea, diversos estudios han confirmado el papel de las infecciones como causa de abortos espontáneos, sobre todo durante el segundo trimestre del embarazo (McDonald & Chambers 2000; Matovina et al. 2004). Aunque los microorganismos pueden acceder a la placenta y el feto por vía hematogena, como el protista *Toxoplasma gondii*, se considera que en la mayoría de los casos la infección se produce por vía ascendente desde el tracto genital, por lo que gran parte de los estudios han intentado relacionar estas complicaciones obstétricas con la flora bacteriana presente en la vagina y el cuello uterino embarazo (McDonald & Chambers 2000; Matovina et al. 2004). Diversos hongos pueden formar parte también de la microbiota presente en el tracto genital femenino. De hecho, las infecciones cervicovaginales por *Candidas* pueden afectar a un 20% de las mujeres embarazadas, pero la incidencia de infecciones ascendentes es menor del 1% y parece que raramente causa complicaciones en el embarazo (Friebe-Hoffmann et al. 2000). Sin embargo, las infecciones fúngicas constituyen una de las principales causas de abortos en el ganado bovino (Kirkbride 1992).

El hecho de que las mujeres embarazadas puedan estar colonizadas por *Pneumocystis jirovecii*, junto con la reciente demostración de la capacidad de este microorganismo de transmitirse verticalmente y la alta tasa de infección documentada en abortos espontáneos obligan a plantear el papel que este microorganismo puede desempeñar alterando el desarrollo normal del embarazo en la especie humana.

El género *Pneumocystis* contiene numerosas especies muy bien adaptadas a sus huéspedes específicos con los que llevan coevolucionando desde hace millones de años (Thomas & Limper 2007). En este sentido, la ruta de transmisión transplacentaria podría constituir un mecanismo de adaptación que garantizaría la persistencia del microorganismo con independencia de las circunstancias ambientales que pueden afectar la transmisión.

La capacidad de *Pneumocystis*, demostrada en modelos animales, de inducir en fases muy tempranas de la infección activación de macrófagos alveolares a través del factor nuclear kB (NF-kB) con elevación de interleuquinas proinflamatorias, hace pensar que la infección intrauterina podría también producir estas alteraciones condicionando una rotura prematura de las membranas y parto pretérmino a través de estos mecanismos inflamatorios (Thomas & Limper 2007). Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado recientemente que la colonización por *Pneumocystis* produce en sujetos con EPOC un aumento de citoquinas proinflamatorias en sangre, lo que podría suceder también en las mujeres gestantes colonizadas y alterar el desarrollo normal de su embarazo (E. J. Calderón et al. 2007).

Por todo ello, esclarecer el papel de la vía de transmisión vertical en la historia natural de la infección por *Pneumocystis jirovecii* y sus posibles implicaciones patológicas en el desarrollo de la gestación de los seres humanos plantea cuestiones que no sólo tienen interés científico, sino que pueden tener importantes implicaciones en el ámbito de la Salud Pública.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1. Hipótesis**

Existe una alta tasa de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en las mujeres embarazadas que condiciona una transmisión transplacentaria de este microorganismo que puede producir alteraciones en el desarrollo normal del embarazo que conduzcan en algunos casos a abortos espontáneos o nacimientos pretérmino.

## **3.2. Objetivos**

### **Objetivos generales**

1. Conocer la prevalencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en la mujer embarazada en nuestro medio
2. Conocer si la transmisión transplacentaria de *Pneumocystis jirovecii* produce alteraciones en el desarrollo normal del embarazo y puede ser causa de abortos o partos prematuros en la especie humana.

### **Objetivos específicos**

1. Conocer la prevalencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en las gestantes de nuestro medio en el momento del parto y el posible paso a la sangre del microorganismo.
2. Conocer la prevalencia de colonización/infección por *Pneumocystis jirovecii* en recién nacidos y abortos y su relación con la presencia de colonización en la madre.
3. Identificar las posibles alteraciones que la colonización/infección por *Pneumocystis jirovecii* pueda producir en las membranas placentarias (corion, amnios) y en los tejidos relacionados como los vasos sanguíneos fetales y el cordón umbilical

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

## **4.1. Diseño y Población**

### **4.1.1. Diseño del Estudio**

Para cubrir los objetivos planteados se llevó a cabo un estudio clínico observacional, con el siguiente abordaje metodológico:

Estudio transversal de prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en embarazadas en el momento del parto y de sus recién nacidos incluyendo un grupo control de mujeres no gestantes en edad fértil.

Serie de casos de abortos espontáneos y embarazos a término para estudiar las alteraciones morfológicas que pudiera producir la colonización por *Pneumocystis* en los tejidos placentarios y describir las posibles diferencias existentes en la micobiota presente en las placentas procedentes de abortos o de embarazos a término.

### **4.1.2. Ámbito del Estudio**

El estudio de campo se realizó en el Hospital de la Mujer del complejo Hospitalario Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. El procesamiento y posterior análisis de las muestras biológicas se llevó a cabo en las instalaciones con las que cuenta el grupo de investigación en el Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS). El grupo control fue reclutado en el Consultorio Médico Don Julio Borreguero de la localidad de El Coronil.

## **4.2. Población de Estudio**

### **Embarazadas**

Se incluyeron gestantes en el momento del parto atendidas en las instalaciones del Hospital de la Mujer del complejo Hospitalario Universitario Virgen del Rocío. En el momento de su ingreso se les informaba sobre la naturaleza del proyecto, solicitando su consentimiento informado para participar en él si cumplían los criterios de inclusión y no tenían causas de exclusión.

#### **Criterios de inclusión**

- Edad superior a 17 años
- Residencia en Sevilla
- Capacidad para otorgar su consentimiento informado por escrito

### **Criterios de exclusión**

- Edad menor de 18 años
- Intención de no llevar a término el embarazo
- Infección VIH u otras causas de inmunodepresión
- Incapacidad para otorgar su consentimiento informado

En el momento de la inclusión se realizó la encuesta epidemiológica y se recogieron los datos clínicos de las gestantes. Se procedió al a toma de muestras consistente en un lavado orofaríngeo, realizado mediante gargarismo con suero fisiológico estéril, a partir del cual se aisló el ADN para la identificación de la colonización por *Pneumocystis* mediante la aplicación de técnicas moleculares (Respaldiza et al. 2006). Además, se recolectaron muestras de sangre periférica para determinar la posible presencia de ADN de *Pneumocystis* en sangre, con el fin de identificar una posible fungemia.

### **Placentas y Abortos espontáneos**

Se recuperaron del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen del Rocío muestras de tejido placentario y de tejido pulmonar fetal incluidos en parafina, previo consentimiento informado de las madres. En estas muestras se analizó mediante técnicas moleculares la presencia de *Pneumocystis* y la de otros agentes infecciosos fúngicos, y mediante técnicas de inmunohistoquímica y tinciones convencionales realizamos estudios morfológicos para determinar la presencia de funiculitis o de corioamnionitis, así como el grado de inflamación, edema, infartos y hemorragias en la placenta que pudieran relacionarse con la presencia de *Pneumocystis*.

### **Recién nacidos**

Una vez obtenido el consentimiento informado de las madres se obtuvieron muestras de aspirado nasofaríngeo de los recién nacidos. Se categorizaron en recién nacidos prematuros si en el momento del parto tenían menos de 36 semanas de edad gestacional y recién nacidos a término si la edad gestacional era superior.

### **Criterios de exclusión**

- Infección VIH de la madre
- Tratamientos inmunosupresores por parte de la madre
- Imposibilidad para otorgar el consentimiento informado
- Negativa de los padres o tutores para participar en el estudio

### **Mujeres no gestantes**

Como grupo control para la evaluación de la colonización en mujeres embarazadas, se incluyó una cohorte de 36 mujeres no gestantes sin patología previa conocida, comprendidas en un rango de edad entre 18 y 46 años.

### **4.3. Tamaño Muestral**

La estimación del tamaño muestral del estudio se ha realizado para alcanzar una potencia del 80% con un nivel de significación del 5% para la comparación de proporciones entre dos poblaciones independientes aplicando el test  $\chi^2$  y asumiendo una diferencia *a priori* entre ambas poblaciones del 25%, con lo que se precisarían incluir 78 gestantes y 26 mujeres no embarazadas como controles.

El número de placentas y abortos que se han podido incluir en el estudio ha venido condicionada por la disponibilidad de las muestras y por ello no se ha realizado un cálculo de tamaño muestral.

## **4.4. Obtención de las muestras**

### **4.4.1. Embarazadas**

#### **Lavado orofaríngeo**

Las muestras de LOF se obtuvieron mediante gargarismo con 10 ml de suero fisiológico al 0.9 % de NaCl. Transcurrido un minuto desde el comienzo del gargarismo, cada persona depositó el suero en un tubo falcon de 50 ml (BD Falcon™), se identificaron con su correspondiente código y se conservaron en frío hasta su llegada al laboratorio. Una vez en el laboratorio se dividieron en dos alícuotas, en tubos de 15 ml (BD Falcon™) cada una y se centrifugan a 4°C y 800g durante 10 minutos (Heraeus™ Labofuge™ 400R). Se descarta el sobrenadante hasta dejar aproximadamente 500 µl en los que se resuspende el pellet en donde se encuentran las células y se pasan a criotubos Nunc™ de 1,8 ml. Una de las alícuotas se conserva a -80°C por si tuviera que usarse como réplica para confirmar la positividad para *P. jirovecii* y se procede a la extracción de ADN de la otra alícuota.

#### **Muestras de Sangre Periférica**

La extracción de sangre se lleva a cabo por personal de enfermería mediante punción venosa y se recoge en tubos de EDTA de 10 ml. Se tomó una alícuota en fresco de 500 µl para proceder directamente a la extracción de ADN y el resto se conservó a -80°C.

#### **Tejidos Placentarios y abortos**

El análisis molecular de los tejidos incluidos, se llevó a cabo en las instalaciones del Instituto de Biomedicina de Sevilla a partir de secciones histológicas de 10 µm de los bloques de tejido incluidos en parafina recuperados de entre los remitidos al Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Virgen del Rocío.

Los estudios histológicos e inmunohistoquímicos fueron realizados en el Servicio de Anatomía Patológica. Los análisis moleculares se llevaron a cabo a partir de cinco cortes histológicos de 5 µm de grosor para cada una de las muestras estudiadas, obtenidos de los

bloques seleccionados que fueron manipulados en condiciones de esterilidad, descontaminando el micrótopo después de cada corte para evitar contaminaciones cruzadas entre las muestras.

#### **4.4.2. Recién Nacidos**

##### **Aspirado Nasofaríngeo**

Para los análisis moleculares en recién nacidos se usaron muestras de aspirado nasal. Para su obtención se utilizó una modificación del procedimiento ampliamente utilizado y difundido en la literatura: Con el niño en decúbito supino y la cabeza en la línea media, se instilan 0,5ml/kg de suero salino fisiológico al 0,9% de NaCl en las fosas nasales. Seguidamente se introduce un catéter de succión conectado a un recipiente estéril, se aspira ejerciendo una fuerza de 150 mm de Hg y finalmente se lava el catéter con 1ml de suero fisiológico. El volumen final obtenido es de 1 - 2 ml aproximadamente y todo el proceso se realiza en condiciones de esterilidad.

##### **Aspirado Endotraqueal**

En el caso de prematuros que necesitaron de ventilación mecánica y por tanto de intubación endotraqueal la instilación de suero para la toma de muestra, se realizó mediante esta vía.

La ficha epidemiológica recogida en el estudio contiene: nombre del prematuro, o en su defecto, nombre de la madre; número de historia; edad; sexo; semanas de gestación; necesidad de ingreso posterior al nacimiento; si presenta síndrome de distrés respiratorio y evolución del prematuro.

#### **4.4.3. Mujeres no gestantes**

##### **Lavado orofaríngeo**

Para la obtención de las muestras de LOF pertenecientes a las mujeres no gestantes en edad fértil del grupo control se siguió el mismo procedimiento que en el caso de las mujeres embarazadas.

#### 4.5. Extracción y purificación de ADN

La digestión de las muestras se realizó mediante protocolo preestablecido en nuestro laboratorio y su posterior extracción y purificación del ADN se realizó con el kit comercial NucleoSpin Tissue (Macherey & Nagel GmbH & Co.KG, Düren, Alemania), con ligeras modificaciones según el tipo de muestra.

##### Digestión

La lisis se llevó a cabo mediante digestión enzimática con Proteinasa K en un tampón de SDS/EDTA, que se mantuvo entre el 0,5-0,8% p/v de SDS y entre 1-2 mM de EDTA a pH 8.

El SDS es un detergente aniónico que se intercala entre los ácidos grasos de las bicapas lipídicas, que forman las membranas celulares y nucleares, desorganizándolas y ayudando a la disgregación de éstas. El EDTA es un agente quelante de iones bivalentes que ayuda a estabilizar la estructura del ADN, a la vez que secuestra los iones que estabilizan las estructuras terciarias y/o cuaternarias de las metaloproteínas, las nucleasas entre ellas, desnaturalizándolas e impidiendo su función, a la vez, que las hace más accesibles a la acción proteolítica de la Proteinasa K, también ayuda a la disgregación de la membrana secuestrando los cationes bivalentes,  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$ , que estabilizan la estructura de la membrana uniendo los ácidos grasos por sus grupos carboxilo.

Según el tipo de muestras, el protocolo presenta ligeras modificaciones, así, para los aspirados nasofaríngeos y endotraqueales se partió de 250  $\mu$ l de muestra a la que se añadieron 5  $\mu$ l de EDTA 0,5 M a pH 8, 20  $\mu$ l de SDS al 10% y 20  $\mu$ l de Proteinasa K suministrada por el fabricante del kit a una concentración de 14 mg/ml y se incuban a 56°C en un baño termostático (GRANT GSL Acua 12 plus) en agitación por un mínimo de 4 horas. En las muestras de lavado orofaríngeo, partimos de alícuotas 500  $\mu$ l a las que se añadió 5  $\mu$ l de EDTA 0,5M a pH, 25  $\mu$ l de SDS al 10% y 25  $\mu$ l de Proteinasa K, previo a la incubación a 56°C.

En las muestras de tejido placentario y fetal, primero se procedió a la desparafinación mediante un protocolo estándar de hexano-etanol, en el que las secciones histológicas procedentes de la misma muestra se recogieron en un solo tubo y se incubaron por dos veces con 1 ml de hexano (agitador rotativo orbit, J.P. Selecta, S.A) a temperatura ambiente para eliminar los restos de parafina, y se lavaron con etanol absoluto por inversión, también dos veces, tras descartar el etanol, las muestras se incubaron a 37°C durante unos 15 minutos

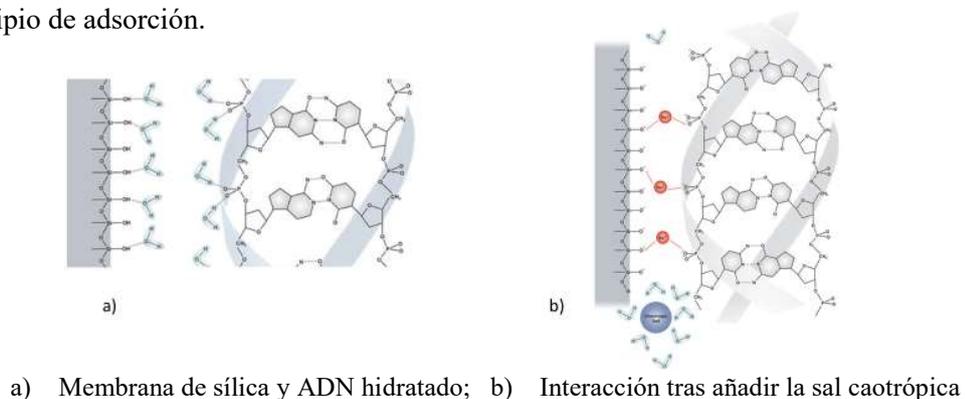
(211DS Stackable Laboratory Shaking Incubator, LabNet International, Inc). Una vez secas las muestras para proceder a la digestión, se resuspendieron en 200 µl de tampón de lisis T1, provisto por el Kit, y se le añadieron 25 µl de Proteinasa K antes de su incubación a 56°C. Si pasadas 4 horas de incubación el tejido no estaba aun completamente disgregado se le añadía SDS siempre sin sobrepasar una concentración final del 1% y se dejaban incubar “overnight” para proceder a la purificación de los ácidos nucleicos al día siguiente.

Para las muestras de sangre periférica, antes de la digestión enzimática se procedió a hemolizar los eritrocitos a partir de la fracción celular procedente de 500 µl de sangre mediante el uso de tampón hipertónico (ACK Lysing Buffer, Thermo Fisher Scientific), una vez hemolizado y lavado con PBS 1X (BioWhittaker™) se resuspendieron con 200 µl de tampón T1 con 25 µl de Proteinasa K.

### Purificación del ADN

Tras la digestión de la muestra se procedió a la purificación de los ácidos nucleicos mediante cromatografía adsorción-desorción en columna con membrana de sílica por centrifugación. La técnica se basa en el uso de sales caotrópicas que atraen a las moléculas de agua, retirando la capa hidratante que recubre las biomoléculas desnaturizando las proteínas, incrementando la solubilidad de sustancias apolares y destruye las interacciones hidrofóbicas. Las sales caotrópicas al retirar la capa hidratante que recubre el ADN creando un ambiente hidrófobo a su alrededor permite a los ácidos nucleicos interactuar con la membrana de sílica uniéndose a ella en la denominada adsorción, mientras que las proteínas desnaturizadas, metabolitos y otros contaminantes no se unen y pueden ser fácilmente eliminados en sucesivos lavados, para la desorción el ADN se hidrata con un tampón de baja fuerza iónica separándose de esta forma de la membrana y por tanto ya se puede eluir de la columna. (Figura 3).

Figura 3. Principio de adsorción.



Como hemos mencionado anteriormente utilizamos para la purificación de ADN el kit comercial de Nucleospin® Tissue de Macherey -Nagel que utiliza el hidrocloreto de guanidina como sal caotrópica y la elución de las muestras realizó con 60 µl de agua estéril bidestilada.

#### 4.6. Amplificación de ADN

La amplificación de las secuencias de ADN se realizó mediante la conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR) que desarrollo Kary Mullis en 1986. Técnica que consiste en una primera fase en la que se desnaturaliza la doble cadena de ADN generalmente a 94-95°C y se activa la polimerasa termo-resistente necesaria para la extensión de los polinucleótidos, una segunda fase en la que se repiten un número determinado de veces ciclos de 1-desnaturalización a 94°C, 2-hibridación, en donde se baja la temperatura, para que cebadores se unan a la cadena de ADN complementaria y 3- extensión, en el que se incorporan los desoxinucleótidos y que se realiza a 72°C gracias a uso de polimerasas termo-resistentes derivadas del de la bacteria *Thermus aquaticus*. Y una última fase a 72°C para asegurarse la completa extensión de todas las moléculas de ADN formadas.

Mediante la utilización de esta técnica y el uso de cebadores específicos se puede incrementar exponencialmente el número de moléculas de la secuencia de ADN que nos interese, siguiendo una fórmula de  $N_n = N_0 \times 2^n$ , donde  $N_0$  es el número de copias inicial presentes en la muestra y  $n$  el número de ciclos y  $N_n$  el número de copias obtenido tras esos ciclos.

##### 4.6.1. Amplificación del gen mtLSU rRNA de *Pneumocystis*

La presencia de *P. jirovecii* se evaluó mediante una PCR de tipo anidada o *Nested-PCR* del *locus* del genoma mitocondrial del organismo que codifica para el ARN ribosómico 16S de la subunidad mayor del ribosoma mitocondrial (mtLSU rRNA) basada en el protocolo descrito por A.E. Wakefield en 1990. Esta PCR cuenta con la peculiaridad de que se realizan dos rondas de amplificación, una primera ronda en la que se utilizan unos cebadores externos a la secuencia objetivo y una segunda ronda de amplificación con cebadores internos para el amplificado anterior, consiguiendo así aumentar la sensibilidad con respecto a una PCR simple.

La primera ronda, que consta de 35 ciclos de amplificación, se utilizan los cebadores **pAZ102-E:** 5'-gATggCTgTTTCCAAGCCA-3' y **pAZ102-H:** 5'-gTgTACgTTgCAAAG-TACTC-3' obteniéndose un amplicón de 346 pb. Los cebadores internos usados en la segunda

ronda, que consta de 40 ciclos, son **pAZ102-X**: 5'-gTgAAATACAAATCggACTAgg-3' y **pAZ102-Y**: 5'-CACTTAATATTAATTggggAgC-3' que rinden un producto de amplificación de unas 260 pb.

La mezcla de reacción de la primera ronda para un volumen final de 25 µl, contiene 3 µl del ADN de la muestra, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de cada cebador y 1U de Taq polimerasa (Biotaq DNA Polymerase, Bioline) en tampón de reacción 1X NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Bioline). Las segunda rondas se hacen en un volumen final de 50 µl, con 5 µl del producto de reacción de la primera ronda y con concentraciones de deoxinucleótidos, MgCl<sub>2</sub> y cebadores similares, pero en este caso, al duplicarse el volumen, se añaden 2U de Taq polimerasa a la reacción.

Las PCR se llevan a cabo en el termociclador T1 Thermocycler (Biometra, Göttingen, Germany) y las condiciones para ambas son de un paso inicial de 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 o 40 ciclos, según la ronda de amplificación, de 94° 30 segundos, 57°C 30 segundos 72°C 1minuto, con un paso final de 72°C durante 5 minutos.

Tabla 2. Condiciones de las rondas de amplificación mtLSU RNAr

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Cebadores
<b>Activación / Desnaturalización</b>	1	95°C	5 minutos	<b>1ª Ronda</b> pAZ102-E: 5'-gATggCTgTTTCCAAGCCA-3'
<b>Desnaturalización</b>		94°C	30 segundos	pAZ102-H: 5'-gTgTACgTTgCAAAGTACTC-3' <b>producto 346 pb</b>
<b>Alineamiento</b>	35 o 40	57°C	30 segundos	<b>2ª Ronda</b>
<b>Elongación</b>		72°C	1 minuto	pAZ102-X: 5'-gTgAAATACAAATCggACTAgg-3'
<b>Elongación Final</b>	1	72°C	5 minutos	pAZ102-Y: 5'-CACTTAATATTAATTggggAgC-3' <b>producto 260 pb</b>

#### 4.6.2. Amplificación de la región ITS

La identificación molecular de las especies fúngicas presentes en las muestras se realizó mediante la amplificación por PCR semi-anidada o semi-*Nested* de la región ITS.

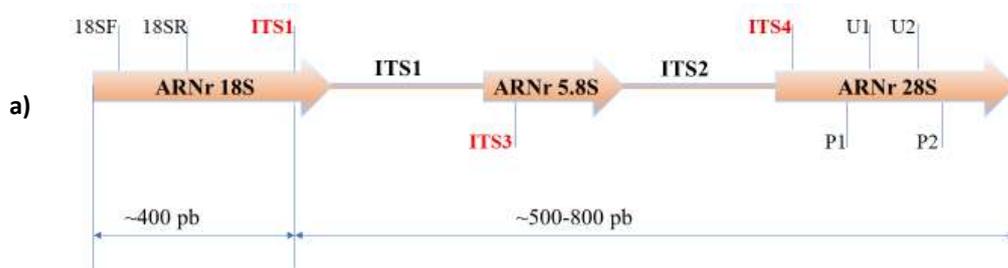
La mayoría de los estudios de identificación genética en eucariotas están basados en la región de ADN mitocondrial codificante para la subunidad 1 de la Citocromo *c* oxidasa. Sin embargo, en hongos, es difícil de amplificar, por lo que la región de ADN nuclear que codifica para los ARN ribosómico es la más utilizada (Schoch et al. 2012). Esta región que se suele encontrar en forma de repeticiones en tándem en diferentes puntos del genoma de eucariotas, se organiza en un cistrón que conforman los genes para el ARN ribosómico 18S, 5.8S y 28S, entre los que se encuentran, separándolos, dos secuencias ITS (del inglés Internal Transcribed Spacer), la secuencia ITS1 y la secuencia ITS2 (Figura 4).

Estas secuencias ITS, de unos 200 a 400 pb, son ideales para los estudios de identificación de especies dado la gran variabilidad que presentan al no estar sometidas a una fuerte selección como las regiones codificantes, y al encontrarse entre secuencias de ADN altamente conservadas que nos permite diseñar cebadores universales que las flanqueen.

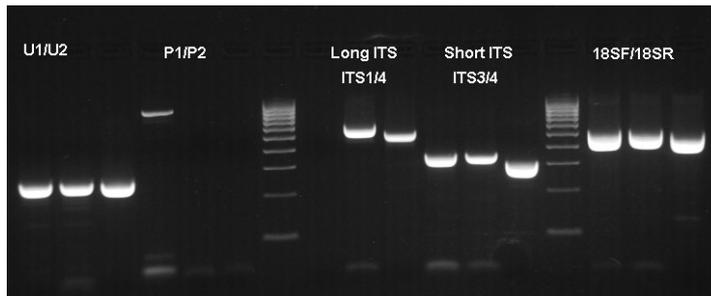
La identificación de las diferentes especies de hongos se suele hacer mediante una PCR simple a partir de un cultivo de los mismos, nosotros al no disponer estos, y partir de mucho menos material genético ensayamos diferentes PCRs con varios de los cebadores descritos en la literatura en busca de los que mejor sensibilidad o especificidad nos dieran, y nos permitieran hacer una PCR de dos rondas (Schoch et al. 2012; White et al. 1990; Gurpreet et al. 1995). Como “template” utilizamos ADN procedente de *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Figura 4).

Se decidió hacer una PCR semi-anidada con los cebadores ITS1, ITS3 e ITS4 que fueron con los que mayor sensibilidad obtuvimos y que según la bibliografía presentan ciertas ventajas en la identificación de género y especie sobre las secuencias de los *loci* 18S y 28S en la identificación de estos organismos (Millar et al. 2007).

Figura 4. a) Organización de los genes de ARN ribosómico y la disposición de los cebadores; b) Secuencias de los cebadores usados; c) resultado de los ensayos de las PCR



- b)
- |       |   |                              |
|-------|---|------------------------------|
| U1    | → | 5'-gTgAAATTgAAAaggAA-3'      |
| U2    | → | 5'-gACTCCTTggTCCgTgTT-3'     |
| P1    | → | 5'-ATCAATAAgCggAggAAAAg-3'   |
| P2    | → | 5'-CTCTGGCTTCACCCTATTC-3'    |
| 18SFR | → | 5'-ATTggAgggCAAgtCTggTg-3'   |
| 18SFR | → | 5'-CCgATCCCTAgTCggCATAg-3'   |
| ITS1  | → | 5' TCCgTAggTgAACCTgCgg-3'    |
| ITS4  | → | 5' - TCCTCCgCTTATTgATATgC-3' |



Nota- Las amplificaciones se llevaron a cabo a la temperatura de hibridación media para cada pareja de cebadores y a una concentración de 2 mM de MgCl<sub>2</sub>

En una primera ronda, que consta de 35 ciclos de amplificación, se utilizan los cebadores ITS1 y ITS4, que amplifican las regiones ITS1, ARNr 5.8S e ITS2 de tamaño variable de entre 500 y 800 pb. Para la segunda ronda de la *Semi-Nested*, que consta de 40 ciclos, usamos nuevamente como reverso el ITS4 y como cebador interno el ITS3 amplificando la región variable ITS2.

La mezcla de reacción de la primera ronda para un volumen final de 25 µl, contiene, al igual que para la PCR de *Pneumocystis*, 3 µl del ADN de la muestra, 200 µM de dNTPs, 0.5 µM de cada cebador y 1U de Taq polimerasa (Biotaq DNA Polymerase, Bioline) en tampón de reacción 1X NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Bioline), pero se lleva a cabo a una concentración 2 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las segunda rondas se hacen a volumen final de 50 µl, con 5 µl del producto de reacción de la

primera ronda y con concentraciones de deoxinucleótidos, MgCl<sub>2</sub> y cebadores iguales a la primera ronda, pero en este caso, al duplicarse el volumen, se añaden 2U de Taq polimerasa a la reacción.

Las PCR se llevaron a cabo en el termociclador T1 Thermocycler y las condiciones para ambas son de un paso inicial de 95°C durante 5 minutos, seguido de 35 para la primera ronda y 40 ciclos para la segunda de 94° durante 30 segundos, 55°C 45 segundos y 72°C 30 segundos y un paso final de 72°C durante 5 minutos.

Tabla 3. Condiciones de las rondas de amplificación ITS

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Cebadores
<b>Activación / Desnaturalización</b>	1	95°C	5 minutos	<b>1ª Ronda</b> ITS1 5' TCCgTAggTgAACCTgCgg-3'
<b>Desnaturalización</b>		94°C	30 segundos	ITS4 5'- TCCTCCgCTTATTgATATgC-3' producto de tamaño variable
<b>Alineamiento</b>	35 o 40	55°C	45 segundos	
<b>Elongación</b>		72°C	30 segundos	<b>2ª Ronda</b> ITS3 5' gCATCgATgAAgAACgCAGC-3' ITS4 5'- TCCTCCgCTTATTgATATgC-3' producto de tamaño variable
<b>Elongación Final</b>	1	72°C	5 minutos	

Una vez realizadas las PCRs, con las muestras positivas se procedió a la identificación mediante secuenciación de las bandas obtenidas en ambas rondas de amplificación.

#### 4.6.3. Visualización de los productos de amplificación

Para detectar si las muestras habían amplificado se resuelven los productos de PCR por electroforesis horizontal (Wide mini-sub cell GT, BIO-RAD) a 90V, voltaje constante, (Power PAC 300, BIO-RAD) en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio, para su posterior visualización mediante luz ultravioleta (GelDoc-It, UVP).

La agarosa es un polisacárido formado por galactosas alfa y beta unidas entre sí por enlaces glucosídicos  $\alpha$ -(1→3) y  $\beta$  (1→4), al calentarse soluciones de agarosa, estos polímeros se unen entre sí formando un gel al enfriarse, creando un entramado tridimensional por cuyos poros podemos hacer pasar a las moléculas de ADN que migrarán hacia el ánodo a una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, dado que la carga neta negativa es similar

independientemente del número de bases, separando de esta forma moléculas de diferente tamaño y agrupando las de similar número de pares de bases, formando las denominadas bandas. El tamaño de los poros dependerá de la concentración de agarosa, siendo el 2% idóneo para resolver secuencias que vayan desde las 100 pb hasta el 2 kb.

El tampón usado para formar el gel es el mismo en el que se realizará la electroforesis, en nuestro caso TBE 0,5X (Tris Base 45 mM: ácido Bórico 45 mM: EDTA 10 mM).

Como ya se ha comentado al gel se le añaden 3,5 µl de una solución al 10 % de bromuro de etidio por cada 100 ml de gel, este compuesto mutagénico al excitarse con luz ultravioleta de onda corta emite fluorescencia a 590 nm, dentro del espectro del visible, por lo que, al intercalarse entre las bases de ADN, gracias a su geometría plana y estructura aromática, nos permite su visualización en un transiluminador de luz ultravioleta.

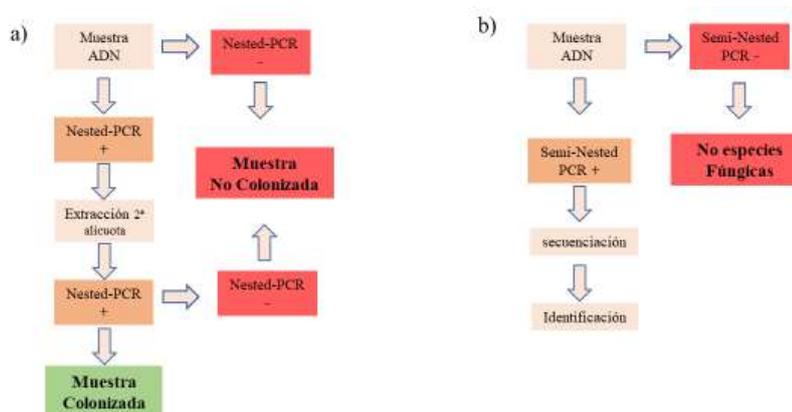
Por último, al tratarse de una electroforesis horizontal necesitaremos un tampón de carga que confiera densidad al ADN para que este no difunda fuera del pocillo antes de que comience la electroforesis. Para ello, usamos un tampón 10X compuesto de un 60% de glicerol, Tris 100mM y 10mM de EDTA, al que se le añade trazas de azul de bromofenol, como colorante, que al tener una movilidad electroforética relativa de unos pocos de pares de bases nos permite seguir el frente de la migración del ADN. Además, la electroforesis siempre se realiza utilizando un marcador de peso molecular conocido (Hyperladder IV, Bioline) para facilitar la identificación por tamaño de las diferentes bandas obtenidas.

#### **4.6.4 Criterios de interpretación**

Para los fines de este estudio se definió la colonización como la identificación de ADN de *P. jirovecii* mediante PCR del gen mtLSU rRNA, por duplicado y en ambas alícuotas de cada una de las muestras obtenidas y siempre y cuando la madre o el recién nacido no presentaran signos o síntomas clínicos de infección por este patógeno.

La identificación de las especies fúngicas obtenidas mediante la amplificación de las regiones ITS se realizó mediante secuenciación de las diferentes amplicones.

Figura 5. Interpretación de resultados. a) algoritmo de colonización por *P. jirovecii* b) otras especies fúngicas



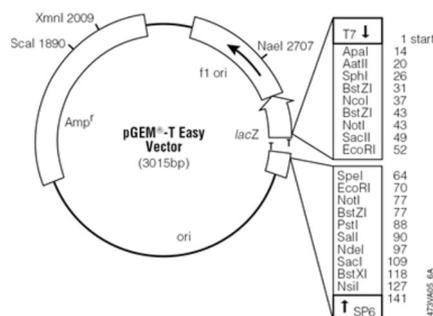
#### 4.7. Clonación de los productos de PCR

La identificación de especies fúngicas mediante ITS, en las muestras que al resolverse por electroforesis se detectó solamente una banda o aparecieron varias, pero lo suficientemente distantes en peso molecular para poder ser escindidas del gel sin riesgo de contaminación, se purificaron y se secuenciaron directamente.

En los casos en que las bandas de ADN no se resolvieron lo suficiente como para ser purificadas individualmente, se procedió a clonación y se secuenciaron a partir de los plásmidos purificados de las colonias resultantes.

El vector utilizado para la clonación fue el pGEM®-T Easy Vector (Promega®), vector replicativo que confiere resistencia a ampicilina como medio de selección de la transformación y el gen del péptido- $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa para la monitorización de la recombinación al encontrarse el sitio de ligación entre éste y el de los promotores para la polimerasa T7 y SP6 (Figura 6).

Figura 6. Organización del vector pGEM®-T Easy vector



El protocolo de clonación consiste en un primer paso denominado reacción de ligación en el que los productos de ADN obtenidos en la PCR se unen al vector de clonación mediante la acción de ADN ligasas, un segundo paso sería la transformación consistente en la introducción de los plásmidos obtenidos en células bacterianas para su multiplicación aprovechando la maquinaria replicativa celular durante el tercer paso, el crecimiento de colonias a partir de células individuales que nos permitirá seleccionar las diferentes secuencias clonadas.

### Ligación

Para la ligación usamos el sistema comercial pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems II (Promega®) a una ratio molar 3:1 (BioMath Calculators de Promega®) para lo que se procedió a cuantificar el ADN de las muestras por espectrofotometría a 260 nm (Nanodrop 2000, ThermoFisher Scientific). Las condiciones para la reacción de ligación se muestran en la tabla 4 y se llevaron a cabo en incubación a temperatura ambiente durante 1 hora. Controles negativos y positivos se llevaron a cabo para monitorizar todo el proceso de clonación.

Tabla 4. Condiciones de la Reacción de ligación

Reactivos	Standard	Control Positivo	Control negativo
Tampón X Rapid Ligation	5 µl	5 µl	5 µl
pGEM®-T Easy Vector	1 µl	1 µl	µl
Producto de PCR	PCR*	No	No
ADN control	No	2 µl	No
Ligasa T4 DNA	1 µl	1 µl	1 µl
Agua grado molecular	Hasta 10 µl	1 µl	3 µl
<b>Volumen final de la reacción 10 µl</b>			
<b>PCR*: producto de PCR a una Ratio Molar 3:1 con respecto al vector</b>			

### Transformación

La transformación del plásmido resultante de la reacción de ligación se realizó con células de *Escherichia coli* competentes (JM109 High Efficiency Competent Cells) almacenadas a -80°C hasta su uso. Se tomaron 5 µl de reacción y 50 µl de células y se incubaron en hielo durante 20 minutos. Una vez transcurrido ese tiempo, se realizó un choque térmico a

42°C durante 45-50 segundos e inmediatamente los tubos se pasaron a hielo, donde se mantuvieron durante 2 minutos.

Tras este proceso se añadió 950 µl de medio SOC a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C en agitación moderada (200 rpm aproximadamente) durante una hora y media para favorecer el crecimiento celular.

### Crecimiento y selección de colonias

Se crecieron 100 µl de las células transformadas en placas de Petri en medio LB-Agar sólido suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina, IPTG 0,1 mM y X-Gal a una concentración de 80 µg/ml de LBA y se incubaron durante 24 horas a 37°C.

La molécula de IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido) es un inductor de la transcripción del gen que codifica la β-galactosidasa, enzima que cataliza la hidrólisis de β-galactósidos y el X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido) puede ser metabolizado por la β-galactosidasa en 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, un compuesto que confiere color azul, por lo que las colonias bacterianas que han sido transformadas con el vector más el inserto, se pueden identificar al no tener actividad β-galactosidasa permaneciendo las colonias de color blanco.

Se seleccionaron 5 colonias blancas procedentes de cada placa y se crecieron en 10 ml de medio LB suplementado con ampicilina a 37°C durante 24 horas y en agitación, y a partir de estos cultivos se procedió a la purificación de los plásmidos para la secuenciación de los insertos de ITS.

Tabla 5. Composición de los Medios de Clonación

SOC	LB (Lurita Bertani)	LB-A (LB-Agar)
2 g de Bactotripton 0.5g de Extracto de levadura 1 ml de NaCl 1M 0.25 ml de KCl 1M 1ml de MgCl <sub>2</sub> 2M 1 ml de glucosa 2M*	5 g de Bactotripton 2.5 g de Extracto de levadura 2.5 g de NaCl	Medio LB 7.5g de agar bacteriológico
<b>Volumen final: 100 ml</b>	<b>Volumen final: 500ml</b>	<b>Volumen final: 500ml</b>
*se añade tras autoclavar		

#### **4.8. Secuenciación**

La secuenciación se realizó por el método de Sanger, en el que una de las hebras de las moléculas de ADN de interés es secuenciada mediante la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa creando numerosas copias de la misma, pero a diferencia de las PCR simples en la mezcla de reacción hay dideoxynucleótidos (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marcados con un fluoróforo diferente por cada tipo de ddNTP, que al carecer de grupo 3'-hidroxilo provocan que al incorporarse a la cadena la reacción de polimerización no pueda continuar, obteniéndose infinidad de fragmentos que difieren en un solo nucleótido y teniendo todas en su final un ddNTP marcado, que podrán ser separados mediante electroforesis capilar y gracias al uso de un detector laser que reconoce la fluorescencia emitida, podrán ser secuenciados.

#### **Purificación**

Antes de proceder a la reacción de secuenciación las moléculas de ADN deben ser purificadas, para que los cebadores, dímeros de cebadores y dNTPs no incorporados, no interfieran en la reacción, ni alteren la ratio dNTP/ddNTP que podría conducir a una secuenciación deficiente.

Los productos de PCR, en los que se obtuvo una sola banda se purificaron por cromatografía de exclusión molecular, en el que las muestras se hicieron pasar por una columna formada por un polímero (Sephacryl S-400 HR, GE Healthcare Life Sciences) que crea un entramado por el que las moléculas de gran tamaño no pueden penetrar eluyendo entonces rápidamente, mientras las moléculas pequeñas entran en el viendo reducida su velocidad de elución. La exclusión molecular fue llevada a cabo mediante ultrafiltración, procedimiento por el cual la muestra es hecha pasar por la columna (MicroSpin™ S-400 HR Columns, GE Healthcare Life Sciences) mediante centrifugación.

Las muestras que amplificaron varios fragmentos cuyos tamaños diferían lo suficiente, el producto restante de PCR se separó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, se cortaron con bisturí las bandas directamente del gel y se purificaron usando el kit comercial NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel) usando una ratio de 200 µl del tampón de unión NTI, facilitado por el Kit, por cada 100 mg de agarosa. El NTI contiene entre un 30-60% de tiocianato de guanidinio, que al igual que el hidrocloreuro de guanidina es un agente caotrópico por lo que la purificación de este kit al igual que en el caso del Nucleospin® Tissue

está basado en el principio de adsorción. El ADN fue eluido con 25 µl de agua esteril para su posterior uso en la reacción de secuenciación.

Por último, con las muestras que habían sido clonadas se procedió a la purificación de los plásmidos con el inserto, a partir de las colonias crecidas en medio LB, con el Kit comercial NucleoSpin® Plasmid (Macherey-Nagel), basado también en el principio de adsorción-desorción. Las bacterias sedimentadas por centrifugación se resuspenden en tampón A1 y el ADN plasmídico se libera de las células huésped por lisis provocado por el tampón A2 (solución alcalina con SDS) y el Buffer A3 (hidrocloruro de guanidina) neutraliza el lisado resultante y crea las condiciones apropiadas para la unión del ADN del plásmido a la membrana de sílice, tras varios lavados los plásmidos se eluyeron con 50 µl de agua estéril.

### Reacción de secuenciación

La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencde kit (Applied Biosystems) que emplea ddNTP marcados con derivados de la Rhodamina como fluoroforos. Para cada muestra de ADN purificada obtenida se realizó la secuenciación tanto directa como reversa.

En las muestras procedentes de productos de PCR se realizó a, partir de unos 20 ng de ADN, la secuenciación tanto directa, con el cebador ITS3 o ITS1 (cuando fueron positivas en la primera ronda) y la secuenciación reversa con cebador ITS4. En los productos clonados, la reacción se llevó a cabo a partir de 200 ng de ADN utilizando el cebador universal M13 foward (5'-TgTAAAACgACggCCAgT-3') cuya secuencia complementaria se encuentra en el pGEM®-T justo antes del sitio ligación del inserto. La mezcla de reacción se detalla en la tabla 6. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en los termocicladores T1 Thermocycler y consistieron en 30 ciclos de amplificación a 50°C como temperatura de hibridación (tabla 7).

Tabla 6. Mezcla de Reacción para la secuenciación.

Reactivo	Producto PCR	Plásmido
Ready Reacción Premix	2 µl	2 µl
Tampón BigDye Sequencing 5X	2 µl	2 µl
Cebadores a 3 µM	2 µl (ITS3 o ITS4)	2 µl M13
ADN	20 ng	200 ng
DMSO (5X)	0	1 µl
Agua	Hasta 10 µl	Hasta 10 µl

Tabla 7. Condiciones de la reacción de secuenciación

<b>Etapas</b>	<b>Ciclos</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Cebadores</b>
<b>Activación / Desnaturalización</b>	1	95°C	5 minutos	<b>Productos de PCR</b> Secuenciación Directa <b>ITS1 y/o ITS3</b> Secuenciación Reversa <b>ITS4</b> <b>Clones</b> <b>M13 forward</b>
<b>Desnaturalización</b>		94°C	10 segundos	
<b>Alineamiento</b>	30	50°C	5 segundos	
<b>Elongación</b>		60°C	4 minutos	
<b>Elongación Final</b>	1	60°C	5 minutos	

### **Precipitación**

Antes de realizar la electroforesis capilar de las muestras se eliminan los ddNTP no incorporados y demás posibles contaminantes (cebadores y dímeros de cebadores) que puedan interferir en el análisis de los resultados, y se resuspenden en el tampón adecuado para la electroforesis.

Todas las reacciones de secuenciación se precipitaron mediante un protocolo etanol\EDTA, para ello a cada muestra de reacción (10 µl) se le añadió 2,5 µl de EDTA (125mM) y 30 µl de etanol absoluto. Se incubaron en oscuridad durante 12 minutos y se procedió a la centrifugación a máxima velocidad durante 20 minutos a 4°C para obtener un pellet que posteriormente se lavó con 125 µl de etanol al 70%, tras volver a centrifugar durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y se dejaron secar a 37 °C durante 30 minutos para eliminar los restos de alcohol.

### **Obtención de las secuencias**

Una vez precipitadas y secas las secuencias, se resuspenden en 15 µl de un agente desnaturalizante (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems™), se traspasan a placa de 96 pocillos y se llevaron a la Unidad de Genómica del IBIS donde se realizó la electroforesis capilar en el secuenciador Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzers, usando para la formación del gel el polímero POP7 (Applied Biosystems™), y las electroforesis se llevaron a

cabo con el Módulo Run Filter Set E y calibradas con el Dye Set/Primer (mobility) Files para los terminadores BigDye.

### **Análisis de las Secuencias**

Los electroferogramas obtenidos se analizaron con el software Sequence Scanner 2 (Applied Biosystems™), para descartar las secuencias con un bajo Score para su repetición, Las secuencias que cumplieron los requisitos de Intensidad y calidad de señal fueron limpiadas y corregido los posibles errores de lectura con el software FinchTV (Geospiza, inc), la identificación de los hongos se realizó con la herramienta online para BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de NCBI (National Center for Biotechnology Information), a partir de los archivos Fasta generados, mediante megablast optimizado para secuencias de alta similitud del Reino Fungi en la base de secuencias Nucleotide collection (nr/nt). La confirmación de la identidad se realizó por annealing con el software MEGA7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Los índices de biodiversidad se calcularon con el software PAST vs 3.15.

#### **4.9. Controles de calidad**

Todas las muestras se procesaron a ciegas y bajo código. En cada una de las determinaciones, se incluyeron como control interno del sistema controles positivos y negativos.

Para evitar falsos positivos por contaminación cruzada se utilizaron puntas con filtro, se usó guantes y mascarilla para manipular las muestras en todo momento, así como la extracción del ADN, la preparación de la mezcla de reacción de la PCR, la amplificación y la visualización de los amplicones se realizaron en diferentes áreas del laboratorio. En la PCR se usaron controles negativos tanto del proceso de digestión y/o extracción del ADN como de los reactivos para la reacción.

Para evitar falsos negativos, se utilizaron clones de la secuencia mtLSU insertada en el vector pGEM®-T Easy Vector (PROMEGA) como control positivo de la reacción y las muestras que resultaron negativas por PCR fueron testadas para el gen constitutivo de la  $\beta$ -globina para descartar posibles inhibiciones.

#### 4.10. Estudios morfológicos e inmunohistoquímicos

Las placentas y tejidos de aborto incluidos en el estudio fueron remitidas directamente al servicio de Anatomía Patológica para su procesamiento y estudio. Allí, cada una de las piezas fueron pesadas, medidas y descritas sus características macroscópicas más destacables. A continuación, se introdujeron en formaldehído al 10% durante 24h para su óptima fijación. Con el tejido ya fijado, se seleccionaron diferentes áreas tisulares representativas para su estudio, incluyendo: una sección del cordón umbilical, una de membranas ovulares y entre una y tres muestras correspondientes a parénquima de cotiledones placentarios. Posteriormente las muestras se procesaron en procesador automático (Leica ASP300S), para su posterior inclusión en parafina.

De cada bloque de parafina se realizaron los cortes iniciales para el estudio histológico, se desparafinaron y tiñeron con hematoxilina-eosina (HE) y se valoraron las muestras identificando la existencia de edema, hemorragia, infarto, calcificación, engrosamiento, trombosis, fibrina, ectasias para el tejido placentario; también se valoró la inflamación aguda y crónica, edema y trombosis en el cordón umbilical y se categorizaron bajo la supervisión del patólogo según la extensión de su afectación de 1 a 3 (1:<20% ;2: >20%<50% 3:>50%) para su análisis.

En las muestras seleccionadas se realizaron en primer lugar cuatro cortes de 5 micras de grosor para realización de técnicas histoquímicas especiales: PAS, Grocott, Gram y Zielh-Neelsen las cuales se llevaron a cabo en teñidor automático (BenchMark Special Stains-Ventana Roche) siguiendo las indicaciones técnicas comerciales.

La detección de *Pneumocystis jirovecii* se llevó a cabo con el kit comercial de inmunofluorescencia Monofluo Kit *P. jirovecii* de BIO-RAD a partir de 2 cortes histológicos de 4 µm de cada una de las muestras disponibles, tras desparafinarlas con 2 pases de hexano y etanol absoluto, se secaron y se procedió con el protocolo estándar según las indicaciones del fabricante, digiriendo enzimática la muestra durante 30 minutos previa incubación del anticuerpo anti-*P. jirovecii* de ratón seguido del anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con el derivado de la fluoresceína FITC (tiocianato de fluoresceína) y se determinó la presencia del microorganismo por microscopía de fluorescencia (Olympus BX61).

#### **4.11. Recogida y análisis de datos**

Los datos epidemiológicos y clínico-biológicos se recogieron en un formato estandarizado, utilizando para ello un cuaderno de recogida de datos (Anexo 1). Fueron traspasados a soporte electromagnético, así como los resultados obtenidos en una base de datos construida expresamente para el proyecto, en la que bajo encriptación mediante código se garantizó el cumplimiento de la normativa vigente sobre protección de datos de carácter personal (Ley Orgánica 15/1999).

Se realizó una estadística descriptiva de las variables del estudio. La comparación de variables cualitativas se realizó aplicando el test exacto de Fisher o el test Chi-cuadrado de Pearson, según el tamaño de la muestra. Las variables cuantitativas se compararon mediante el test de la T de Student o la Prueba de Mann-Whitney según si las variables seguían o no una distribución normal. Para las variables cualitativas se utilizaron frecuencias absolutas, mientras que las variables cuantitativas se expresaron como media y desviación estándar ( $Md \pm DE$ ). Se comprobó la normalidad de la distribución de las variables cuantitativas mediante las pruebas de Shapiro-Wilk ( $n < 50$ ) y Kolmogorf-Smirnof ( $n > 50$ ).

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS versión 22.0 y EPIDAT versión 4.1. El nivel de significación estadística se estableció para un valor de  $p < 0,05$ .

#### **4.12. Aspectos éticos**

El estudio contó con la aprobación oficial del Comité de Ética de la Investigación del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla y se llevó a cabo bajo los principios éticos recogidos en la última revisión de la Declaración de Helsinki, así como los recogidos en el Convenio del Consejo de Europa relativo a los derechos humanos y la biomedicina y en la Declaración Universal de la UNESCO sobre el genoma humano y los derechos humanos. Se cumplieron todos los requisitos establecidos en la legislación española en el ámbito de la investigación biomédica, la protección de datos de carácter personal y la bioética.

La participación en el proyecto fue voluntaria y la solicitud de participación fue realizada como una propuesta de investigación en salud, independiente del proceso asistencial convencional del sistema sanitario. A cada participante se le informó por escrito de la naturaleza de la investigación y del uso de la información obtenida, así como de su derecho al acceso, modificación o eliminación de los registros en cualquier momento.

Se garantizó la confidencialidad de los datos, así como su utilización solo para los fines especificados del estudio. Además, se solicitó un consentimiento informado por escrito a las participantes (Anexo 1).

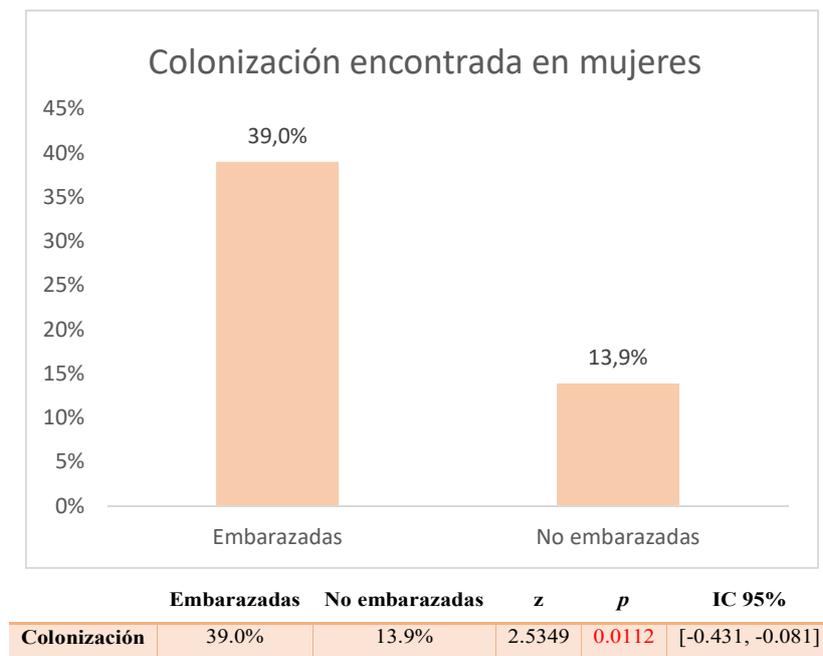
## **5. RESULTADOS**

### 5.1. Prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en embarazadas en el momento del parto

Un total de 82 lavados orofaríngeos procedente de embarazadas en el momento del parto (33 a término; 49 de parto prematuro) y 36 lavados para el grupo control (mujeres no gestantes en edad fértil), fueron recogidos durante el desarrollo de este estudio. La media de edad de las embarazadas fue de  $31,3 \pm 6,5$  años y de  $33,2 \pm 9,3$  años para el grupo control ( $p = 0,285$ ).

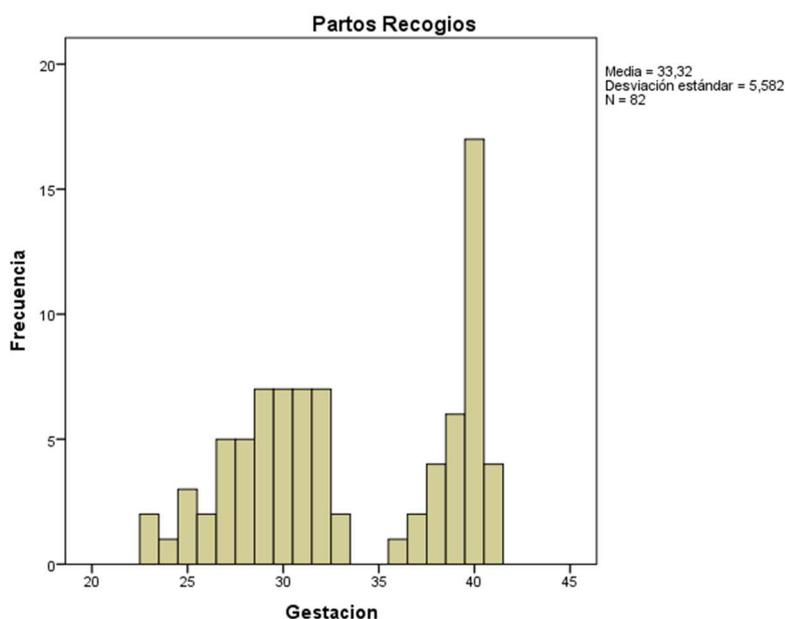
La tasa de prevalencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en embarazadas fue de un 39 % (32 de los 82 casos) frente al 13,9% (5 de 36 casos) encontrado en mujeres en edad gestacional no embarazadas de nuestro entorno geográfico, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (figura 7).

Figura 7. Colonización por *Pneumocystis* en mujeres en edad gestacional



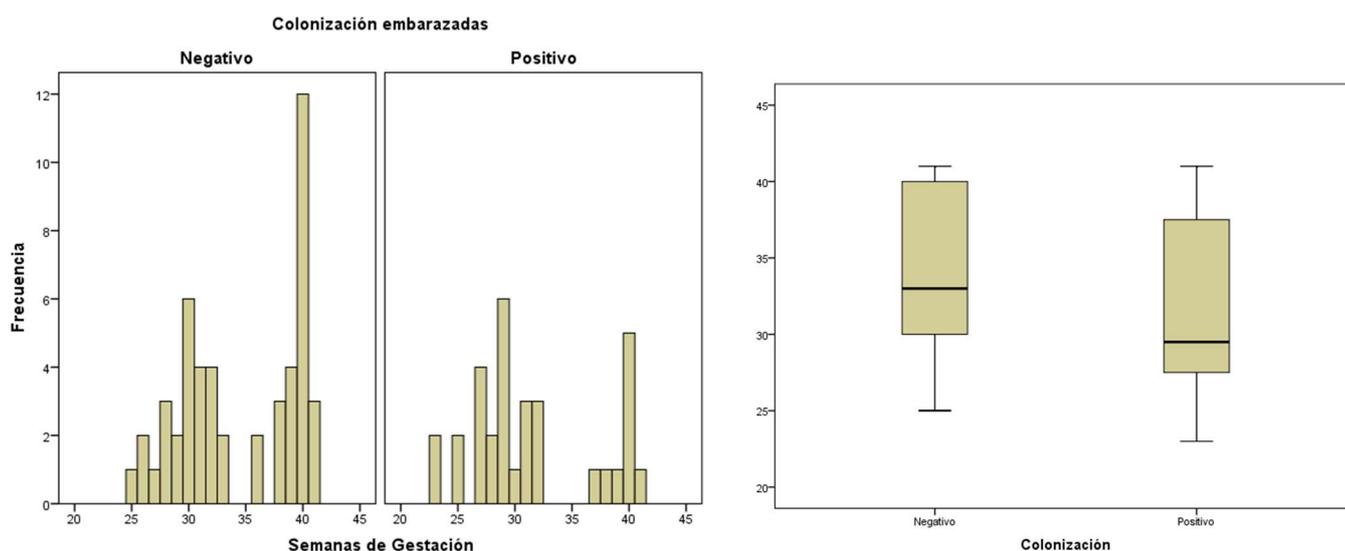
La distribución de los partos recogidos en nuestro estudio con respecto a las semanas de gestación muestra un pico de frecuencias a las 40 semanas, que corresponde con el actualmente denominado parto a “término completo” (Spong CY. 2013) y una media de  $33,3 \pm 5,58$  semanas de gestación (figura 8).

Figura 8. Distribución de los partos respecto a las semanas de gestación.



Separando la distribución de los partos entre madres colonizadas y no colonizadas, observamos que la frecuencia de partos a término disminuye entre las embarazadas colonizadas (27,3%), siendo más frecuentes los partos prematuros (71,9%) mientras que en embarazadas no colonizadas el 48% tuvieron partos a término y el 52% partos prematuros (Figura 9).

Figura 9. Distribución de los casos de colonización y media de la gestación en semanas.



En esta misma línea, la duración media de la gestación en mujeres colonizadas por *Pneumocystis* fue de  $31,50 \pm 5,55$  semanas frente a  $34,48 \pm 5,35$  semanas en el caso de las

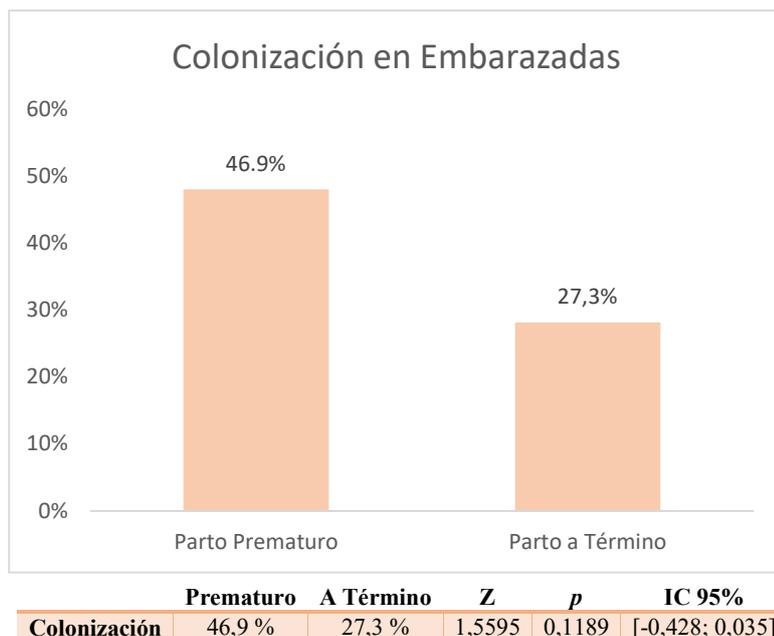
madres no colonizadas ( $p = 0,017$ ), ningún otro parámetro clínico-epidemiológico mostró diferencias entre el grupo de gestantes colonizadas y no colonizadas por *P. jirovecii* tal como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8. Características clínicas y epidemiológicas

	Gestantes		<i>p</i>
	Colonizadas (n=32)	No colonizadas (n=50)	
Edad (n =82)	31,44 ±7.030	31,29±6,083	0.923
Semanas Gestación (n =82)	31,50 ±5,550	34,48 ±5,350	<b>0,017</b>
Peso recién nacido (n =82)	1736,11±1068,042	2171,80 ± 1121,689	0,093
Hipertensión arterial (n =76)	3/27	4/49	0,9913
Preclamsia (n =79)	1/30	6/49	0,3447
Diabetes Gestacional (n =73)	6/24	8/49	0,5702
Corioamnionitis (n =69)	12/27	11/42	0,1908
Funiculitis (n =70)	13/28	15/42	0,5174

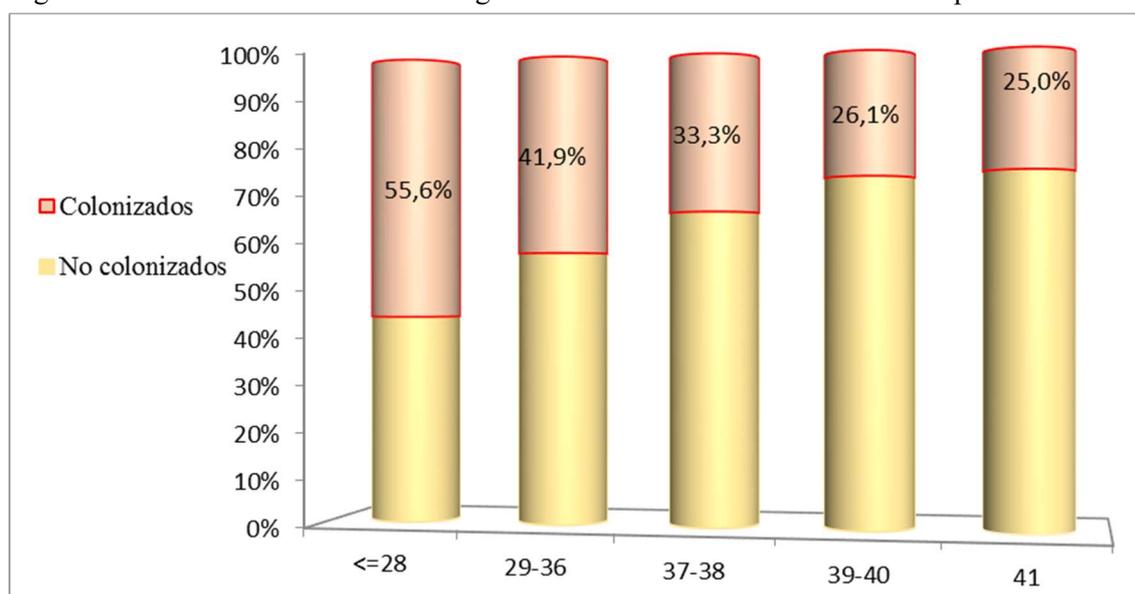
Al separar los casos entre prematuros (madres cuya gestación ha sido inferior a 37 semanas) y a término (gestación superior o igual a 37 semanas). Obtenemos una tasa de colonización por *Pneumocystis jirovecii* en prematuros del 46,9% (23 de 49 casos) y del 27,3% (9 de 33 casos) entre las madres cuyo parto ha sido a término (figura 10), siendo esta diferencia no significativa ( $p = 0,1189$ ).

Figura 10. Colonización en embarazadas.



Al agruparse los casos ajustándonos a las últimas recomendaciones del Colegio Americano de Obstetras y Ginecólogos y la Sociedad de Medicina Materno-Fetal (Spong CY. 2013) en partos prematuros menores de 28 semanas gestación, prematuros de 29 a 36 semanas, y los partos a término en término temprano de 37 a 38 semanas, término completo de 39 a 40 semanas y termino tardío de 41 semanas de gestación. Se observan tasas de prevalencia de colonización del 55,6 % y 41,9 %, en prematuros y 33.3%, 26,1% y 25% en los partos a término (figura 11). Observando un claro decremento en la tasa de colonización de las madres a medida que aumentan las semanas de gestación.

Figura 11. Prevalencia de las madres según la nueva clasificación recomendada para recién nacidos.



Al realizar un análisis de regresión lineal en el que se estudió el efecto de la presencia o no de colonización por *Pneumocystis* sobre la duración de la gestación, junto con otras variables clínicas y epidemiológicas potencialmente asociadas con la prematuridad (tabla 9), la colonización mostró un efecto independiente en la reducción de la duración del embarazo ( $p=0,01$ ). Del resto de factores considerados solo la existencia de diabetes durante el embarazo mostró un efecto parecido (tabla 9).

Tabla 9. Modelo de regresión lineal múltiple

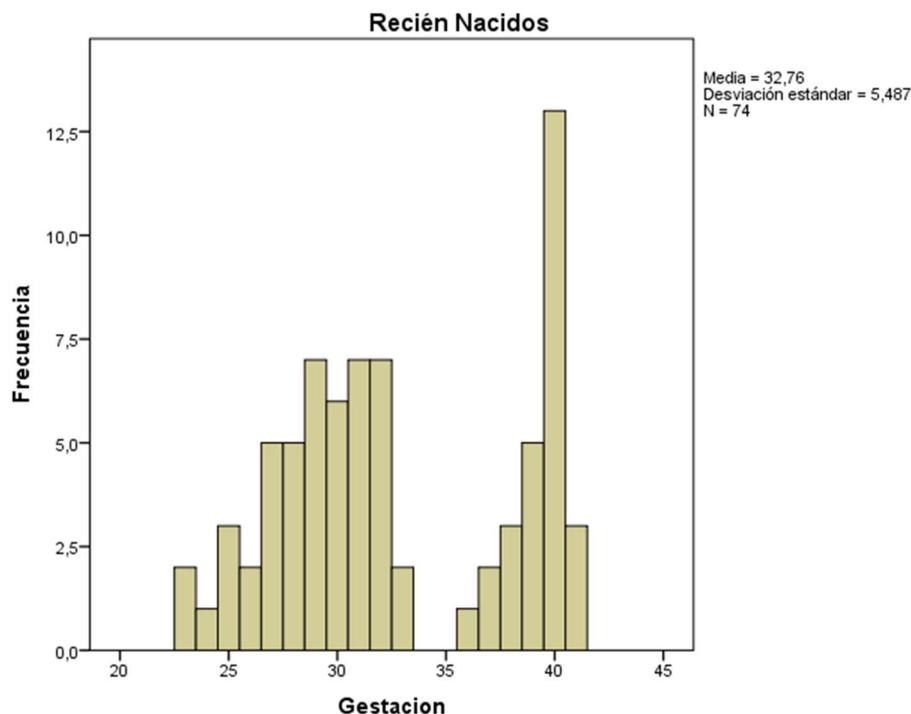
Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes tipificados		
	B	Error típ.	Beta	t	Sig.
1 (Constante)	39,169	2,852		13,736	,000
EDAD	-,098	,085	-,121	-1,156	,252
<b><i>P. jirovecii</i></b>	<b>-3,202</b>	<b>1,207</b>	<b>-,290</b>	<b>-2,654</b>	<b>,010</b>
Hipertensión arterial	-3,216	2,185	-,184	-1,472	,146
Preeclamsia	-1,484	2,016	-,085	-,736	,465
Diabetes Gestacional	-3,965	1,665	-,301	-2,381	<b>,021</b>
Corioamnionitis	-2,601	1,322	-,225	-1,967	,054

Constante: Edad Gestacional

## 5.2. Prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en recién nacidos

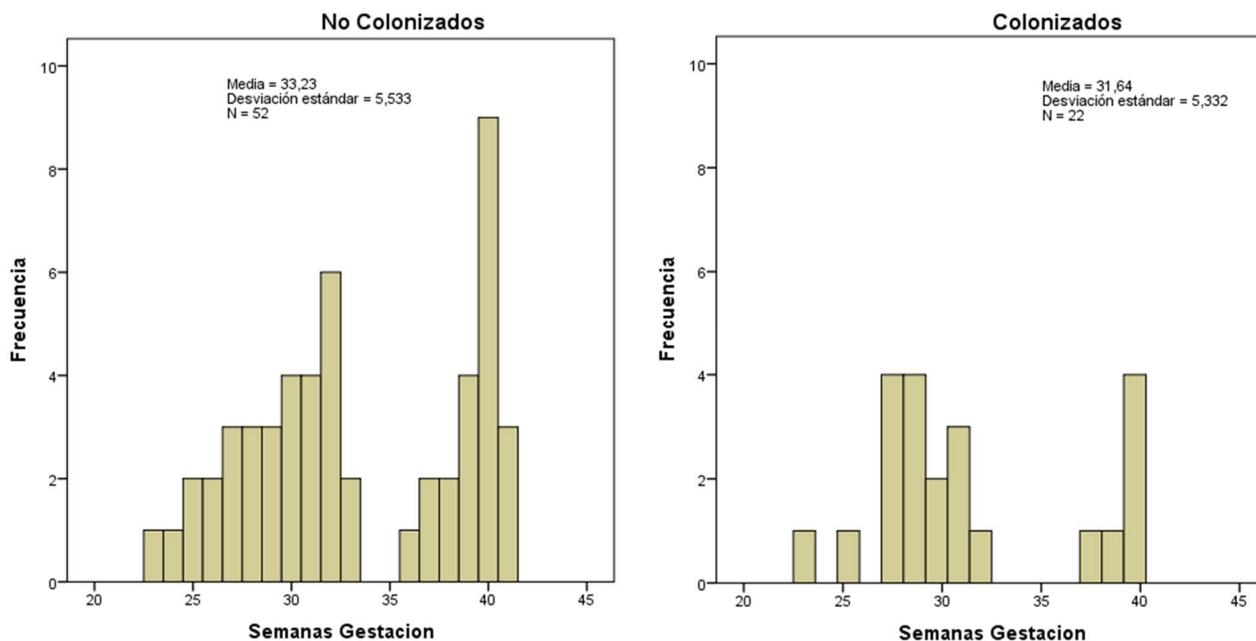
De las madres de las que obtuvimos la muestra de lavado orofaríngeo se pudieron recuperar un total de 74 aspirado nasales (26 procedente de partos a término y 48 casos de prematuros) pertenecientes a sus recién nacidos no siendo posible en los otros ocho casos (7 a término y un prematuro) por diferentes razones. La distribución de los recién nacidos estudiados según su edad gestacional se recoge en la figura 12.

Figura 12. Distribución de los casos de aspirado nasal recogidos.



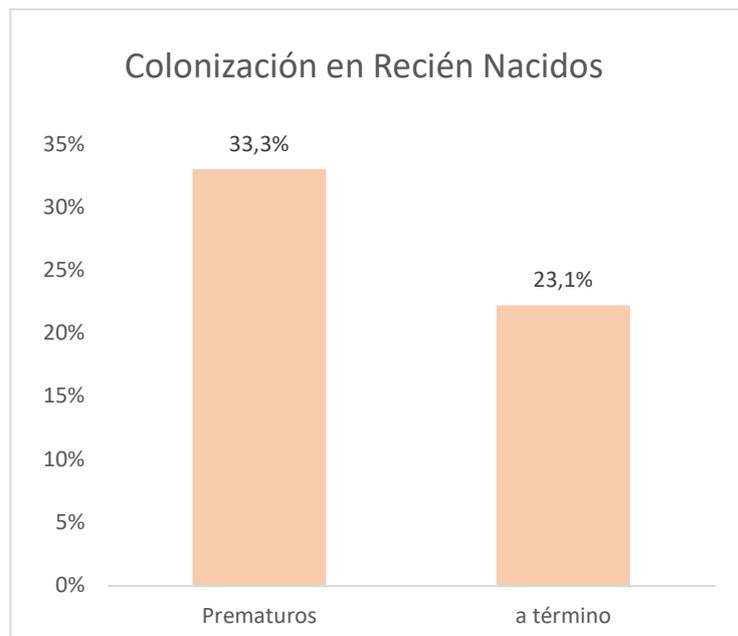
La prevalencia de colonización por *Pneumocystis jirovecii* entre los recién nacidos fue del 29,72% (22 de 74 casos) un 10% inferior a la obtenida en las gestantes, con una media de  $31,64 \pm 5,33$  semanas de edad gestacional frente a  $33,23 \pm 5,53$  semanas en los no colonizados, desapareciendo también al igual que en el caso de las madres la alta frecuencia de casos a las 40 semanas en colonizados (figura 13) y manteniéndose en los recién nacidos no colonizados.

Figura 13. Distribución por edad gestacional de los recién nacidos colonizados y no colonizados.



Al separarlos entre prematuros (48 casos) y recién a término nacidos (26 casos) las tasas de prevalencia fueron mayores en los prematuros, alcanzando el 33,3% (16/48) frente al 23,1% (6/26) en los recién nacidos a término (figura 14), aunque sin alcanzar significación estadística ( $p = 0,357$ ).

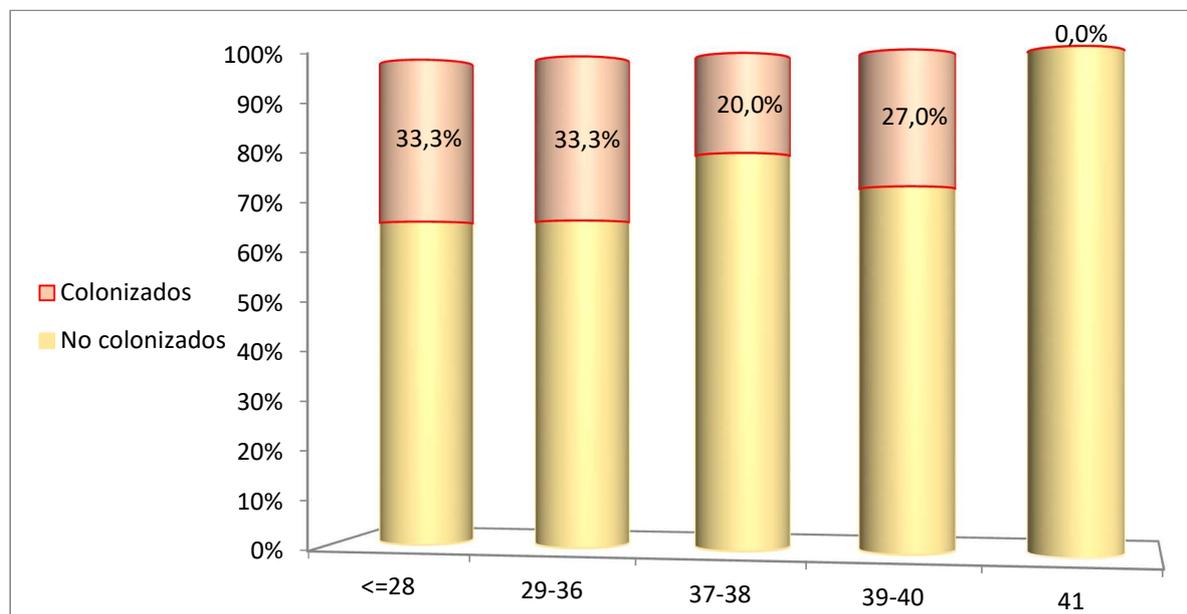
Figura 14. Tasa de colonización en aspirados nasales de recién nacidos.



	Prematuro	A Término	Z	p	IC 95%
<b>Colonización</b>	33,3 %	23,1 %	0,6551	0,5124	[-0,342; 0,137]

Agrupados según la nueva recomendación, obtenemos unas prevalencias de colonización del 33,3% tanto para los prematuros de menos de 28 semanas de gestación como para los prematuros de 29 a 36 semanas. La prevalencia de colonización para los recién nacidos a término fue del 20% en termino temprano, del 27% en termino completo y en nuestro estudio ninguno de los cuatro casos en los que obtuvimos aspirados nasales de términos tardíos fue positivo para *Pneumocystis* (figura 15).

Figura 15. Prevalencia en recién nacidos según tiempo de gestación.



### 5.3. Relación entre la colonización en la madre y el recién nacido.

De los 22 casos de aspirado nasal que resultaron positivos para *Pneumocystis* en el 68,2% de los casos el lavado orofaríngeo de la madre resultó positivo también para la colonización con *Pneumocystis*, en los restantes siete casos en los que fue detectado ADN del microorganismo en el aspirado nasal, la muestra de lavado orofaríngeo de la madre, recogida en el momento del parto, fue negativa para *Pneumocystis* (tabla 10).

De los 52 casos en los que los aspirados nasales de los recién nacidos resultaron negativos para la colonización por *Pneumocystis*, 16 de sus madres presentaban colonización por *P. jirovecii* en sus muestras de lavado orofaríngeo.

Tabla 10. Relación entre lavados orofaríngeos y aspirados nasales.

		Lavado Orofaríngeo		
		Negativo	Positivo	Total
Aspirado Nasal	Negativo	36	16	52
	Positivo	7	15	22
		43	31	74

La prueba de McNemar ( $p = 0,093$ ) al no mostrar diferencias nos confirma la correlación entre ambas variables.

#### 5.4. Abortos y partos múltiples

##### Abortos

Durante el tiempo de este estudio solo pudieron conseguirse cuatro muestras de lavado orofaríngeo de madres que hubieran sufrido un aborto, sin embargo, no se pudo recuperar tejido placentario para hacer las posibles correlaciones. Encontramos ADN de *Pneumocystis* en dos de los lavados (50%) cuyos partos habían tenido una gestación de 23 y 34 semanas por 38 y 41 semanas de los lavados que resultaron negativos.

##### Partos múltiples

En el transcurso del estudio pudieron tomarse muestras de lavado orofaríngeo de 12 madres que tuvieron un proceso de parto múltiple con una media de gestación de  $30,42 \pm 3,147$  semanas, y una tasa de colonización en las madres del 33,3% (4 de 12 casos) y en los niños una tasa global del 44,7% (14 de 38 casos). La distribución y correlación de los casos se muestran en la tabla 11. En el caso de los aspirados nasales, salvo un caso en el que uno de los recién nacidos fue negativo y sus otros dos hermanos positivos hubo concordancia de resultados entre todos los hermanos en la detección de ADN del microorganismo. En el caso en el que hubo dos muertes, con madre y hermano positivos para ADN de *Pneumocystis*, no dispusimos de muestra de aspirado nasal de los recién nacidos fallecidos.

Tabla 11. Presencia de ADN de *Pneumocystis* en las madres y recién nacidos en partos múltiples.

	<b>Semanas gestación</b>	<b>Madre</b>	<b>Hijo1</b>	<b>Hijo2</b>	<b>Hijo3</b>
<b>Caso 1</b>	32	No	Positivo	Positivo	
<b>Caso 2</b>	33	No	No	No	No
<b>Caso 3</b>	25	No	Positivo	Positivo	No
<b>Caso 4</b>	25	Positivo	Positivo	<i>Exitus</i>	<i>Exitus</i>
<b>Caso 5</b>	33	No	No	No	
<b>Caso 6</b>	28	Positivo	No	No	
<b>Caso 7</b>	31	No	Positivo	Positivo	
<b>Caso 8</b>	34	Positivo	No	No	
<b>Caso 9</b>	31	NO	No	NO	
<b>Caso 10</b>	29	No	No	No	
<b>Caso 11</b>	34	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
<b>Caso 12</b>	30	No	No	No	

### 5.5 Presencia de ADN de *Pneumocystis* en tejidos placentarios y fetales

La detección de ADN por técnicas moleculares de *Pneumocystis jirovecii* se pudo llevar a cabo en 46 placentas, de las cuales 26 pertenecían a madres con parto a término de las 33 recogidas en nuestro estudio, y 20 fueron recuperadas de abortos, junto con tejido pulmonar fetal.

De las 26 placentas a término analizadas en el 50% de ellas hallamos ADN de *P. jirovecii* frente al 30,8 % encontrado en el lavado orofaríngeo de las madres y el 19,2 % en el aspirado nasal de los niños (5 de 19 estudiados al no disponer de aspirado nasal en otros 7 casos). Teniendo nueve casos en que solo se detecta *Pneumocystis* en la placenta y no así en el lavado orofaríngeo ni en el aspirado nasal y dos casos en los que habiendo detectado ADN de *Pneumocystis* tanto en la muestra de lavado orofaríngeo de la madre como en el aspirado nasal del recién nacido, no se halló en las muestras de placenta (tabla 11).

De las placentas procedentes de abortos, en ninguno de los casos pudimos recoger el lavado orofaríngeo de la madre. En el 55 % de ellas encontramos presencia de *Pneumocystis*, llegando hasta el 70 % en tejido pulmonar fetal (figura 16). Encontrando seis casos en los que se identificó ADN de *Pneumocystis* en el tejido fetal y no se encontró en el tejido placentario, así como dos casos en los que estando colonizada la placenta para *P. jirovecii* no detectamos el ADN del microorganismo en tejido pulmonar (tabla 12).

Figura 16. Porcentaje de muestras de tejido en las que se detectó ADN de *Pneumocystis*.

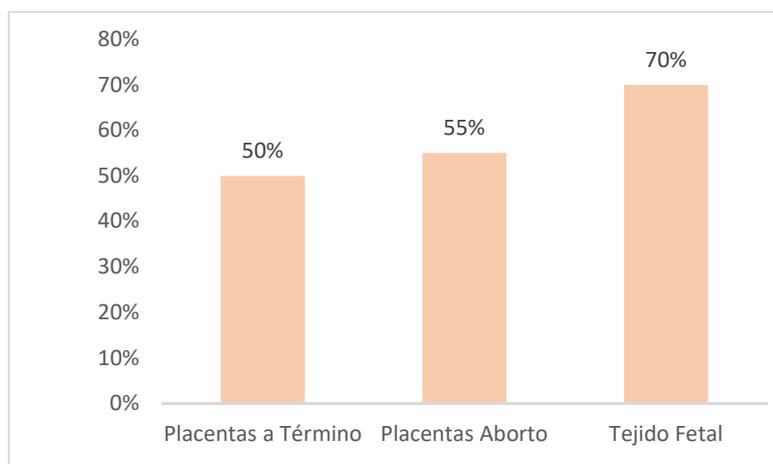


Tabla 11. Correlación de la presencia de ADN de *Pneumocystis* en placentas a término.

	Lavado Orofaringeo	Placenta	Aspirado Nasal
<i>Caso 1</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Caso 2</i>	No	No	Positivo
<i>Caso 3</i>	Positivo	Positivo	No
<i>Caso 4</i>	Positivo	No	Positivo
<i>Caso 5</i>	Positivo	No	Positivo
<i>Caso 6</i>	Positivo	Positivo	Positivo
<i>Caso 7</i>	No	No	No
<i>Caso 8</i>	No	No	No
<i>Caso 9</i>	No	No	No
<i>Caso 10</i>	No	Positivo	No
<i>Caso 11</i>	No	Positivo	No
<i>Caso 12</i>	No	Positivo	ND
<i>Caso 13</i>	No	No	No
<i>Caso 14</i>	Positivo	No	No
<i>Caso 15</i>	Positivo	No	ND
<i>Caso 16</i>	No	No	No
<i>Caso 17</i>	No	Positivo	No
<i>Caso 18</i>	No	Positivo	No
<i>Caso 19</i>	Positivo	Positivo	No
<i>Caso 20</i>	No	Positivo	No
<i>Caso 21</i>	No	No	ND
<i>Caso 22</i>	No	Positivo	No
<i>Caso 23</i>	No	No	ND
<i>Caso 24</i>	No	Positivo	ND
<i>Caso 25</i>	No	No	ND
<i>Caso 26</i>	No	Positivo	ND

ND = No Determinado

Tabla 12. Correlación de la presencia de ADN de *Pneumocystis* entre las placentas y el tejido fetal

	<b>Placenta</b>	<b>Tejido Fetal</b>
<i>Caso 1</i>	Positivo	Positivo
<i>Caso 2</i>	Positivo	Positivo
<i>Caso 3</i>	No	Positivo
<i>Caso 4</i>	No	Positivo
<i>Caso 5</i>	Positivo	Positivo
<i>Caso 6</i>	No	Positivo
<i>Caso 7</i>	Positivo	Positivo
<i>Caso 8</i>	Positivo	Positivo
<i>Caso 9</i>	No	Positivo
<i>Caso 10</i>	Positivo	No
<i>Caso 11</i>	Positivo	Positivo
<i>Caso 12</i>	Positivo	Positivo
<i>Caso 13</i>	No	Positivo
<i>Caso 14</i>	Positivo	No
<i>Caso 15</i>	No	Positivo
<i>Caso 16</i>	Positivo	No
<i>Caso 17</i>	Positivo	No
<i>Caso 18</i>	No	Positivo
<i>Caso 19</i>	No	No
<i>Caso 20</i>	No	No

### 5.6. Presencia de ADN de *Pneumocystis* en sangre de embarazadas

En lo referente al paso a la sangre del microorganismo, en ninguna de las 82 muestras de sangre obtenida se pudo confirmar por PCR la presencia de ADN del microorganismo, ya fueran las madres, por los resultados de su lavado orofaríngeo, tanto colonizadas como no colonizadas.

### 5.7. Estudios Histológicos e inmunohistoquímicos

Dispusimos para su estudio de 22 placentas de los 33 embarazos a término incluidos en el estudio y de 20 placentas procedentes de abortos espontáneos con sus respectivos tejidos fetales.

#### **Placentas a término**

De las 22 placentas a término recogidas, un 40,9 % (9 casos) era positivas para ADN de *Pneumocystis*, solo encontrando un caso en que el lavado orofaríngeo recogido y la muestra de placenta fueran positivas para la presencia de ADN del microorganismo y ninguno en el que

también fuera positivo el aspirado nasal (en 7 casos no pudo recogerse muestra del aspirado nasal) y curiosamente se presentan varios casos en el que solamente es positiva la placenta.

En el estudio histológico de las placentas a término todas presentaron una configuración normal, no encontrando diferencias significativas en ninguno de los parámetros medidos (tabla 13). Si se observó signos de corioamnionitis en cuatro de las placentas (18,2%) con afectación del cordón sugestiva de funiculitis en uno de los casos. En ninguna de estas cuatro placentas se detectó ADN de *Pneumocystis*, aunque en dos, los lavados orofaríngeos correspondientes fueron positivos para el microorganismo.

Tabla 13. Características estudiadas en los cortes de tejido placentario.

	No Colonizados		Colonizados		Total	
	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar	Media	Desviación estándar
<b>PLACENTA</b>						
<b>Peso</b>	<b>640,00</b>	108,834	<b>645,45</b>	139,900	642,72	122,34541
<b>Edema</b>	<b>,36</b>	,505	<b>,18</b>	,405	,27	,456
<b>Hemorragia</b>	<b>1,09</b>	,302	<b>1,27</b>	,467	1,18	,395
<b>Infarto</b>	<b>1,00</b>	,632	<b>,82</b>	,603	,91	,610
<b>Calcificación</b>	<b>,82</b>	,751	<b>,73</b>	,786	,77	,752
<b>Engrosamiento</b>	<b>,55</b>	,522	<b>,18</b>	,405	,36	,492
<b>Trombosis</b>	<b>,00</b>	,000	<b>,00</b>	,000	,00	,000
<b>Fibrina</b>	<b>,91</b>	,701	<b>1,09</b>	,539	1,00	,617
<b>Ectasias</b>	<b>1,27</b>	,467	<b>,91</b>	,831	1,09	,684
<b>Inflamación aguda</b>	<b>,09</b>	,302	<b>,27</b>	,647	,18	,501
<b>Inflamación crónica</b>	<b>,09</b>	,302	<b>,00</b>	,000	,05	,213
<b>CORDÓN</b>						
<b>Edema</b>	<b>,18</b>	,405	<b>,09</b>	,302	,14	,351
<b>Trombosis</b>	<b>,00</b>	,000	<b>,00</b>	,000	,00	,000
<b>Dilatación</b>	<b>,73</b>	,647	<b>,64</b>	,505	,68	,568

Las variables se categorizaron dependiendo de la extensión de la afectación en:

1:<20% ; 2: >20%<50%; 3:>50%

En ninguna de las placentas a término estudiadas se encontró la presencia de patógenos mediante técnicas de tinción histológicas (PAS, Grocott y Zielh-Neelsen) y tampoco se encontraron en los cortes histológicos hallazgos en la inmunofluorescencia específica para quistes de *Pneumocystis*.

### Placenta y tejido pulmonar de abortos

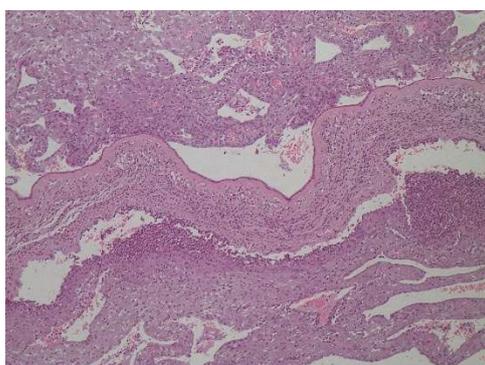
Como se ha comentado anteriormente la presencia de ADN de *Pneumocystis* se confirmó en el 55% de las placentas estudiadas y alcanzó hasta el 70% en tejido pulmonar fetal. Encontramos seis casos en los que se identificó ADN de *Pneumocystis* en el tejido fetal y no se encontró en el tejido placentario, así como dos casos en los que identificándose la presencia de ADN de *Pneumocystis* en la placenta no se detectó el ADN del microorganismo en el tejido pulmonar del feto.

De los 20 casos de abortos recogidos durante el estudio, en tres de ellos el feto era inviable, en cinco casos el aborto fue debido a insuficiencias placentarias y en siete casos no se observaban alteraciones morfológicas. Cinco placentas, encontrándose ADN de *Pneumocystis* en dos de ellas, presentaron corioamnionitis, y en uno de los casos en los que no había presencia de ADN del microorganismo, presentó además funiculitis en el cordón.

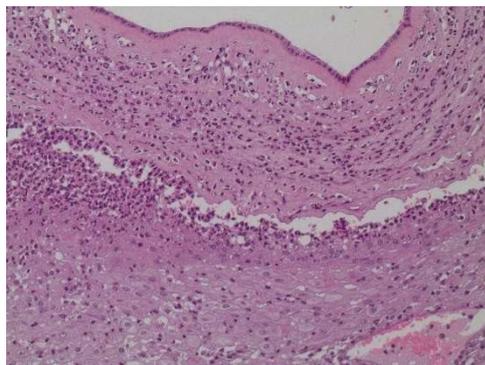
Por técnicas de tinción solo se encontraron hallazgos de bacterias Gram + en uno de los casos asociado a corioamnionitis, que también fue positivo para *P. jirovecii* tanto en placenta como en tejido fetal. En ninguna de las muestras se detectó *Pneumocystis* por inmunohistoquímica.

Figura 17. Tinción HE de una sección de 4  $\mu\text{m}$  de tejido placentario, realizado para el estudio, presentando corioamnionitis

(a) 4X



b) 10 X



## 5.8. Determinación de otras especies fúngicas

Los estudios de identificación de otras especies fúngicas se realizaron a partir de 14 placentas a término, 20 placentas procedentes de aborto y su tejido pulmonar fetal respectivo.

### Placentas a término

Las tasas de prevalencia de colonización para *Pneumocystis* en las placentas a término en la que se analizó la presencia de las diferentes especies fúngicas fue del 42,8% (6 de las 14 placentas).

Se encontraron especies fúngicas pertenecientes a siete géneros de la División ascomicetos, una secuencia del orden capnodiales que no pudo identificarse hasta género y especie y otro ascomiceto desconocido. Siendo *Cladosporium spp. tras Pneumocystis* el segundo más frecuente en las muestras, estando presente en cinco de ellas (35,7%), si contamos las diferentes especies que aparecieron (*C. cladosporioides* en dos ocasiones, *C. macrocarpum* y otras dos en que no pudo determinarse la especie).

Los Basidiomicetos que solo aparecen en 6 de las muestras, están representados solo 3 géneros, *Cryptococcus spp.* en dos ocasiones, *Dioszegia hungarica* en una muestra y *Sporidiobolus spp.* en tres muestras de placenta, (*Sporidiobolus metaroseus* en dos de ella). Destacar que en las muestras que fueron positivas para *Pneumocystis* los únicos basidiomicetos presentes fueron los del género *Cryptococcus* (*C. albidosimilis* y *C. neoformans*)

Además, dos de las secuencias encontradas no presentaban similitud con ninguna de las presentes en el banco de secuencias nr/nt de NCBI.

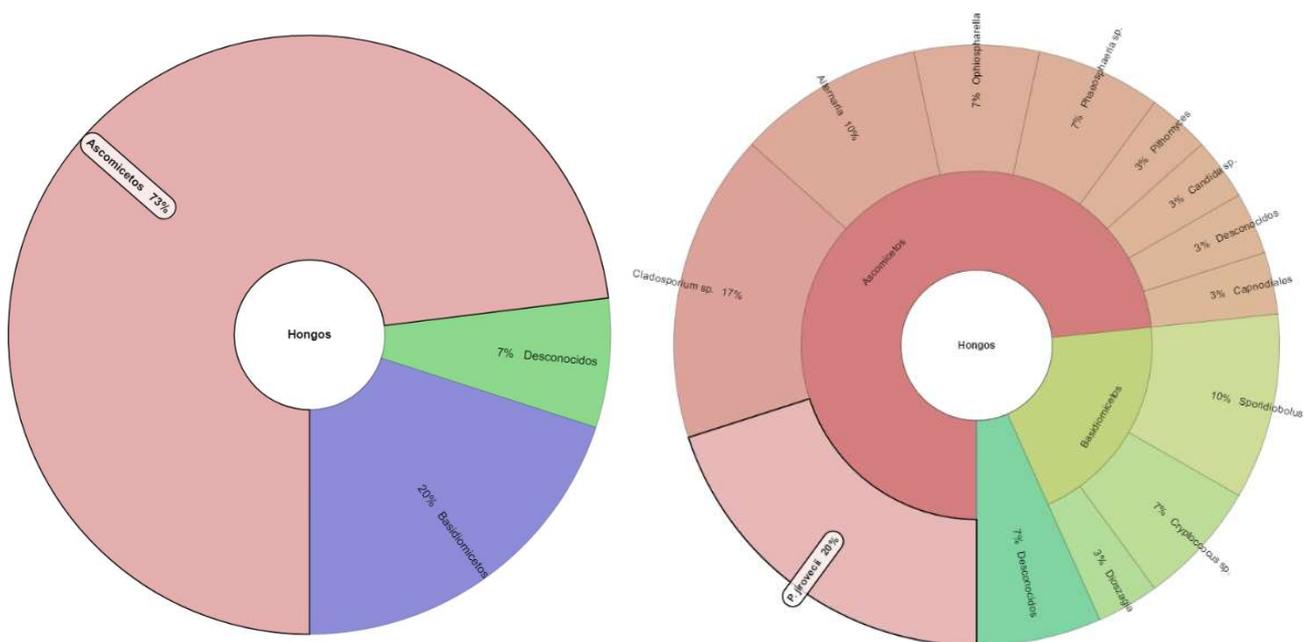
En conjunto, de todas las especies detectadas en las muestras de placenta el 20% correspondía a *Pneumocystis jirovecii*, el 73% eran Ascomicetos frente a un 20 % de Basidomicetos y un 7% de las secuencias que no pudieron identificarse (figura 18)

Figura 18. Especies Fúngicas identificadas en placentas a término

a) Hongos identificados en cada muestra de placentas a término

	ASCOMICETOS										BASIDIOMICETOS		
	<i>P. jirovezi</i>	<i>Alternaria spp</i>	<i>Candida spp</i>	Capnodiates	<i>Cladosporium spp</i>	<i>Ophiostharella spp</i>	<i>Phaeosphaeria spp</i>	<i>Pitomyces spp</i>	Desconocidos	<i>Cryptococcus spp</i>	<i>Dioszegia spp</i>	<i>Sporidiobolus spp</i>	Sin Similitudes
PLC-02	*	*											
PLC-03			*										
PLC-04	*											*	
PLC-06	*				*							*	
PLC-07	*				*								
PLC-09	*							*	*				
PLC-10					*					*			
PLC-11					*								
PLC-12							*						
PLC-13							*						
PLC-15	*				*	*			*				
PLC-16		*									*		
PLC-17					*						*		
PLC-18		*	*								*		

b) Abundancia relativa de los hongos presentes en placentas a termino



## Placentas procedentes de Aborto y tejido pulmonar fetal

Como ya se ha comentado las tasas de prevalencia de colonización para *Pneumocystis* en las placentas de aborto fue del 55% y del 70 % en tejido fetal.

En las placentas se identificaron secuencias de especies fúngicas (figura XX) pertenecientes a siete géneros de ascomicetos (una secuencia más perteneciente a esta división no pudo ser completamente identificada). Siendo nuevamente *Cladosporium spp.* el más abundante, junto a *Pneumocystis*, detectándose en 11 de las 20 muestras (35,7%), e incluso coexistiendo en una muestra dos especies, *C. cladosporioides* y un “uncultured” *Cladosporium*. Entre las secuencias que se ha podido identificar solo encontramos dos especies pertenecientes a los basidiomicetos, un *Cryptococcus oeirensis* no asociado a colonización por *Pneumocystis* y un “Uncultured” basidiomiceto que no pudo identificarse hasta especie.

Además, tres de las secuencias encontradas no pudieron ser identificadas al no presentar similitud con ninguna de las presentes en el banco de NCBI nr/nt. Una cuarta fue identificada como *Hyaloperonospora parasítica*, protista que pertenece al grupo de pseudohongos de los oomicetos.

Al analizar la representación de las diferentes especies identificada en las placentas provenientes de aborto, el 26% correspondía a *Pneumocystis jirovecii*, siendo las especies del género *Cladosporium* (*C. cladosporioides*, *C. tenuissimum*) las más representadas con un 28% del total de especies identificadas. En cuanto a las Divisiones el 79% fueron ascomicetos, solo un 5% basidiomicetos, el 14% no pudo identificarse y el oomiceto ya comentado (figura 19).

En las muestras obtenidas de tejido fetal se identificaron especies pertenecientes a cinco géneros de ascomicetos y una secuencia perteneciente a un hongo del Orden *Capnodiales* que no pudo ser identificado hasta género y especie, las especies de *Cladosporium* también están ampliamente representadas entre las muestras de tejido pulmonar con una prevalencia del 50%. Nuevamente los basidiomicetos están muy poco representados apareciendo tan solo el género *Cryptococcus* en dos muestras y el *Sporidiobolus* en otras dos. Si bien, el número de secuencias que no pudieron llegar a ser identificadas fue muy elevado, en torno al 30 % del total de las secuencias obtenidas, como puede observarse en la representación de abundancia relativa de las especies (figura 20).

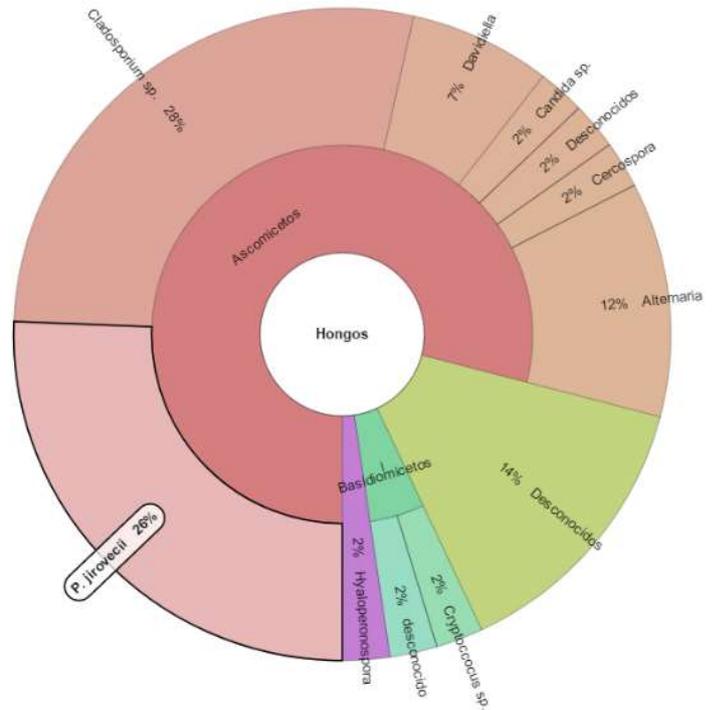
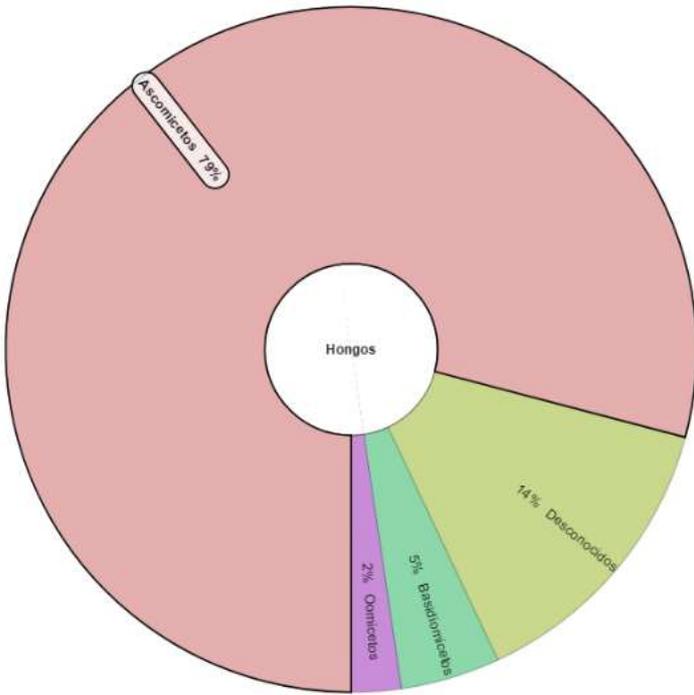
Figura 19. Hongos identificados en placentas y tejido fetal de abortos.

	ASCOMICETOS										BASIDIOMICETOS			
	<i>P. jirovecii</i>	<i>Alternaria spp</i>	<i>Candida spp</i>	<i>Capnodiales</i>	<i>Cercospora spp</i>	<i>Cladosporium spp</i>	<i>Davidiella spp</i>	<i>Dipodascus spp</i>	<i>Pleosporaceae</i>	Desconocidos	<i>Cryptococcus spp</i>	<i>Sporidiobolus spp</i>	Desconocidos	Sin Similitudes
PL-01	*				*2							*		
PU-01	*				*									
PL-02	*				*									
PU-02	*				*				*					
PL-03					*	*								
PU-03	*				*	*								
PL-04						*								
PU-04	*				*							*2		
PL-05	*	*												
PU-05	*				*							*2		
PL-06					*									
PU-06	*													
PL-07	*				*									
PU-07	*				*							*2		
PL-08	*	*2												
PU-08	*		*		*							*		
PL-09						*			*					
PU-09	*	*								*		*		
PL-10	*				*									
PU-10					*									
PL-11	*	*						*						
PU-11	*					*						*		
PL-12	*				*									
PU-12	*					*	*					*		
PL-13		*2	*									*		
PU-13	*					*								
PL-14	*				*									
PU-14												*2		
PL-15						*						*		
PU-15	*	*												
PL-16	*							*			*			
PU-16					*							*		
PL-17	*				*							*		
PU-17						*						*		
PL-18				*								*	*	
PU-18	*				*									
PL-19					*									
PU-19		*				*			*					
PL-20					*									
PU-20										*		*		

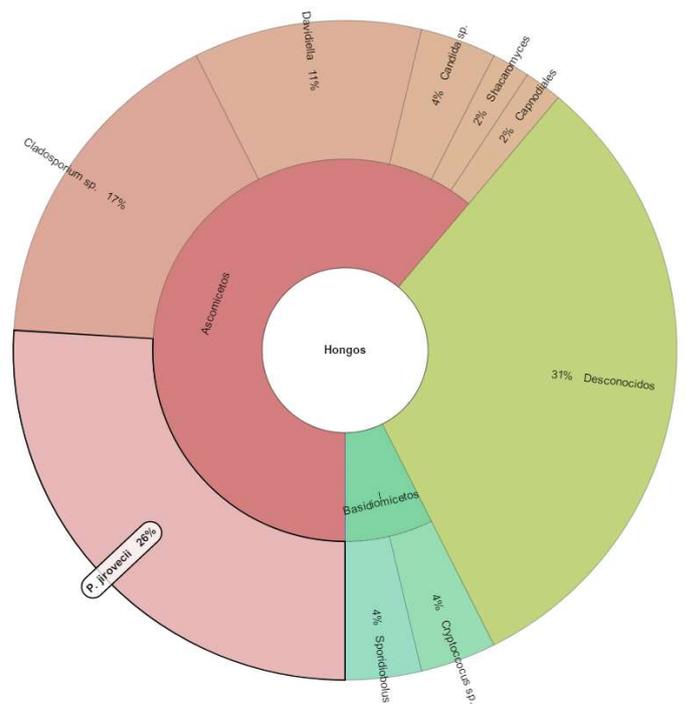
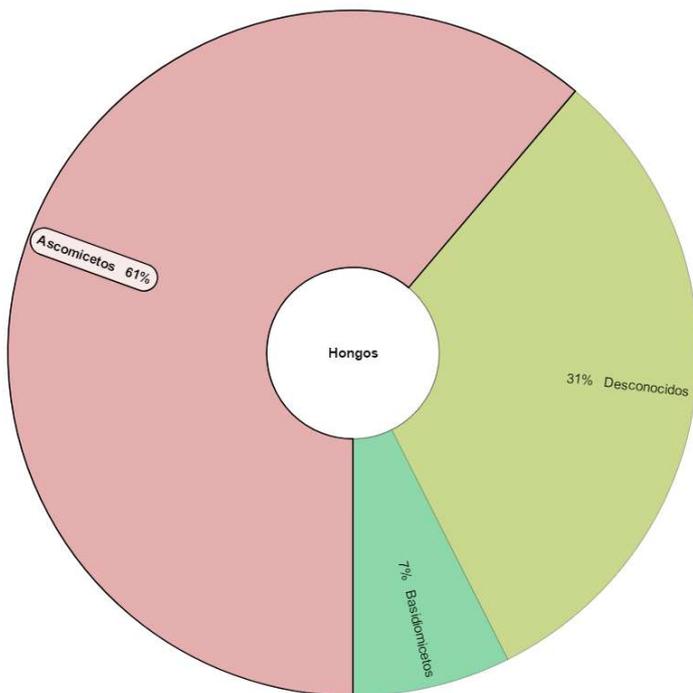
PL: Tejido placentario ; PU: Tejido pulmonar fetal

Figura 20. Abundancia relativa de los hongos identificados en placentas y tejido pulmonar fetal

a) Abundancia relativa de los hongos presentes en placentas de abortos



b) Abundancia relativa de los hongos presentes en tejido pulmonar fetal



## 5.9. Biodiversidad de las especies fúngicas presentes

En conjunto los tres tipos de muestras estudiadas, placentas a término, aborto y tejido fetal presentan una diversidad y distribución similares en cuanto a las especies identificadas, representando los ascomicetos más de un 70% de las encontradas, salvo en tejido fetal posiblemente por el número de secuencias que no pudieron asignarse, y entre estos ascomicetos. De entre estos los que más frecuentemente aparecen en las muestras son la especie *Pneumocystis jirovecii* y diversas especies pertenecientes al género *Cladosporium* con una frecuencia de aparición en las muestras ligeramente inferior a *Pneumocystis*, pero incluso superior en el caso del porcentaje que representan entre los hongos identificados como en el caso de las placentas de abortos. En tejido fetal tras estos dos géneros también está bien representado el género *Davidiella*, generalmente *D. tassiana* que aparece en un 25% de las muestras, representando el 11% de las identificaciones. Pero principalmente lo más destacable es el gran número de secuencias que no se han podido identificar al no estar presente en las bases más usadas, poniendo de manifiesto no solo el poco conocimiento que se tiene de la implicación que estos hongos puedan tener en el hombre, sino incluso el conocimiento de su presencia en él.

Aunque no tenemos una cuantificación de las secuencias identificadas y por tanto no sería del todo correcto aplicar los índices de Biodiversidad de Simpson y Shannon en cada una de estas muestras individualmente, estos al aplicarlos en grupos de muestras, sí que nos pueden dar una idea de cuál es la frecuencia en la que aparecen las diferentes identificaciones en cada tipo de muestra (placentas a término, prematuros, placentas de abortos y tejido fetal), así como un parámetro para compararlas entre ellas.

Para el cálculo de los parámetros de diversidad, las secuencias no identificadas que eran similares se agruparon en diferentes taxones, al igual que en los casos en los que solo se llegó a determinar el género (tabla 14). Las muestras de tejido que muestran unos índices de biodiversidad de Simpson menores son las de tejido procedentes de abortos, debido a la dominancia de *Pneumocystis* y *Cladosporium sp.* en estas muestras, lo que se manifiesta en un menor índice de "Equitatividad" que nos indica que son muestras con un equilibrio entre las especies que aparecen menor que las de placentas a término. El índice de Shannon, sin embargo, es más alto en los tejidos fetales, probablemente debido a la influencia del número de secuencias no identificadas presente en estas muestras, muchas de ellas desconocidas, no

siendo este número de diferentes identificaciones lo suficientemente alto en las placentas de abortos como para llegar a corregir su valor frente a las placentas a término.

Tabla 14. Parámetros de Biodiversidad para las muestras de tejido

	Placenta a término	Placenta Aborto	Tejido fetal
<i>Taxones</i>	16	16	20
<i>Identificaciones</i>	26	40	53
<i>Dominancia</i>	0,09763	0,1238	0,1
<b><i>Ds</i></b>	0,9024	0,8762	0,9
<b><i>H'</i></b>	2,578	2,427	2,661
<b><i>E</i></b>	0,9298	0,8754	0,8883
<i>Ds : Índice de Simpson ; H' : Índice de Shannon; E : Equitatividad</i>			
Muestras con biodiversidad normal			<i>Ds &gt; de 0,9</i> <i>H' entre 2 y 3</i>

## **6. DISCUSIÓN**

El presente estudio es el primero en evaluar de forma amplia el impacto de la colonización por *Pneumocystis jirovecii* en mujeres embarazadas en el momento del parto y en sus recién nacidos. En este trabajo se ha demostrado una elevada tasa de colonización en gestantes, significativamente más alta que en mujeres no embarazadas, identificando a las mujeres embarazadas como un grupo de riesgo para la colonización por *P. jirovecii*. También se ha demostrado una alta tasa de colonización en recién nacidos relacionada con la colonización de sus madres, indicando la importancia de la transmisión vertical de *P. jirovecii* en la especie humana.

Por otra parte, los resultados de este trabajo identifican por primera vez la colonización por *Pneumocystis* en mujeres embarazadas como un potencial factor de riesgo para presentar partos prematuros.

Por último, en este trabajo se confirma también la alta tasa de colonización por *Pneumocystis* presente en los abortos espontáneos y se describe la microbiota presente en las placentas de estos abortos en comparación con la existente en las placentas de embarazos a término, abriendo una puerta a nuevas líneas de investigación sobre el papel de las infecciones fúngicas como causa de abortos en la especie humana.

### **6.1. Limitaciones**

La detección de ADN de *P. jirovecii* por técnicas moleculares, en la que se basan las tasas de prevalencia dadas en este estudio, no necesariamente implica la existencia de microorganismos completos y viables con capacidad infectiva. No obstante, las técnicas de PCR para la amplificación de secuencias del microorganismo están ampliamente validadas y utilizadas en la realización de estudios epidemiológicos, sobre todo en el caso de estudios de colonización donde la carga parasitaria es muy baja y las técnicas de tinción no son sensibles (Calderón et al. 2010). Por otra parte, en modelos animales se ha podido comprobar cómo la detección de ADN de *Pneumocystis* en animales no inmunodeprimidos se correlacionaba con la presencia de microorganismos vivos en estado reproductivo y que mantenían su capacidad infectiva (M. Chabé et al. 2004).

Otra cuestión a considerar sería la validez de las muestras de lavado orofaríngeo y de aspirado nasal utilizadas en el estudio, teniendo en cuenta que actualmente se considera que las muestras de lavado broncoalveolar representan la muestra de referencia para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis* en la práctica clínica cuando este no se puede alcanzar con el análisis de muestras de esputo espontáneo o inducido (Calderón et al. 2010).

Sin embargo, este tipo de abordaje diagnóstico no puede ser utilizado en este estudio de colonización por la imposibilidad de obtener dicho tipo de muestras; en el caso de las embarazadas porque no suelen expectorar y no resultaría admisible éticamente someterlas a una técnica invasiva como la broncoscopia necesaria para obtener muestras de lavado broncoalveolar, y en el caso de los recién nacidos por similares razones.

En adultos el lavado orofaríngeo ha demostrado su utilidad en el diagnóstico clínico de la PcP con una sensibilidad del 89%, una especificidad del 94%, un valor predictivo positivo del 93% y un valor predictivo negativo del 91% en comparación con las muestras de lavado broncoalveolar (Helweg-Larsen et al. 1998) y ha sido utilizado en múltiples estudios epidemiológicos sobre colonización por *Pneumocystis* tanto en sujetos inmunodeprimidos como en inmunocompetentes (Wissmann, Morilla, Martín-Garrido, Friaiza, Respaldiza, Povedano, Juan M Praena-Fernández, et al. 2011; Pereira et al. 2014; Hviid et al. 2017).

En esta línea, nuestro grupo pudo comprobar la gran concordancia existente entre las muestras de lavado broncoalveolar y las muestras de lavado orofaríngeo obtenidas de un mismo sujeto para la detección de la colonización por *Pneumocystis* mediante técnicas moleculares con una sensibilidad del 95,6% y una especificidad del 87,5% utilizando una PCR anidada para la detección de *Pneumocystis* en muestras de lavado orofaríngeo y muestras de lavado broncoalveolar como referencia (Respaldiza et al. 2006).

Por otro parte, los aspirados nasales se han utilizado también con frecuencia en estudios epidemiológicos realizados en niños (Totet et al. 2003; S L Vargas et al. 2001; Larsen et al. 2007) y su utilidad para identificar la presencia de *Pneumocystis* en los pulmones se ha comprobado en modelos animales (Oz & Hughes 1999). De hecho se ha planteado su aplicación en clínica para el diagnóstico de la PcP (To et al. 2013).

En cuanto a la identificación de otras especies fúngicas, los cebadores universales utilizados para la amplificación de las secuencias ITS, como es lógico presentan diferente afinidad según las secuencias diana y por tanto la sensibilidad en la detección puede verse sesgada en función de la complementariedad de las secuencias ITS de los hongos presentes en la muestra. Sin embargo, su validez para este tipo de estudios ha sido ampliamente evaluada y corroborada en la literatura (Millar *et al.*, 2007; Dentinger, Didukh and Moncalvo, 2011; Schoch *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2015; Op De Beeck et al. 2014) y es la región que está siendo actualmente utilizada en las nuevas técnicas de secuenciación masiva para la identificación de la microbiota (Delhaes et al. 2012; Kim et al. 2015; Liu et al. 2017; Shi et al. 2017). Por último,

en la detección e identificación de especies fúngicas otro sesgo en la interpretación de los resultados podría ser el hecho de usar cebadores específicos para la detección de ADN de *Pneumocystis*, que podría hacer que la detección de este microorganismo sea más sensible, y por tanto su frecuencia de aparición en las muestras puede estar sobreestimada respecto a la de los otros hongos presentes, pero dada la peculiaridad de este microorganismo en general y de su genoma en particular en el que el *locus* ITS2 solo está representado una sola vez (Nahimana *et al.*, 2000) frente a las repetidas secuencias en tándem es que se presenta en los demás especies fúngicas hacen necesaria esta PCR específica para su estudio.

En general con respecto a las técnicas de amplificación y a pesar de seguir los controles de calidad en la realización de ellas, comentados ya en este trabajo, no puede descartarse completamente la aparición tanto de falsos positivos como negativos, lo que representaría una limitación en la interpretación de los resultados

Por último, cabe plantearse si la distribución y el tamaño muestral obtenido puede limitar el alcance y la generalización de los resultados. Respecto al primer objetivo de la tesis creemos que el número de casos incluidos (82 embarazadas y 36 controles) es suficiente pues supera el número requerido en el cálculo previo del tamaño muestral que realizamos. Otro aspecto es si el número de embarazos a término y de prematuros es suficiente para evidenciar diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la prevalencia de colonización. Esta misma consideración puede realizarse respecto a los datos relativos a los estudios histológicos y de microbiota donde por las razones ya comentadas no podía hacerse un cálculo de tamaño muestral *a priori*. No obstante, creemos que el número de placentas y abortos incluidos puede considerarse suficiente para un estudio descriptivo.

## **6.2. Prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en embarazadas**

La tasa global de colonización hallada en las mujeres embarazadas en el momento del parto fue del 39%, casi tres veces mayor que la tasa de colonización por *Pneumocystis* observada en el grupo control integrado por mujeres de similar edad no embarazadas.

Estas prevalencias son cercanas o incluso superiores a las encontradas en diversas patologías pulmonares asociadas con un riesgo alto de colonización por el microorganismo, en este sentido, se han publicado prevalencias de un 33,8% en pacientes con enfermedad pulmonar intersticial (Vidal *et al.* 2006), un 38% en fibrosis quística (M. A. A. Pederiva *et al.* 2012), o superiores al 50% en pacientes con EPOC (E. J. E. J. Calderón *et al.* 2007).

El único estudio existente con el que podemos comparar nuestra población, es uno realizado en 2003 por el Dr. Sergio Vargas (Vargas et al. 2003b) que obtuvo una tasa de colonización del 15,15% (5 casos de 33) en mujeres embarazadas en el tercer trimestre de gestación claramente inferior al 39% encontrado en nuestra serie ( $p = 0,013$ ).

Estas discrepancias podrían deberse a diferencias geográficas en la distribución de la colonización por *Pneumocystis*, como se ha visto que sucede en algunas enfermedades pulmonares crónicas como la Fibrosis Quística (Hernández-Hernández et al. 2012). Sin embargo, esta explicación parece poco probable si tenemos en cuenta la alta tasa de colonización descrita en Chile estudiando muestras de tejido pulmonar de niños en edad infantil muertos inesperadamente de los que más del 80% estaban colonizados (Vargas et al. 2013).

Otra explicación, quizás más plausible, a la menor tasa de colonización encontrada por Vargas en su estudio en embarazadas chilenas podría encontrarse en el tipo de muestra empleada para el diagnóstico. La detección de *Pneumocystis* se llevó a cabo, al igual que en nuestro estudio, mediante la amplificación de la secuencia mtLSU del ARN ribosómico, pero la muestra analizada fue tomada mediante hisopado nasal, que parece ser menos representativo de la flora presente en el tracto superior de las vías aéreas que el lavado orofaríngeo con el que hemos realizado nuestro estudio de prevalencia en embarazadas, lo que podría explicar la baja tasa de colonización encontrada en embarazadas en Chile en relación a la prevalencia obtenida por nosotros.

En el único estudio publicado previamente en nuestro medio sobre prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en población general (Medrano et al. 2005), en el que se utilizaron también muestras de lavado orofaríngeo y técnicas moleculares para el diagnóstico, la prevalencia encontrada fue del 20%, inferior al 39% encontrado entre las embarazadas incluidas en nuestro estudio ( $p = 0,023$ ).

Estos datos, junto a la diferencia encontrada en nuestro trabajo de colonización en mujeres de similar edad no gestantes, identifican el estado de embarazo como un factor de riesgo para la colonización por *Pneumocystis*. La elevada tasa de colonización encontrada en mujeres embarazadas puede explicarse por los cambios en la respuesta inmunitaria, inherentes en este grupo poblacional para promover el crecimiento y desarrollo del feto. En este sentido se ha descrito un incremento en la respuesta Th2 que media la inmunidad humoral frente a la Th1 que media la inmunidad celular, que se ha asociado a un peor pronóstico, así como a un incremento en las infecciones que requieren de esta vía protectora para su defensa, como es el

caso de la PcP. También los cambios hormonales producidos durante el embarazo (secreción de gonadotropina coriónica humana, progesterona, estrógeno, corticosteroides,  $\alpha$ -fetoproteína, prolactina, etc.) así como también los cambios en la producción de citoquinas, podría afectar a la resistencia contra diferentes infecciones y facilitar por tanto la colonización (Freer et al. 2016; Ghaebi et al. 2017).

### **6.3. Prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en recién nacidos**

La tasa global de colonización en recién nacidos en nuestro estudio se sitúa en un 29,7%, mostrando una mayor frecuencia de colonización los nacidos de forma prematura, aunque sin alcanzar significación estadística.

No hay estudio que, como el nuestro, hayan estudiado de forma específica la prevalencia de colonización por *Pneumocystis* en recién nacidos. Existen trabajos publicados en los que se ha estudiado la presencia de *Pneumocystis* en casos de Síndrome de Muerte Súbita del Lactante en los que se han encontrado prevalencias del 35% en Chile, del 14% en Reino Unido y del 13,9% en EE.UU. muy superiores al 2,9% de prevalencia de colonización hallada en lactantes muertos por otras causas en Chile (Vargas et al. 1999; Morgan et al. 2001). Sin embargo, los datos de estos estudios, no pueden ser comparados directamente con los nuestros porque la identificación de la presencia de *Pneumocystis* se realizó mediante técnicas de tinción en tejido pulmonar.

Los resultados de estos trabajos iniciales fueron los que llevaron a pensar que la infección por *Pneumocystis* podría ser causa de muerte súbita en los lactantes. Sin embargo, con la utilización de técnicas moleculares para el diagnóstico se pudo comprobar que la frecuencia de colonización era similar en casos de muerte súbita y en lactantes fallecidos por otras causas. En esta línea el propio grupo de Vargas demostró la presencia de ADN de *Pneumocystis* en el tejido pulmonar del 50,6% de casos de Síndrome de Muerte Súbita del Lactante y en el 58,3% de lactantes muertos por otras causas, grupo en el que se encontraron siete casos no sospechados de neumonía por *Pneumocystis* (Vargas et al. 2007). De nuevo, estos datos no podemos compararlos directamente con nuestros hallazgos en recién nacidos vivos, ya que el tipo de muestras estudiadas eran muy diferentes, tejido pulmonar frente a aspirados nasales, y la condición clínica de los sujetos analizados también era totalmente diferente.

En un estudio llevado a cabo en Dinamarca en lactantes ingresados por infecciones agudas del tracto respiratorio se encontró la presencia de ADN de *P. jirovecii* en el aspirado

nasal del 16% de los casos (Larsen et al. 2007). Curiosamente en este estudio se pudo comprobar que la tasa de positividad para *Pneumocystis* variaba según la edad de los lactantes, encontrándose las mayores frecuencias entre los 50 y 112 días de vida con un 48% y siendo solo de un 2% en los lactantes menores de 50 días (Larsen et al. 2007). Estos datos son difíciles de explicar en relación con nuestros resultados. Una posible explicación sería que los recién nacidos normalmente eliminan la colonización y esto podría estar favorecido por anticuerpos maternos en los lactantes más jóvenes. En este sentido, estudios en animales han demostrado que los anticuerpos maternos son protectores en lactantes (Garvy & Harmsen 1996; Bartlett et al. 1998; Empey et al. 2004).

Un trabajo muy reciente de nuestro grupo que ha analizado aspirados nasales de 128 recién nacidos de menos de 32 semanas de gestación y/o de menos de 1500 g ha encontrado una tasa de prevalencia de colonización por *Pneumocystis* del 25,7% (IC 95%: 17,8%-33,7%) totalmente superponible a la hallada en este trabajo de tesis (Rojas et al. 2017)

#### **6.4. Relación entre colonización en la madre y el recién nacido**

En nuestro estudio se evidenció una gran concordancia entre la presencia de colonización por *Pneumocystis* en las madres y sus recién nacidos lo que sugiere una transmisión vertical desde las gestantes a sus hijos.

La evidencia actual indica que la vía aérea es la forma principal de transmisión de las diferentes especies de *Pneumocystis*, pero algunas de ellas son capaces de transmitirse también verticalmente por vía transplacentaria (Chabé et al. 2009). Los estudios disponibles sobre la transmisión transplacentaria de las diferentes especies de *Pneumocystis* sugieren que varía de unos mamíferos a otros dependiendo del tipo de placenta (Sanchez, Chabé, Aliouat, Durand-Joly, Gantois, Conseil, López, Duriez, Dei-Cas, Sergio L Vargas, et al. 2007; Crystal R Icenhour et al. 2002). La transmisión transplacentaria de *Pneumocystis* se ha demostrado en los conejos, pero no parece ocurrir en ratas y ratones (Sanchez, Chabé, Aliouat, Durand-Joly, Gantois, Conseil, López, Duriez, Dei-Cas, Sergio L Vargas, et al. 2007; Crystal R Icenhour et al. 2002).

En la especie humana, la transmisión transplacentaria de *Pneumocystis* se sugirió por primera vez para explicar los casos publicados antes de la epidemia de SIDA de neumonía por este microorganismo en recién nacidos (Pavlica 1962; Bazaz et al. 1970). Posteriormente, se comunicó la presencia de quistes de *Pneumocystis* en el tejido pulmonar de un feto nacido muerto de una madre de 33 años infectada por el VIH que desarrolló una PcP

(Emmanuel Mortier et al. 1995). Sin embargo, este hallazgo no pudo corroborarse posteriormente utilizando inmunofluorescencia con anticuerpos específicos (W. T. Hughes 1995). Por otra parte, se planteaba la duda sobre si ese hallazgo era solo fruto en este caso de la intensa inmunodepresión de la embarazada infectada por el VIH o podría ser una situación que se diera en circunstancias normales en la especie humana.

La demostración incuestionable de la existencia de transmisión vertical transplacentaria de *P. jirovecii* en la especie humana fue aportada por nuestro grupo al publicar un estudio que demostraba mediante técnicas moleculares la presencia de forma simultánea de ADN de dos genes diferentes de *P. jirovecii* en el tejido pulmonar del 35% de fetos muertos antes de nacer que, al no haber llegado a respirar, no habían podido adquirir la infección por vía aérea, así como en el 5% de las placentas estudiadas lo que indicaba que constituían la vía de paso de la infección (Montes-Cano et al. 2009).

En nuestro estudio, aunque no hemos podido evidenciar la presencia de *P. jirovecii* en la sangre de las embarazadas, el hallazgo de ADN de *Pneumocystis* en algunas de las placentas estudiadas de embarazos a término, permite confirmar la presencia de transmisión transplacentaria de *P. jirovecii* en la especie humana en circunstancias normales, aunque no podemos descartar que algunos recién nacidos pudieran haber adquirido la infección por vía aérea instantes después del nacimiento como sucede en las ratas (Crystal R Icenhour et al. 2002).

Por otra parte, la poca correlación entre el hallazgo de ADN de *Pneumocystis* en el tejido placentario y su identificación en los lavados orofaríngeos podría deberse a falta de sensibilidad de la muestra utilizada para detectar la situación de colonización de las madres, o que el paso de *Pneumocystis* a la placenta y el feto puede producirse en etapas más precoces del embarazo, lo que parece más probable si tenemos en cuenta que tampoco hemos encontrado ADN de *Pneumocystis* en sangre de la madre en el momento del parto.

#### **6.5. Efectos de la colonización por *Pneumocystis* en el embarazo**

Los resultados de nuestro estudio señalan por primera vez que la colonización por *Pneumocystis* en mujeres embarazadas puede influir en la duración de la gestación y constituir por tanto un factor de riesgo para el desarrollo de partos pretérmino y quizás abortos.

En términos biológicos la reproducción humana puede considerarse bastante ineficiente, ya que una considerable proporción de embarazos, que puede oscilar entre un 12 y

un 22%, no llegan a buen término (Brown S, 2008). El conocimiento actual sobre las causas que explican este fenómeno es limitado. En sentido amplio se considera un aborto espontáneo el que se produce entre la concepción y el momento en que el feto es viable, alrededor de la semana 23 de gestación, después de este momento y hasta la semana 36 de gestación se produciría un parto pretérmino, que es responsable del 70% de la mortalidad neonatal y del 50% de las secuelas neurológicas de los recién nacidos (Sinha et al. 2008; García-Enguídanos et al. 2002a). La mayoría de los abortos espontáneos ocurren durante el primer trimestre del embarazo y están frecuentemente relacionados con anormalidades cromosómicas del feto, mientras que los que ocurren más tarde se relacionan con factores extrínsecos o de la madre (García-Enguídanos *et al.*, 2002; Brown, 2008).

Las infecciones intrauterinas son una causa bien establecida de rotura prematura de las membranas y parto pretérmino, habiéndose identificado una variedad de gérmenes, entre los que se incluyen *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Gardnerella vaginalis* o *Bacteroides spp.*, e incluso microorganismos no cultivables como *Leptotrichia spp.*, que actuarían produciendo un aumento de citoquinas proinflamatorias, prostaglandinas y metaloproteasas que conduce a la maduración del cuello uterino, la rotura de membranas, las contracciones y el parto prematuro (Romero, Espinoza, L. Gonçalves, et al. 2007; Han et al. 2009)

En esta misma línea, diversos estudios han confirmado el papel de las infecciones como causa de abortos espontáneos, sobre todo durante el segundo trimestre del embarazo (Arora et al. 2017; McDonald & Chambers 2000; Matovina et al. 2004). Aunque los microorganismos pueden acceder a la placenta y el feto por vía hematológica, como el protista *Toxoplasma gondii*, se considera que en la mayoría de los casos la infección se produce por vía ascendente desde el tracto genital, por lo que estos estudios han intentado relacionar estas complicaciones obstétricas con la flora bacteriana presente en la vagina y el cuello uterino (McDonald & Chambers 2000; Matovina et al. 2004).

Diversos hongos pueden formar parte también de la microbiota presente en el tracto genital femenino. De hecho, las infecciones cervicovaginales por *Candidas* pueden afectar a un 20% de las mujeres embarazadas, pero la incidencia de infecciones ascendentes es menor del 1% y parece que raramente causa complicaciones en el embarazo (Friebe-Hoffmann et al. 2000). Sin embargo, las infecciones fúngicas constituyen una de las principales causas de abortos en el ganado bovino (Kirkbride 1992).

El hecho, demostrado en nuestro estudio, de que las mujeres embarazadas pueden ser colonizadas por *Pneumocystis jirovecii*, así como la evidencia de la presencia de ADN de *Pneumocystis* en el tejido placentario, lo que presupone su paso a la sangre desde el pulmón, y la alta tasa de infección documentada en abortos espontáneos obligan a plantear el papel que este microorganismo puede desempeñar alterando el desarrollo normal del embarazo en la especie humana.

El género *Pneumocystis*, como hemos visto, contiene numerosas especies muy bien adaptadas a sus huéspedes específicos con los que llevan coevolucionando desde hace millones de años (Aliouat-Denis et al. 2008). En este sentido, la ruta de transmisión transplacentaria podría constituir un mecanismo de adaptación que garantizaría la persistencia del microorganismo con independencia de las circunstancias ambientales que pueden afectar la transmisión, como sucede en los protozoarios *Apicomplexa*, *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, y en los nematodos, *Toxocara*, de carnívoros (Dubey et al. 2007; Hide 2016; Santos et al. 2017).

La capacidad de *Pneumocystis*, demostrada en modelos animales, de inducir activación de macrófagos alveolares en fases muy tempranas de la infección a través del factor nuclear kB (NF-kB) con elevación de interleuquinas proinflamatorias, hace pensar que la infección intrauterina podría también producir estas alteraciones condicionando una rotura prematura de las membranas y parto pretérmino a través de estos mecanismos inflamatorios (Thomas & Limper 2007). Por otra parte, nuestro grupo ha demostrado que la colonización por *Pneumocystis* produce en sujetos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) un aumento de citoquinas proinflamatorias en sangre, lo que podría suceder también en las mujeres gestantes colonizadas y alterar el desarrollo normal de su embarazo (E. J. Calderón et al. 2007). Sin embargo, el análisis histológico realizado en nuestro estudio no ha podido evidenciar relación entre la presencia de *Pneumocystis* y alteraciones anatomopatológicas en los tejidos placentarios. No obstante, es posible que *Pneumocystis* pueda desencadenar una respuesta inflamatoria intrauterina con aumento de citoquinas proinflamatorias que produzcan la puesta en marcha de la dinámica del parto sin producir alteraciones morfológicas en la placenta. Este aspecto no ha sido estudiado en el presente trabajo, pero constituye una línea para continuar la investigación en este tema.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto que la placenta no es un órgano estéril sino que de hecho tiene una microbiota propia diferente a la vaginal, más parecida a la de la

cavidad oral y con menos diversidad que la intestinal (Pelzer et al. 2016). Diversos estudios han demostrado que las mujeres que tienen partos prematuros presentan cambios en la composición de la microbiota placentaria con un espectro más amplio de bacterias que las encontradas en las placentas de partos a término (Doyle et al. 2014; Vinturache et al. 2016; Prince et al. 2016).

Sin embargo, todos estos trabajos se han centrado en el estudio de la microbiota bacteriana y la información disponible sobre el micobioma presente en la placenta y en el humano en general son muy limitados, debido a que prácticamente todos los estudios existentes en el hombre o en animales están basados en la detección de los hongos por medios de cultivo o con el uso de PCR específicas, mientras que el uso de estas técnicas de metagenómica sí que está ampliamente difundido en muestras ambientales generalmente relacionada con la agricultura o la ecología (Jasrotia *et al.*, 2014; Veach, Dodds and Jumpponen, 2015; Rudawska *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2017; Shi *et al.*, 2017). Nuestro estudio confirma la existencia de una microbiota fúngica en las placentas de embarazos tanto a término como en casos de aborto, y muestra algunas diferencias en la composición de las mismas, con una menor diversidad en el caso de abortos donde predominan *Pneumocystis* y *Cladosporium spp.*

Aunque esta diversidad, medida por los índices de Shannon y Simpson es muy similar, hay que recordar que el número de muestras en las que se ha podido hacer las identificaciones de especies fúngicas ha sido menor en el caso de placentas a término y junto a la metodología usada en la que hemos sustituido el número total de cada especie por la frecuencia encontrada de identificaciones en el conjunto muestral de cada tipo, puede hacer que los valores  $H'$  y  $D_s$  estén subestimados en placentas a término. Además, unido a los valores de “Equitatividad” más bajos en placentas tejido fetal procedentes de aborto nos indican que la biodiversidad en placentas a término es más rica que en placentas de abortos. Estas diferencias de diversidad y predominancia, si bien ligeras, podrían sugerir un papel de estos microorganismos en el proceso abortivo que no hemos podido relacionar. En esta línea, resulta interesante recordar el papel antagonista que se ha descrito en la interacción entre hongos y bacterias que compiten por un mismo nicho ecológico (Friaiza *et al.*, 2010; Baker *et al.*, 2017). En este sentido, la microbiota fúngica podría actuar sobre el desarrollo del parto de forma directa, pero también modificando la microbiota bacteriana cuyo papel en la prematuridad parece hoy día más claro.

Por otra parte, el mayor número de taxones y secuencias detectado en tejido fetal frente al encontrado en placentas, sugieren que estas son un mero paso de los microorganismos hacia el feto donde podrían ejercer su acción.

Por último, resaltar el hecho del gran número de identificaciones con las que no se han encontrado secuencias conocidas, lo que indica el gran desconocimiento no solo del papel que estos hongos juegan en el proceso del embarazo, sino incluso de su existencia.

Estas hipótesis abren la puerta a nuevas líneas de investigación sobre el papel de la microbiota fúngica en general y de *P. jirovecii* en particular en la fisiopatología del embarazo. Los papeles relativos de la diversidad microbiana, tanto de hongos como de bacterias, la carga de ambos y la respuesta del huésped en la inducción del parto prematuro deben aún esclarecerse. Una mayor comprensión de cuándo y cómo actúa la microbiota y su relación con el parto prematuro debe conducir a nuevas formas de limitar los nacimientos pretérminos y disminuir la morbimortalidad asociada a ellos.

## **7. CONCLUSIONES**

## **Conclusiones**

1. Este estudio muestra una elevada tasa de colonización en gestantes en el momento del parto frente a la observada en mujeres no gestante en edad fértil identificando el embarazo como un factor de riesgo para la colonización por *Pneumocystis jirovecii*.
2. Existe una gran concordancia entre la presencia de colonización por *Pneumocystis* en las madres y sus recién nacidos lo que sugiere una transmisión vertical desde las gestantes a sus hijos.
- 3- La colonización por *Pneumocystis* en las gestantes se asocia a una reducción en la duración del embarazo y por tanto podía constituir un factor de riesgo de prematuridad y posiblemente de aborto.
- 4- No hemos evidenciado que la colonización por *Pneumocystis* produzca alteraciones morfológicas específicas en los tejidos placentarios.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## BIBLIOGRAFÍA

- Aliouat-Denis, C.-M. et al., 2008. Pneumocystis species, co-evolution and pathogenic power. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 8(5), pp.708–26.
- Aliouat, E.M. et al., 1994. Pneumocystis cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 41(5), p.71S.
- Alison Morris Henry Masur, Peter D. Walzer, Debra L. Hanson, Toni Frederick, Laurence Huang; Charles B. Beard, and Jonathan E. Kaplan#, J.D.L., 2004. Current Epidemiology of Pneumocystis Pneumonia. *Emerging Infectious Diseases*, 10(10).
- Allaert, A. et al., 1996. Role of alveolar macrophages during the spontaneous Pneumocystis carinii pneumonia of rabbit at weaning. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 43(5), p.23S.
- Arora, N. et al., 2017. Microbial Vertical Transmission during Human Pregnancy. *Cell host & microbe*, 21(5), pp.561–567.
- Baker, J.L. et al., 2017. Ecology of the Oral Microbiome: Beyond Bacteria. *Trends in microbiology*, 25(5), pp.362–374.
- Barragan, A. & Sibley, L.D., 2003. Migration of Toxoplasma gondii across biological barriers. *Trends in microbiology*, 11(9), pp.426–30.
- Bartlett, M.S. et al., 1998. Antibody to Pneumocystis carinii protects rats and mice from developing pneumonia. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 5(1), pp.74–7.
- Bartlett, M.S. et al., 1997. Detection of Pneumocystis carinii DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *Journal of clinical microbiology*, 35(10), pp.2511–3.
- Bartlett, M.S. & Lee, C.-H., 2010. Airborne spread of Pneumocystis jirovecii. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 51(3), p.266.
- Bazaz, G.R. et al., 1970. Pneumocystis carinii pneumonia in three full-term siblings. *The Journal of pediatrics*, 76(5), pp.767–9.
- Beard, C.B. et al., 2005. Genetic Differences in Pneumocystis Isolates Recovered from Immunocompetent Infants and from Adults with AIDS: Epidemiological Implications. *The Journal of Infectious Diseases*, 192(10), pp.1815–1818.
- Beard, C.B. et al., 2000. Genetic variation in Pneumocystis carinii isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerging infectious diseases*, 6(3), pp.265–72.
- Op De Beeck, M. et al., 2014. Comparison and Validation of Some ITS Primer Pairs Useful for Fungal Metabarcoding Studies B. Neilan, ed. *PLoS ONE*, 9(6), p.e97629.

- de Boer, M.G.J. et al., 2007. An Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia with 1 Predominant Genotype among Renal Transplant Recipients: Interhuman Transmission or a Common Environmental Source? *Clinical Infectious Diseases*, 44(9), pp.1143–1149.
- du Bois, R.M. et al., 2003. Is there a role for microorganisms in the pathogenesis of sarcoidosis? *Journal of internal medicine*, 253(1), pp.4–17.
- Boylan, C.J. & Current, W.L., 1992. Improved rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia: induced laboratory infections in *Pneumocystis*-free animals. *Infection and immunity*, 60(4), pp.1589–97.
- Brown, S., 2008. Miscarriage and its associations. *Seminars in reproductive medicine*, 26(5), pp.391–400.
- Calderón-Sandubete, E.J. et al., 2002. Historical Perspective on *Pneumocystis carinii* Infection. *Protist*, 153(3), pp.303–310.
- Calderón-sandubete, E.J., de Armas Rodriguez, Y. & Capó de Paz, V., 2011. *Pneumocystis jirovecii* : cien años de historia. *Rev Cubana Med Trop*, 63(2), pp.97–116.
- Calderón, E. et al., 2004. *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 23(7), pp.545–9.
- Calderón, E.J. et al., 1996. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet (London, England)*, 347(9006), p.977.
- Calderón, E.J. et al., 2010. *Pneumocystis* infection in humans: diagnosis and treatment. *Expert.Rev.Anti.Infect.Ther.*, 8(1744–8336 (Electronic)), pp.683–701.
- Calderón, E.J. et al., 2007. Systemic Inflammation in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease Who Are Colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clinical Infectious Diseases*.
- Calderón, E.J.E.J. et al., 2007. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jirovecii*. *Clinical Infectious Diseases*, 45(2), pp.e17–e19.
- Cano, S. et al., 1993. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without predisposing illnesses. Acute episode and follow-up of five cases. *Chest*, 104(2), pp.376–81.
- Cardenal, R. et al., 2001. *Pneumocystis carinii* pneumonia in heart transplant recipients. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 20(4), pp.799–802.
- Carini, A.; Maciel, J., 1914. Sobre o *Pneumocystis carinii*. *Ann Paulistas Med Cir*, 2, p.70.
- Carini, A., 1910. Formas de eschizogonia do trypanosoma lewisi. *Bol Soc Med Sao Paolo*, 16, p.210.
- Cere, N. et al., 1997. *In utero* transmission of *Pneumocystis carinii* sp. f. *Oryctolagi*. *Parasite*, 4(4), pp.325–330.
- Chabé, M. et al., 2004. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: Histological and RT-PCR data demonstrate active replication. *European Journal of*

*Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 23(2), pp.89–97.

- Chabé, M. et al., 2004. Immunocompetent hosts as a reservoir of pneumocystis organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 23(2), pp.89–97.
- Chabé, M. et al., 2011. Pneumocystis: From a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species. *FEMS Yeast Research*, 11(1), pp.2–17.
- Chabé, M. et al., 2009. Transmission de Pneumocystis. *Journal de Mycologie Medicale*, 19(4), pp.276–284.
- Chagas, C., 1909. Nova tripanozomiazaea humana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1, pp.159–218.
- Christensen, P.J. et al., 2008. Pneumocystis murina infection and cigarette smoke exposure interact to cause increased organism burden, development of airspace enlargement, and pulmonary inflammation in mice. *Infection and immunity*, 76(8), pp.3481–90.
- Cushion, M.T. et al., 2010. Echinocandin treatment of Pneumocystis pneumonia in rodent models depletes cysts leaving trophic burdens that cannot transmit the infection. *PLoS ONE*, 5(1).
- Cushion, M.T. & Smulian, A.G., 2006. Pneumocystis 2006: summary of the research presented at the ninth International Workshop on Opportunistic Protists. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 53 Suppl 1(s1), pp.S80-4.
- Cushion, M.T. & Stringer, J.R., 2005. Has the name really been changed? It has for most researchers. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41(12), pp.1756–8.
- Dei-Cas, E., 2000. Pneumocystis infections: the iceberg? *Medical mycology*, 38 Suppl 1, pp.23–32.
- Delanoe, M. ; Delanoe, P., 1912. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le Trypanosoma lewisi. *CR Acad Sci (Paris)*, 155, pp.658–60.
- Delhaes, L. et al., 2012. The airway microbiota in cystic fibrosis: A complex fungal and bacterial community-implications for therapeutic management. *PLoS ONE*, 7(4).
- Demanche, C. et al., 2005. Molecular and serological evidence of Pneumocystis circulation in a social organization of healthy macaques (*Macaca fascicularis*). *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 9), pp.3117–25.
- Dentinger, B.T.M., Didukh, M.Y. & Moncalvo, J.-M., 2011. Comparing COI and ITS as DNA Barcode Markers for Mushrooms and Allies (Agaricomycotina) B. Schierwater, ed. *PLoS ONE*, 6(9), p.e25081.
- Doyle, R.M. et al., 2014. Term and preterm labour are associated with distinct microbial community structures in placental membranes which are independent of mode of delivery. *Placenta*, 35(12), pp.1099–101.
- Dubey, J.P., Schares, G. & Ortega-Mora, L.M., 2007. Epidemiology and control of neosporosis and Neospora caninum. *Clinical microbiology reviews*, 20(2), pp.323–67.
- Dumoulin, A. et al., 2000. Transmission of Pneumocystis carinii disease from

- immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 19(9), pp.671–8.
- Durand-Joly, I. et al., 2002. Pneumocystis carinii f. sp. hominis is not infectious for SCID mice. *Journal of clinical microbiology*, 40(5), pp.1862–5.
- Edman, J.C., Edman, U., et al., 1989. Isolation and expression of the Pneumocystis carinii dihydrofolate reductase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(22), pp.8625–9.
- Edman, J.C., Kovacs, J.A., et al., 1989. Ribosomal RNA genes of Pneumocystis carinii. *The Journal of protozoology*, 36(1), p.18S–20S.
- Edman, J.C. et al., 1988. Ribosomal RNA sequence shows Pneumocystis carinii to be a member of the Fungi. *Nature*, 334(6182), pp.519–522.
- Edman U, Edman JC, Lundgren B, S.D., 1989. Isolation and expression of the Pneumocystis carinii thymidylate synthase gene. - PubMed - NCBI. *Proc Natl Acad Sci* , 86(17), pp.6503–7.
- Egan, J.J., Woodcock, A.A. & Stewart, J.P., 1997. Viruses and idiopathic pulmonary fibrosis. *The European respiratory journal*, 10(7), pp.1433–7.
- Empey, K.M. et al., 2004. Passive immunization of neonatal mice against Pneumocystis carinii f. sp. muris enhances control of infection without stimulating inflammation. *Infection and immunity*, 72(11), pp.6211–20.
- Eriksson, O., 1994. Isolation and expression of the Pneumocystis carinii dihydrofolate reductase gene. - PubMed - NCBI. *Syst. Ascomycetum.*, 13, pp.165–180.
- Fernandez-Aguilar, S. et al., 2005. [Placental lesions in human Trypanosoma cruzi infection]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 38 Suppl 2, pp.84–6.
- Freer, G., Quaranta, P. & Pistello, M., 2016. Evaluation of T Cell Immunity against Human Cytomegalovirus: Impact on Patient Management and Risk Assessment of Vertical Transmission. *Journal of Immunology Research*, 2016, pp.1–8.
- Frenkel, J.K., 1976. Pneumocystis jiroveci n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *National Cancer Institute monograph*, 43, pp.13–30.
- Frenkel, J.K., 1999. Pneumocystis pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 46(5), p.89S–92S.
- Friaza, V., la Horra, C. de, Rodríguez-Domínguez, M.J., et al., 2010. Metagenomic analysis of bronchoalveolar lavage samples from patients with idiopathic interstitial pneumonia and its antagonistic relation with Pneumocystis jirovecii colonization. *Journal of Microbiological Methods*, 82(1), pp.98–101.
- Friaza, V., la Horra, C. de, Rodríguez-Domínguez, M.J., et al., 2010. Metagenomic analysis of bronchoalveolar lavage samples from patients with idiopathic interstitial pneumonia and its antagonistic relation with Pneumocystis jirovecii colonization. *Journal of microbiological methods*, 82(1), pp.98–101.

- Friebe-Hoffmann, U. et al., 2000. *Candida albicans* chorioamnionitis associated with preterm labor and sudden intrauterine demise of one twin. A case report. *The Journal of reproductive medicine*, 45(4), pp.354–6.
- García-Enguádanos, A. et al., 2002a. Risk factors in miscarriage: a review. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 102(2), pp.111–9.
- García-Enguádanos, A. et al., 2002b. Risk factors in miscarriage: a review. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 102(2), pp.111–9.
- Garvy, B.A. & Harmsen, A.G., 1996. Susceptibility to *Pneumocystis carinii* infection: host responses of neonatal mice from immune or naive mothers and of immune or naive adults. *Infection and immunity*, 64(10), pp.3987–92.
- Ghaebi, M. et al., 2017. Immune regulatory network in successful pregnancy and reproductive failures. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 88, pp.61–73.
- Gigliotti, F. et al., 1993. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infection and immunity*, 61(7), pp.2886–90.
- Gigliotti, F., 2006. *Pneumocystis carinii* nomenclature: response to Cushion and Stringer. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(8), pp.1208–9.
- Gutiérrez, S. et al., 2011. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. *Parasite*, 18(2), pp.121–126.
- Gutiérrez, S. et al., 2011. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. *Parasite (Paris, France)*, 18(2), pp.121–6.
- Haase, G., 1997. *Pneumocystis carinii* Delanoë & Delanoë (1912) has been placed in the Archiascomycetales, a class of the Ascomycota. *Infection and immunity*, 65(10), pp.4365–6.
- Hampton, M.M., 2015. Congenital Toxoplasmosis: A Review. *Neonatal network : NN*, 34(5), pp.274–8.
- Han, Y.W. et al., 2009. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *Journal of clinical microbiology*, 47(1), pp.38–47.
- Hawksworth, D.L., 2007. Responsibility in naming pathogens: the case of *Pneumocystis jirovecii*, the causal agent of pneumocystis pneumonia. *The Lancet. Infectious diseases*, 7(1), p.3–5; discussion 5.
- Helweg-Larsen, J. et al., 2002. Detection of *Pneumocystis* DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia--a case-control study. *BMC infectious diseases*, 2, p.28.
- Helweg-Larsen, J. et al., 1998. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. *Journal of clinical microbiology*, 36(7), pp.2068–72.
- Hernández-Hernández, F. et al., 2012. Prospective multicenter study of *Pneumocystis jirovecii* colonization among cystic fibrosis patients in France. *Journal of clinical microbiology*, 50(12), pp.4107–10.

- Herrag, M., Elfassy Fihry, M.T. & Alaoui Yazidi, A., 2010. Pneumocystis jirovecii : what does this mean? *Revue de Pneumologie Clinique*, 66(6), pp.342–346.
- Hide, G., 2016. Role of vertical transmission of Toxoplasma gondii in prevalence of infection. *Expert review of anti-infective therapy*, 14(3), pp.335–44.
- Huang, L. et al., 2003. Pneumocystis colonization in HIV-infected patients. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 50 Suppl, pp.616–7.
- Huang, L. et al., 2000. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the Pneumocystis carinii dihydropteroate synthase gene. *Journal of Infectious Diseases*, 182(4), pp.1192–1198.
- Hughes, W., 1995. Pneumocystis in Infants and Children. *New England Journal of Medicine*, 333(5), pp.320–321.
- Hughes, W.T., 1982. Natural mode of acquisition for de novo infection with Pneumocystis carinii. *The Journal of infectious diseases*, 145(6), pp.842–8.
- Hughes, W.T., 1995. Pneumocystis in Infants and Children. *New England Journal of Medicine*, 333(5), pp.320–321.
- Hviid, C.J. et al., 2017. Detection of Pneumocystis jirovecii in oral wash from immunosuppressed patients as a diagnostic tool. R. F. Speck, ed. *PloS one*, 12(3), p.e0174012.
- Icenhour, C.R. et al., 2002a. Early acquisition of Pneumocystis carinii in neonatal rats as evidenced by PCR and oral swabs. *Eukaryotic Cell*, 1(3), pp.414–419.
- Icenhour, C.R. et al., 2002b. Early acquisition of Pneumocystis carinii in neonatal rats as evidenced by PCR and oral swabs. *Eukaryotic Cell*, 1(3), pp.414–419.
- Icenhour, C.R. et al., 2002. Early acquisition of Pneumocystis carinii in neonatal rats as evidenced by PCR and oral swabs. *Eukaryotic cell*, 1(3), pp.414–9.
- Icenhour, C.R. et al., 2001a. Early acquisition of Pneumocystis carinii in neonatal rats using targeted PCR and oral swabs. *The Journal of eukaryotic microbiology*, Suppl, p.135S–136S.
- Icenhour, C.R. et al., 2001b. Widespread occurrence of Pneumocystis carinii in commercial rat colonies detected using targeted PCR and oral swabs. *Journal of clinical microbiology*, 39(10), pp.3437–41.
- Ito, M. et al., 1991. Study on placental transmission of Pneumocystis carinii in mice using immunodeficient SCID mice as a new animal model. *The Journal of protozoology*, 38(6), p.218S–219S.
- Kaneko, Y. et al., 2006. Pneumocystis jirovecii pneumonia associated with low-dose methotrexate treatment for rheumatoid arthritis: report of two cases and review of the literature. *Modern Rheumatology*, 16(1), pp.36–38.
- Keely, S.P. & Stringer, J.R., 1996. Multi-locus genotype switching in Pneumocystis carinii sp. f. hominis: evidence for reinfection. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 43(5), p.50S.
- Kim, S.H. et al., 2015. Global Analysis of the Fungal Microbiome in Cystic Fibrosis Patients Reveals Loss of Function of the Transcriptional Repressor Nrg1 as a Mechanism of

- Pathogen Adaptation D. A. Hogan, ed. *PLOS Pathogens*, 11(11), p.e1005308.
- Kirkbride, C.A., 1992. Etiologic Agents Detected in a 10-Year Study of Bovine Abortions and Stillbirths. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 4(2), pp.175–180.
- Kling, H.M. et al., 2009. Pneumocystis colonization in immunocompetent and simian immunodeficiency virus-infected cynomolgus macaques. *The Journal of infectious diseases*, 199(1), pp.89–96.
- de la Horra, C. et al., 2004. Association between human-Pneumocystis infection and small-cell lung carcinoma. *Eur J Clin Invest*, 34(3), pp.229–235.
- Laakkonen, J., Fisher, R.N. & Case, T.J., 2001. Spatial analysis on the occurrence of *Pneumocystis carinii* in the shrew *Notiosorex crawfordi* in fragmented landscape in southern California. *The Journal of eukaryotic microbiology*, Suppl, p.111S–112S.
- Lapinsky, S.E., 2013. Obstetric Infections. *Critical Care Clinics*, 29(3), pp.509–520.
- Larsen, H.H. et al., 2007. Primary pneumocystis infection in infants hospitalized with acute respiratory tract infection. *Emerging infectious diseases*, 13(1), pp.66–72.
- Leigh, T.R. et al., 1993. DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect sub-clinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. *Respiratory medicine*, 87(7), pp.525–9.
- Limper, A.H., 2006. *Pneumocystis* Nomenclature. *Clinical Infectious Diseases*, 42(8), pp.1210–1211.
- Liu, J. et al., 2015. Comparison of ITS and 18S rDNA for estimating fungal diversity using PCR–DGGE. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(9), pp.1387–1395.
- Liu, J. et al., 2017. Fungal Diversity in Field Mold-Damaged Soybean Fruits and Pathogenicity Identification Based on High-Throughput rDNA Sequencing. *Frontiers in microbiology*, 8, p.779.
- Martín-Juan, J. et al., 2008. Factores relacionados con la infección por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con Enfermedad Pulmonar Intersticial Difusa ( EPID ). , 20(2), pp.65–73.
- Maskell, N.A. et al., 2003. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax*, 58(7), pp.594–7.
- Matovina, M. et al., 2004. Possible role of bacterial and viral infections in miscarriages. *Fertility and sterility*, 81(3), pp.662–9.
- McDonald, H.M. & Chambers, H.M., 2000. Intrauterine infection and spontaneous midgestation abortion: is the spectrum of microorganisms similar to that in preterm labor? *Infectious diseases in obstetrics and gynecology*, 8(5–6), pp.220–7.
- Medrano, F.J. et al., 2005. *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerging infectious diseases*, 11(2), pp.245–50.
- Mekinian, A. et al., 2011. Original article *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases : prevalence , risk factors of colonization and outcome. , (November 2010), pp.569–577.

- Millar, B.C. et al., 2007. Comparison of four rDNA primer sets (18S, 28S, ITS1, ITS2) for the molecular identification of yeasts and filamentous fungi of medical importance. *British Journal of Biomedical Science*, 64(2), pp.84–89.
- Mohapatra, P.R. & Aggarwal, D., 2008. *Pneumocystis carinii* : name changed? *Clinical and Experimental Dermatology*, 33(6), pp.793–793.
- Montes-Cano, M.A., 2004. Pneumocystis jirovecii Genotypes in the Spanish Population. *Clinical Infectious Diseases*.
- Montes-Cano, M.A. et al., 2009. Vertical transmission of Pneumocystis jirovecii in humans. *Emerging infectious diseases*, 15(1), pp.125–7.
- Morgan, D.J. et al., 2001. Identification of Pneumocystis carinii in the lungs of infants dying of sudden infant death syndrome. *The Pediatric infectious disease journal*, 20(3), pp.306–9.
- Mori, H. et al., 2010. Polymerase chain reaction positivity of Pneumocystis jirovecii during primary lung cancer treatment. *Japanese journal of clinical oncology*, 40(7), pp.658–62.
- Mori, S. et al., 2008. Asymptomatic carriage of Pneumocystis jirovecii in elderly patients with rheumatoid arthritis in Japan: a possible association between colonization and development of Pneumocystis jirovecii pneumonia during low-dose MTX therapy. *Modern Rheumatology*, 18(3), pp.240–246.
- Mori, S. et al., 2006. Pneumocystis jirovecii pneumonia in a patient with rheumatoid arthritis as a complication of treatment with infliximab, anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  neutralizing antibody. *Modern Rheumatology*, 16(1), pp.58–62.
- MORI, S., CHO, I. & SUGIMOTO, M., 2009. A Followup Study of Asymptomatic Carriers of Pneumocystis jirovecii During Immunosuppressive Therapy for Rheumatoid Arthritis. *The Journal of Rheumatology*, 36(8), pp.1600–1605.
- Morris, A., Sciruba, F.C., et al., 2004. Association of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Severity and *Pneumocystis* Colonization. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 170(4), pp.408–413.
- Morris, A. et al., 2008. Epidemiology and clinical significance of pneumocystis colonization. *The Journal of infectious diseases*, 197(1), pp.10–7.
- Morris, A., Kingsley, L.A., et al., 2004. Prevalence and clinical predictors of Pneumocystis colonization among HIV-infected men. *AIDS (London, England)*, 18(5), pp.793–8.
- Morris, A. & Norris, K.A., 2012. Colonization by Pneumocystis jirovecii and Its Role in Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), pp.297–317.
- Mortier, E. et al., 1995. Maternal-fetal transmission of Pneumocystis carinii in human immunodeficiency virus infection. *The New England journal of medicine*, 332(12), p.825.
- Mortier, E. et al., 1995. Maternal–Fetal Transmission of *Pneumocystis carinii* In Human Immunodeficiency Virus Infection. *New England Journal of Medicine*, 332(12), pp.825–826.
- Nahimana, A. et al., 2000. Determination of the copy number of the nuclear rDNA and beta-tubulin genes of Pneumocystis carinii f. sp. hominis using PCR multicompetitors. *The*

- Journal of eukaryotic microbiology*, 47(4), pp.368–72.
- Nevez, G. et al., 2006. Apparent absence of *Pneumocystis jirovecii* in healthy subjects. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 42(11), pp.e99-101.
- Nevez, G. et al., 1997. High frequency of *Pneumocystis carinii* sp.f. hominis colonization in HIV-negative patients. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 44(6), p.36S.
- Nevez, G. et al., 2008. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. *Parasite (Paris, France)*, 15(3), pp.359–65.
- Nevez, G. et al., 2001. *Pneumocystis carinii* detection using nested-PCR in nasopharyngeal aspirates of immunocompetent infants with bronchiolitis. *The Journal of eukaryotic microbiology*, Suppl, p.122S–123S.
- Nevez, G. et al., 1999. Pulmonary Colonization with *Pneumocystis carinii* in Human Immunodeficiency Virus-Negative Patients: Assessing Risk with Blood CD4+ T Cell Counts. *Clinical Infectious Diseases*, 29(5), pp.1331–1332.
- Ng, V.L., Yajko, D.M. & Hadley, W.K., 1997. Extrapulmonary pneumocystosis. *Clinical microbiology reviews*, 10(3), pp.401–18.
- O'Donnell, W.J. et al., 1998. Clearance of *Pneumocystis carinii* cysts in acute *P. carinii* pneumonia: assessment by serial sputum induction. *Chest*, 114(5), pp.1264–8.
- Okuda, Y. et al., 1995. [*Pneumocystis carinii* pneumonia associated with low dose methotrexate treatment for malignant rheumatoid arthritis]. *Ryumachi. [Rheumatism]*, 35(4), pp.699–704.
- Olsson, M. et al., 1996. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA by filtration of air. *Scandinavian journal of infectious diseases*, 28(3), pp.279–82.
- Oz, H.S. & Hughes, W.T., 1999. DNA amplification of nasopharyngeal aspirates in rats: a procedure to detect *Pneumocystis carinii*. *Microbial pathogenesis*, 27(2), pp.119–21.
- Patil, S.P. et al., 2003. Immune responses to *Pneumocystis* colonization and infection in a simian model of AIDS. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 50 Suppl, pp.661–2.
- Pavlica, F., 1962. The first observation of congenital pneumocystic pneumonia in a fully developed stillborn child. *Annales paediatrici. International review of pediatrics*, 198, pp.177–84.
- Pavlica, F., 1962. The first observation of congenital pneumocystic pneumonia in a fully developed stillborn child. *Annales paediatrici. International review of pediatrics*, 198, pp.177–84.
- Pederiva, M.A. et al., 2012. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Medical Mycology*, 50(5), pp.556–560.
- Pederiva, M.A.A. et al., 2012. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Medical Mycology*, 50(5), pp.556–560.
- Pelzer, E. et al., 2016. Review: Maternal health and the placental microbiome. *Placenta*.
- Pereira, R.M. et al., 2014. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among HIV-positive patients in southern Brazil. *Medical mycology*, 52(8), pp.804–9.

- Peters, S.E. et al., 1992. A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. *The Journal of pathology*, 166(2), pp.195–8.
- Peterson, J.C. & Cushion, M.T., 2005. *Pneumocystis*: not just pneumonia. *Current opinion in microbiology*, 8(4), pp.393–8.
- Pifer, L.L. et al., 1978. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics*, 61(1), pp.35–41.
- Pisani, P. et al., 1997. Cancer and infection: estimates of the attributable fraction in 1990. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 6(6), pp.387–400.
- Ponce, C.A. et al., 2010. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(3), pp.347–53.
- Ponce, C.A. et al., 2010. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(3), pp.347–53.
- Prince, A.L. et al., 2016. The placental membrane microbiome is altered among subjects with spontaneous preterm birth with and without chorioamnionitis. *American journal of obstetrics and gynecology*, 214(5), p.627.e1-627.e16.
- Probst, M. et al., 2000. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in patients with chronic lung diseases. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 19(8), pp.644–5.
- Respaldiza, N., 2005. 15 European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, Copenhagen, April 2005. In *Clinical Microbiology and Infection*. pp. 1–98.
- Respaldiza, N. et al., 2004. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(11), pp.1029–1031.
- Respaldiza, N. et al., 2005. Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11(12), pp.1012–5.
- Respaldiza, N. et al., 2006. Usefulness of oropharyngeal washings for identifying *Pneumocystis jirovecii* carriers. *J Eukaryot Microbiol*, 53 Suppl 1(SUPPL. 1), pp.S100-1.
- Rojas, P. et al., 2017. Early acquisition of *Pneumocystis jirovecii* colonization and potential association with respiratory distress syndrome in preterm newborn infants. *Clinical Infectious Diseases*.
- Romero, R., Espinoza, J., Gonçalves, L., et al., 2007. The Role of Inflammation and Infection in Preterm Birth. *Seminars in Reproductive Medicine*, 25(1), pp.021–039.
- Romero, R., Espinoza, J., Gonçalves, L.F., et al., 2007. The role of inflammation and infection in preterm birth. *Seminars in reproductive medicine*, 25(1), pp.21–39.
- Rubin, E. & Zak, F.G., 1960. *Pneumocystis carinii* Pneumonia in the Adult. *New England*

*Journal of Medicine*, 262(26), pp.1315–1317.

- Sanchez, C.A., Chabé, M., Aliouat, E.M., Durand-Joly, I., Gantois, N., Conseil, V., López, C., Duriez, T., Dei-Cas, E., Vargas, S.L., et al., 2007. Exploring transplacental transmission of *Pneumocystis oryctolagi* in first-time pregnant and multiparous rabbit does. *Medical mycology*, 45(8), pp.701–7.
- Sanchez, C.A., Chabé, M., Aliouat, E.M., Durand-Joly, I., Gantois, N., Conseil, V., López, C., Duriez, T., Dei-Cas, E., Vargas, S.L., et al., 2007. Exploring transplacental transmission of *Pneumocystis oryctolagi* in first-time pregnant and multiparous rabbit does. *Medical mycology*, 45(8), pp.701–7.
- Sandhu, Gurpreet S; Stockman Lesslie, Roberts Glenn D., K.B.C., 1995. Molecular Probes for Diagnosis of Fungal Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 33(11), pp.2913–2919.
- Santos, P.C. et al., 2017. Frequency of *Toxocara* spp. antibodies in umbilical cords of newborns attended at the University Hospital in Southern Brazil and factors associated with infection. *Acta tropica*, 170, pp.43–47.
- Schoch, C.L. et al., 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16), pp.6241–6.
- Shi, Y. et al., 2017. Investigation of the fungal community structures of imported wheat using high-throughput sequencing technology Z. Wang, ed. *PLOS ONE*, 12(2), p.e0171894.
- Shimizu, Y. et al., 2009. Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BMC infectious diseases*, 9(1), p.47.
- Sing, A. et al., 2001. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *Journal of clinical microbiology*, 39(7), pp.2717–8.
- Sing, A. et al., 1999. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *Journal of clinical microbiology*, 37(10), pp.3409–10.
- Sinha, S.K., Gupta, S. & Donn, S.M., 2008. Immediate respiratory management of the preterm infant. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 13(1), pp.24–9.
- Spong, C.Y., 2013. Defining “Term” Pregnancy. *Jama*, 309(23), p.2445.
- Stenger, A.A. et al., 1994. *Pneumocystis carinii* pneumonia associated with low dose methotrexate treatment for rheumatoid arthritis. *Scandinavian journal of rheumatology*, 23(1), pp.51–3.
- Stringer, J.R. et al., 2002. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging infectious diseases*, 8(9), pp.891–6.
- Stringer, S.L. et al., 1989. Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *The Journal of protozoology*, 36(1), p.14S–16S.
- Thomas, C.F. & Limper, A.H., 2007. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nature reviews. Microbiology*, 5(4), pp.298–308.

- To, K.K.W. et al., 2013. Use of Nasopharyngeal Aspirate for Diagnosis of Pneumocystis Pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(5), pp.1570–1574.
- Totet, A. et al., 2003. Pneumocystis jiroveci genotypes and primary infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 36(10), pp.1340–2.
- Totet, A. et al., 2003. Immunocompetent Infants as a Human Reservoir for Pneumocystis jirovecii: Rapid Screening by Non-Invasive Sampling and Real-Time PCR at the Mitochondrial Large Subunit rRNA Gene. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 50(s1), pp.668–669.
- Varela, J.M. et al., 2004. Climatic factors and Pneumocystis jiroveci infection in southern Spain. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10(8), pp.770–2.
- Vargas, S.L. et al., 1999. Association of Primary Pneumocystis carinii Infection and Sudden Infant Death Syndrome. *Clinical Infectious Diseases*, 29(6), pp.1489–1493.
- Vargas, S.L. et al., 1995. Limited persistence in and subsequent elimination of Pneumocystis carinii from the lungs after P. carinii pneumonia. *The Journal of infectious diseases*, 172(2), pp.506–10.
- Vargas, S.L. et al., 2013. Near-universal prevalence of Pneumocystis and associated increase in mucus in the lungs of infants with sudden unexpected death. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 56(2), pp.171–9.
- Vargas, S.L. et al., 2010. Pneumocystis colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(3), pp.e19-21.
- Vargas, S.L. et al., 2007. Pneumocystis is not a direct cause of sudden infant death syndrome. *The Pediatric infectious disease journal*, 26(1), pp.81–3.
- Vargas, S.L. et al., 2003a. Pregnancy and asymptomatic carriage of Pneumocystis jiroveci. *Emerging infectious diseases*, 9(5), pp.605–6.
- Vargas, S.L. et al., 2003b. Pregnancy and asymptomatic carriage of Pneumocystis jiroveci. *Emerging infectious diseases*, 9(5), pp.605–6.
- Vargas, S.L. et al., 2001. Search for Primary Infection by Pneumocystis carinii in a Cohort of Normal, Healthy Infants. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), pp.855–861.
- Vargas, S.L. et al., 2001. Search for primary infection by Pneumocystis carinii in a cohort of normal, healthy infants. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 32(6), pp.855–61.
- Vavra, J. & Kucera, K., 1970. Pneumocystis carinii delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *The Journal of protozoology*, 17(3), pp.463–83.
- Vidal, S., 2006. Pneumocystis jirovecii colonisation in patients with interstitial lung disease. *Clinical Microbiology and Infection*, 12.
- Vinturache, A.E. et al., 2016. Maternal microbiome - A pathway to preterm birth. *Seminars in fetal & neonatal medicine*, 21(2), pp.94–9.

- Wakefield, A.E., Pixley, F.J., et al., 1990. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet (London, England)*, 336(8713), pp.451–3.
- Wakefield, A.E., Stewart, T.J., et al., 1990. Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84(6), pp.800–2.
- Wakefield, A.E. et al., 2003. Limited Asymptomatic Carriage of *Pneumocystis jirovecii* in Human Immunodeficiency Virus–Infected Patients. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(6), pp.901–908.
- Walzer, P.D. et al., 1974. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. *Annals of internal medicine*, 80(1), pp.83–93.
- Walzer, P.D., Powell, R.D. & Yoneda, K., 1979. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in different strains of cortisonized mice. *Infection and immunity*, 24(3), pp.939–47.
- White, T.J. et al., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp.315–322.
- Wissmann, G., Morilla, R., Friaza, V., Calderón, E. & Varela, J.M., 2010. [Human reservoirs of *Pneumocystis*]. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 28(1), pp.38–43.
- Wissmann, G., Morilla, R., Friaza, V., Calderón, E. & Varela, J.M., 2010. El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(1), pp.38–43.
- Wissmann, G., Morilla, R., Martín-Garrido, I., Friaza, V., Respaldiza, N., Povedano, J., Praena-Fernández, J.M., et al., 2011. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients treated with infliximab. *European Journal of Clinical Investigation*, 41(3), pp.343–348.
- Wissmann, G., Morilla, R., Martín-Garrido, I., Friaza, V., Respaldiza, N., Povedano, J., Praena-Fernández, J.M., et al., 2011. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients treated with infliximab. *European journal of clinical investigation*, 41(3), pp.343–8.

## **ANEXO**

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EMBARAZADAS

### *Implicaciones de la transmisión vertical de *Pneumocystis* en la especie humana*

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

*Pneumocystis jirovecii* es un hongo atípico y poco virulento que se encuentra muy extendido entre los humanos y otras especies de mamíferos a lo largo del mundo. Este microorganismo puede producir una infección respiratoria a pacientes que, por diferentes causas, padecen alteraciones de su sistema inmunológico que es el encargado de la defensa frente a las infecciones. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que personas sin alteración de su sistema inmunológico pueden ser portadoras de este agente sin llegar a padecer neumonía. Esto se ha observado en un estudio en el 15% de las mujeres en el tercer trimestre de la gestación sin que hasta el momento se conozca el papel que puede desempeñar en la evolución del embarazo.

El **objetivo** de este estudio es aportar información sobre la epidemiología de la infección por *Pneumocystis* en las mujeres embarazadas.

Si decide participar en este estudio, le realizaremos una encuesta sobre su estado de salud y obtendremos muestras de enjuague orofaríngeo para identificar si es portadora de *Pneumocystis*. Para ello sólo necesita hacer gárgaras con suero fisiológico estéril durante un minuto. Usaremos los controles sanguíneos que se le hagan para obtener muestras para estudiar la presencia de *Pneumocystis* en sangre y si tiene defensas (anticuerpos) frente a él. En el momento del parto, o lo antes posible tras el mismo, se obtendrá una muestra de aspirado nasal del recién nacido y otra muestra de lavado orofaríngeo de usted para estudiar la presencia de *Pneumocystis* mediante técnicas moleculares. Se estudiará además la presencia de *Pneumocystis* en tejido de la placenta. Si desgraciadamente usted sufriera un aborto, se estudiaría de igual manera la presencia de *Pneumocystis*. Los datos de los estudios científicos disponibles hasta la fecha apoyan que en personas sin alteración del sistema inmune este agente no provoca alteraciones importantes y, por tanto, no se precisa tratamiento para erradicarlo. Por tanto, usted no recibirá tratamiento en caso que se detecte el microorganismo. Si la evolución clínica hiciese sospechar que este microorganismo le puede estar causando algún problema de salud tanto para usted como para su hijo recibirá tratamiento antibiótico específico frente al mismo, y recibirá todos los cuidados médicos necesarios para su control. A todos los participantes en el estudio se les pide su aceptación por escrito.

#### **Deben conocer, además, la siguiente información:**

- La participación es totalmente voluntaria.
- Usted puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
- La participación en el presente estudio no conlleva ningún riesgo adicional para usted o su futuro hijo, ya que el procedimiento de recogida de muestra no exige nada de extraordinario sobre los cuidados habituales.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con los ginecólogos responsables del estudio en el teléfono que se le facilitará en la tarjeta de participante en el proyecto.



## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA NEONATOS

### *Implicaciones de la transmisión vertical de *Pneumocystis* en la especie humana*

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Vuestro hijo ha nacido antes del momento esperado. Esta circunstancia conlleva que alguno de sus órganos, como son los pulmones, no hayan alcanzado aún el grado de desarrollo y maduración necesario para poder funcionar con normalidad una vez que se encuentra fuera del seno materno. Es por esto que vuestro bebé puede presentar una dificultad para respirar conocida con el nombre de “Enfermedad de Membrana Hialina” o “Síndrome de Distrés Respiratorio” del recién nacido prematuro. Por ello requiere una mayor vigilancia y se le realizan controles que incluyen el aspirado nasal para identificar posibles infecciones.

Se le ofrece participar en un estudio con el objetivo de investigar la posible presencia de colonización por un microorganismo llamado *Pneumocystis jirovecii*, que es un hongo atípico y poco virulento que se encuentra muy extendido entre los humanos y otras especies de mamíferos a lo largo del mundo. Este microorganismo puede producir una infección respiratoria a pacientes que, por diferentes causas, padecen alteraciones de su sistema inmunológico que es el encargado de la defensa frente a las infecciones. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que personas sin alteración de su sistema inmunológico pueden ser portadoras de este agente sin llegar a padecer neumonía, situación que se conoce como colonización. La primera exposición a este hongo parece que se produce en etapas muy tempranas de la vida y parece que puede transmitirse desde madres portadoras a sus hijos recién nacidos tanto por vía aérea como a través de la placenta. En el momento actual, no se conoce si la presencia de este hongo puede alterar la evolución del proceso que tiene vuestro hijo, pero existe el riesgo de que pudiera desarrollar una neumonía por este agente. Por este motivo, si se detectará esta situación su pediatra instauraría el tratamiento más adecuado en cada caso.

Para identificar la posible presencia de este hongo se utilizarán técnicas que permiten detectar el ADN de *Pneumocystis* en el aspirado nasal. Deben saber, que la participación en este estudio no va a suponer ningún cambio sustancial en los cuidados que debemos prestar a vuestro hijo. Por otra parte, para poder conocer el origen de la posible colonización por *Pneumocystis* tenemos que comprobar si la madre del recién nacido está colonizada o no por *Pneumocystis*. Para ello, pretendemos estudiar mediante las mismas técnicas muestras del tejido de la placenta y muestras de lavado orofaríngeo que se obtienen simplemente realizando la madre gárgaras durante un minuto con suero fisiológico estéril.

#### **Deben conocer, además, la siguiente información:**

- La participación es totalmente voluntaria.
  - El paciente, y en este caso sus representantes, pueden retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
  - Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
  - La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
  - La participación en el presente estudio no conlleva ningún riesgo adicional para vuestro hijo, ya que el procedimiento de recogida de muestra no exige nada de extraordinario sobre los cuidados habituales.
- Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal médico de la Unidad de UCI-Neonatos en el teléfono: 955012988 o en el correo electrónico: [sustanciap@gmail.com](mailto:sustanciap@gmail.com).

## CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*

Yo (Nombre y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento

He podido hacer preguntas sobre el estudio “*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*”

He recibido suficiente información sobre el estudio “*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*”

- He hablado con el profesional sanitario informador:.....  
.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de los datos de nuestro hijo y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado “*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*”

Firma del paciente

(o representante legal en su caso)

Firma del profesional

sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

Fecha: .....

Nombre y apellidos: .....

Fecha: .....

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA NEONATOS CON EMH

### *Implicaciones de la transmisión vertical de *Pneumocystis* en la especie humana*

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Vuestro hijo ha nacido antes del momento esperado. Esta circunstancia conlleva que alguno de sus órganos, como son los pulmones, no hayan alcanzado aún el grado de desarrollo y maduración necesario para poder funcionar con normalidad una vez que se encuentra fuera del seno materno. Es por esto que vuestro bebé presenta una dificultad para respirar conocida con el nombre de “Enfermedad de Membrana Hialina” o “Síndrome de Distrés Respiratorio” del recién nacido prematuro.

Esta enfermedad puede afectar en mayor o menor gravedad al recién nacido y exige que le proporcionemos algún tipo de ayuda en la respiración, como puede ser el enriquecimiento con oxígeno del aire que respira en el interior de la incubadora, o incluso la ventilación mecánica. El caso de vuestro hijo requiere que se le preste este tipo de ayuda para lo cual hemos procedido a la intubación –colocación de un tubo en el interior de la tráquea- y conexión mediante unas tubuladuras a una máquina llamada respirador, que hará por él en mayor o menor medida el esfuerzo que conlleva normalmente el respirar. En esta situación permanecerá todo el tiempo que sea preciso hasta que sus pulmones recobren la función necesaria que permita retirar dicha ayuda. Este tiempo puede oscilar desde unas horas a días, semanas, e incluso meses, lo cual dependerá de la evolución individual. A veces los signos de esta dificultad en la respiración se prolongan en el tiempo, dando lugar a lo que conocemos con el nombre de “Enfermedad Pulmonar Crónica” del prematuro o “Displasia Broncopulmonar”. Esta dolencia puede tener diversas consecuencias para el niño, tales como una mayor susceptibilidad y gravedad a las infecciones respiratorias en los primeros años de vida, retraso en el crecimiento y en el desarrollo psicomotor, y mayores necesidades de reingresos hospitalarios, entre otras.

Se le ofrece participar en un estudio con el objetivo de investigar la posible presencia de colonización por un microorganismo llamado *Pneumocystis jirovecii*, que es un hongo atípico y poco virulento que se encuentra muy extendido entre los humanos y otras especies de mamíferos a lo largo del mundo. Este microorganismo puede producir una infección respiratoria a pacientes que, por diferentes causas, padecen alteraciones de su sistema inmunológico que es el encargado de la defensa frente a las infecciones. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que personas sin alteración de su sistema inmunológico pueden ser portadoras de este agente sin llegar a padecer neumonía, situación que se conoce como colonización. La primera exposición a este hongo parece que se produce en etapas muy tempranas de la vida y parece que puede transmitirse desde madres portadoras a sus hijos recién nacidos tanto por vía aérea como a través de la placenta. En el momento actual, no se conoce si la presencia de este hongo puede alterar la evolución del proceso que tiene vuestro hijo, pero existe el riesgo de que pudiera desarrollar una neumonía por este agente. Por este motivo, si se detectará esta situación su pediatra instauraría el tratamiento más adecuado en cada caso.

Para identificar la posible presencia de este hongo se utilizarán técnicas que permiten detectar el ADN de *Pneumocystis* en las secreciones respiratorias acumuladas en el interior del tubo endotraqueal y bronquios. Deben saber, que estas secreciones hay que proceder a aspirarlas mediante una sonda conectada a vacío e introducida a través de dicho tubo, obligatoriamente y de manera periódica en todo paciente intubado, con el fin de evitar obstrucciones del mismo. Además, ya resulta práctica habitual utilizarlas para realizar en ellas otros estudios especiales, como cultivos microbiológicos. Así pues, la participación en este estudio no va a suponer ningún cambio sustancial en los cuidados que debemos prestar a vuestro hijo. La única diferencia es que en el lugar de despreñar las secreciones respiratorias cuando haya que aspirarlas, se recogerían en un recipiente para su posterior análisis. Por otra parte, para poder conocer el origen de la posible colonización por *Pneumocystis*

tenemos que comprobar si la madre del recién nacido esta colonizada o no por *Pneumocystis*. Para ello, pretendemos estudiar mediante las mismas técnicas muestras del tejido de la placenta y muestras de lavado orofaríngeo que se obtienen simplemente realizando la madre gárgaras durante un minuto con suero fisiológico estéril.

**Deben conocer, además, la siguiente información:**

- La participación es totalmente voluntaria.
  - El paciente, y en este caso sus representantes, pueden retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
  - Todos los datos carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
  - La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
  - La participación en el presente estudio no conlleva ningún riesgo adicional para vuestro hijo, ya que el procedimiento de recogida de muestra no exige nada de extraordinario sobre los cuidados habituales.
- Si requiere información adicional se puede poner en contacto con nuestro personal médico de la Unidad de UCI-Neonatos en el teléfono: 955012988 o en el correo electrónico: [sustanciap@gmail.com](mailto:sustanciap@gmail.com).

## CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*

Yo (Nombre y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento

He podido hacer preguntas sobre el estudio “*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*”

He recibido suficiente información sobre el estudio “*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*”

- He hablado con el profesional sanitario informador:.....  
.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informado/a de los datos de nuestro hijo y otros de carácter personal que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado““*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*”

Firma del paciente

(o representante legal en su caso)

Firma del profesional

sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

Fecha: .....

Nombre y apellidos: .....

Fecha: .....

## CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA CASOS DE ABORTO

### *Implicaciones de la transmisión vertical de *Pneumocystis* en la especie humana*

Antes de proceder a la firma de este consentimiento informado, lea atentamente la información que a continuación se le facilita y realice las preguntas que considere oportunas.

Desafortunadamente usted ha sufrido un aborto. Las causas que pueden producir este problema son múltiples y muchas de ellas desconocidas. Las infecciones intrauterinas son una de las causas de abortos y en muchos casos no producen síntomas de alerta previos.

*Pneumocystis jirovecii* es un hongo atípico y poco virulento que se encuentra muy extendido entre los humanos y otras especies de mamíferos a lo largo del mundo. Este microorganismo puede producir una infección respiratoria a pacientes que, por diferentes causas, padecen alteraciones de su sistema inmunológico que es el encargado de la defensa frente a las infecciones. Sin embargo, en los últimos años se ha comprobado que personas sin alteración de su sistema inmunológico pueden ser portadoras de este agente sin llegar a padecer neumonía. Esto se ha observado en un estudio en el 15% de las mujeres en el tercer trimestre de la gestación y se ha comprobado que en el 35% de los abortos espontáneos se encuentra *Pneumocystis* en el tejido fetal. Todo ello ha llevado a pensar que *Pneumocystis* pueda ser una causa de aborto en la mujer pero esto no está probado. El **objetivo** de este estudio es intentar esclarecer este tema.

Le pedimos su autorización para incluir en los estudios que normalmente se hacen en Anatomía Patológica de la placenta y el feto tras un aborto la identificación de *Pneumocystis jirovecii* por técnicas moleculares. Además, para comprobar si usted es portadora de este microorganismo necesitaríamos analizar una muestra de enjuague orofaríngeo. Para ello sólo necesita hacer gárgaras con suero fisiológico estéril durante un minuto.

Los datos de los estudios científicos disponibles hasta la fecha apoyan que en personas sin alteración del sistema inmune este agente no provoca alteraciones importantes y, por tanto, no se precisa tratamiento para erradicarlo. Por tanto, usted no recibirá tratamiento en caso que se detecte el microorganismo. Si la evolución clínica hiciese sospechar que este microorganismo le puede estar causando algún problema de salud recibirá tratamiento antibiótico específico frente al mismo, y recibirá todos los cuidados médicos necesarios para su control. A todos los participantes en el estudio se les pide su aceptación por escrito.

#### **Deben conocer, además, la siguiente información:**

- La participación es totalmente voluntaria.
- Usted puede retirarse del estudio cuando así lo manifieste, sin dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Todos los datos de carácter personal, obtenidos en este estudio son confidenciales y se tratarán conforme a la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- La información obtenida se utilizará exclusivamente para los fines específicos de este estudio.
- La participación en el presente estudio no conlleva ningún riesgo adicional para usted ya que el procedimiento de recogida de muestra no exige nada de extraordinario sobre los cuidados habituales.

Si requiere información adicional se puede poner en contacto con los ginecólogos responsables del estudio en el teléfono que se le facilitará.

## CONSENTIMIENTO INFORMADO POR ESCRITO

*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*

Yo (Nombre y Apellidos):.....

- He leído el documento informativo que acompaña a este consentimiento

He podido hacer preguntas sobre el estudio “*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*”

He recibido suficiente información sobre el estudio “*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*”

- He hablado con el profesional sanitario informador:.....  
.....
- Comprendo que mi participación es voluntaria y soy libre de participar o no en el estudio.
- Se me ha informado que todos los datos obtenidos en este estudio serán confidenciales y se tratarán conforme establece la Ley Orgánica de Protección de Datos de Carácter Personal 15/99.
- Se me ha informado de que la información obtenida sólo se utilizará para los fines específicos del estudio.
- **Deseo** ser informada de los datos que se obtengan en el curso de la investigación, incluidos los descubrimientos inesperados que se puedan producir, siempre que esta información sea necesaria para evitar un grave perjuicio para mi salud o la de mis familiares biológicos.

Si                      No

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

- Cuando quiera
- Sin tener que dar explicaciones
- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el proyecto titulado““*Implicaciones de la transmisión vertical de Pneumocystis en la especie humana*”

Firma de la embarazada

(o representante legal en su caso)

Firma del profesional

sanitario informador

Nombre y apellidos:.....

Fecha: .....

Nombre y apellidos: .....

Fecha: .....