



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

Facultat de Biociències

Departament de Genètica y Microbiologia

Programa de doctorado en Microbiología

## ***Pneumocystis jirovecii* en el siglo XXI**

Tesis presentada por

**Lidia Goterris Bonet**

para optar al grado de Doctor

Trabajo realizado en el Servicio de Microbiología

del Hospital Universitario Vall d'Hebron

Directora:

**María Teresa Martín Gómez**

Tutor:

**Ferran Sánchez Reus**

Barcelona, octubre 2020





**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

Departament de Genètica y Microbiologia

Programa de doctorado en Microbiología

## ***Pneumocystis jirovecii* en el siglo XXI**

**Lidia Goterris Bonet, 2020**



**María Teresa Martín Gómez**, Doctora en Medicina y Cirugía y Médico Adjunto del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Vall d'Hebron y **Ferran Sánchez Reus**, Doctor en Medicina y Cirugía, Profesor asociado médico de la Universitat Autònoma de Barcelona y Médico Adjunto del Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado: “***Pneumocystis jirovecii* en el siglo XXI**”, presentado por la Licenciada en Farmacia y especialista en Microbiología y Parasitología, **Lidia Goterris Bonet**, ha sido realizado bajos su dirección y tutela en el Servicio de Microbiología y Parasitología del Hospital Universitario Vall d'Hebron, y cumple las condiciones exigidas para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral ante el tribunal que corresponda.

**Dra María Teresa Martín Gómez**

**Dr. Ferran Sánchez Reus**

En Barcelona, octubre de 2020



*Als meus pares*



## **AGRADECIMIENTOS**

A Maite, gracias por ser guía en este reto, por todo lo que me has enseñado y por tu dedicación. Aunque en ocasiones el camino no ha sido fácil pero siempre encontraste la manera de reconducirlo.

A todas las personas que con vuestra actividad y calidad profesional me habéis enseñado a disfrutar y ejercer la Microbiología Clínica en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Vall d'Hebron.

También quiero dar las gracias a todas aquellas personas que de alguna manera habéis intervenido en esta tesis. A los que creísteis en mí, habéis sido una pieza clave. A todos aquellos con los que he podido contar como soporte logístico, técnico, académico y moral. Sin vosotros y vosotras no hubiese sido posible.

Por último, a mi familia, por ser mis mejores fans, sin vosotros no hubiese llegado a este punto y porque, como siempre, nunca dudasteis de que lo fuera a conseguir. Gracias por animarme a seguir.



## ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNr: Ácido desoxirribonucleico ribosomal

AUC: del inglés, área bajo la curva

BAL: del inglés, lavado broncoalveolar

$\beta$ -TUB:  $\beta$ -tubulina

Ct: del inglés, cycle threshold

CYTB: citocromo B

ddNTP: didesoxinucleótido

DHFR: dihidrofolato reductasa

DHPS: dihidropteroato sintasa

dNTP: desoxinucleótido

HSP70: del inglés, proteína de shock térmico de 70 KDa

IC: inmunocomprometido

IFD: inmunofluorescencia directa

IMD: inmunodepresión

IOT: intubación orotraqueal

IR: Insuficiencia respiratoria.

ISHAM: del inglés, *International Society of Human and Animal Mycology*

kex1: Kexina

KL-6: antígeno de Krebs von den Lungen-6

LDH: lactato deshidrogenasa

MLG: del inglés, genotipos *multilocus*

MLST: *Multilocus sequencing typing*

MSG: del inglés, glicoproteína mayor de superficie

mtLSU rRNA / mt26S: del inglés, subunidad grande del ARN ribosomal

mtSSU rRNA: del inglés, subunidad pequeña del ARN ribosomal

NOS: Neoplasia de órgano sólido

OW: del inglés, lavado oral

PCR: del inglés, reacción en cadena de la polimerasa

PJP: del inglés, neumonía por *Pneumocystis jirovecii*

RFLP: del inglés, análisis de fragmentos mediante enzimas de restricción

rtPCR: Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real

Rx: Radiografía

SAM: S-adenosil metionina

SBE: del inglés, métodos de extensión de base única

SIDA: síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

SNP: del inglés, polimorfismo de un único nucleótido

SOD: superóxido dismutasa

SSCP: del inglés, polimorfismos de conformación de una sola hebra

STR: del inglés, secuencias de ADN cortas de repetición en tándem

TAC: Tomografía axial computarizada

TARGA: tratamiento antirretroviral de gran actividad

TMP-SMX: trimetoprim-sulfametoxazol o cotrimoxazol

TOS: trasplante de órgano sólido

TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos

TRI: tracto respiratorio inferior

TS: timidilato sintasa

UCI: Unidad de cuidados intensivos

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

26S: intrón de la subunidad 26S del operon del RNA ribosomal nuclear

# ÍNDICE

<b>Resumen .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introducción .....</b>	<b>7</b>
1.1. Perspectiva histórica.....	9
1.2. Aspectos microbiológicos relacionados con <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	12
1.2.1. Taxonomía .....	12
1.2.2. Genética.....	13
1.2.3. Ciclo vital y transmisión .....	16
1.3. Aspectos relacionados con la infección por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	19
1.3.1. Colonización por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	20
1.3.2. Neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	22
1.3.3. Epidemiología de la neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	24
1.3.4. Tratamiento .....	26
1.3.5. Profilaxis.....	28
1.3.6. Diagnóstico microbiológico de la neumonía por <i>P. jirovecii</i> .....	31
1.3.5.1. Técnicas basadas en la microscopía .....	31
1.3.5.2. Técnicas de biología molecular .....	33
1.3.5.3. Otras herramientas diagnósticas: marcadores serológicos .....	36
1.3.7. Técnicas moleculares aplicadas al estudio de la epidemiología de <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	37
1.3.7.1. <i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i> (SSCP).....	37
1.3.6.2. <i>Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis</i> (RFLP) .....	38
1.3.6.3. <i>Short Tandem Repeat</i> (STR) o microsatélites.....	39
1.3.6.4. <i>Single-Base Extension Methods</i> (SBE) .....	40
1.3.7.5. Secuenciación directa de ADN.....	40
1.3.7.5.1. Secuenciación de un único locus .....	41
1.3.7.5.2. <i>Multilocus Sequence Typing</i> (MLST).....	42



<b>2. Justificación, hipótesis y objetivos .....</b>	<b>45</b>
2.1. Justificación del trabajo .....	47
2.2. Hipótesis.....	49
2.3. Objetivos .....	51
<b>3. Material y Métodos.....</b>	<b>57</b>
3.1. Estudio 1: Optimización del diagnóstico microbiológico de la infección por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	57
3.1.1.    Diseño del estudio, pacientes, tipo de muestra clínica y clasificación de los episodios.....	57
3.1.2.    Procedimientos de laboratorio .....	58
3.1.2.1. Detección de <i>P.jirovecii</i> mediante inmunofluorescencia directa .....	58
3.1.2.2. Extracción de ácidos nucleicos .....	58
3.1.2.3. Técnicas de PCR a tiempo real.....	59
3.1.3.    Expresión de los resultados y análisis estadístico .....	60
3.2.    Estudio 2: Genotipado y epidemiología basada en técnicas moleculares .....	61
3.2.1.    Diseño del estudio, pacientes y tipo de muestra clínica .....	62
3.2.2.    Tipado mediante MLST .....	60
3.2.3.    Análisis filogenético .....	65
3.2.4.    Análisis estadístico .....	66
3.3.    Consideraciones éticas.....	66
<b>4. Resultados .....</b>	<b>67</b>
4.1. Estudio 1: Optimización del diagnóstico microbiológico de la infección por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	69
4.1.1.    Rendimiento diagnóstico de DHPS y mtSSU rRNA aplicadas a muestras de lavado broncoalveolar.....	72



4.1.2.	Rendimiento diagnóstico de DHPS y mtSSU rRNA aplicadas a muestras de lavado oral .....	74
4.1.3.	Rendimiento diagnóstico de la técnica microscópica de referencia.....	76
4.2.	Estudio 2: Genotipado y epidemiología basada en técnicas moleculares .....	77
4.2.1.	Tasas de amplificación y relación con la carga fúngica.....	79
4.2.2.	Estudio de locus individuales: variantes alélicas, capacidad discriminatoria y polimorfismos mixtos .....	83
4.2.3.	Capacidad discriminatoria de diferentes combinaciones de loci.....	85
4.2.4.	Variantes genéticas de <i>P. jirovecii</i> , rasgos clínicos e identificación de posibles agrupaciones de casos .....	90
<b>5.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>93</b>
5.1.	Estudio 1: Optimización del diagnóstico microbiológico de la infección por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	95
5.1.1.	Rendimiento diagnóstico de DHPS y mtSSU rRNA aplicadas a muestras de lavado broncoalveolar.....	96
5.1.2.	Rendimiento diagnóstico de DHPS y mtSSU rRNA aplicadas a muestras de lavado broncoalveolar.....	96
5.2.	Estudio 2: Genotipado y epidemiología basada en técnicas moleculares .....	99
5.2.1.	Tasas de amplificación y relación con la carga fúngica.....	100
5.2.2.	Estudio de locus individuales: variantes alélicas, capacidad discriminatoria y polimorfismos mixtos .....	102
5.2.3.	Capacidad discriminatoria de diferentes combinaciones de loci.....	106
5.2.4.	Variantes genéticas de <i>P. jirovecii</i> , rasgos clínicos e identificación de posibles agrupaciones de casos .....	107
5.2.4.1.	Loci individuales.....	107
5.2.4.2.	Esquemas MLST .....	108



<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>111</b>
<b>7. Perspectivas de futuro .....</b>	<b>119</b>
<b>8. Referencias bibliográficas .....</b>	<b>123</b>
<b>9. Anexo: difusión de los resultados relacionados con la presente tesis doctoral .....</b>	<b>139</b>
9.1. Congresos nacionales e internacionales .....	141
9.2. Publicaciones en revistas científicas .....	143



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Comparación de la estructura de la pared celular de <i>Pneumocystis spp</i> (trofozoito y quiste) y <i>Candida albicans</i> .....	14
<b>Figura 2.</b> Características del genoma de <i>Pneumocystis jirovecii</i> que condicionan su relación parasítica con el ser humano.....	15
<b>Figura 3.</b> Imágenes de <i>Pneumocystis</i> al microscopio electrónico. ....	17
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida propuesto para <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	17
<b>Figura 5.</b> Evolución de la carga fúngica de <i>Pneumocystis jirovecci</i> en función del estatus inmunológico del huésped.....	19
<b>Figura 6.</b> Posibles circuitos de transmisión de <i>P. jirovecii</i> entre la población .....	27
<b>Figura 7.</b> A. Distribución de casos de neumonía por <i>P. jirovecii</i> en población VIH atendida en el Hospital Germans Trias i Pujol (1986-2010). B. Casos de neumonía por <i>P. jirovecii</i> por 1000 pacientes VIH y año en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (2000-2013).....	24
<b>Figura 8.</b> Distribución anual de casos de neumonía por <i>P. jirovecii</i> en un hospital de tercer nivel en Lyon (Francia) (2005-2013). ....	25
<b>Figura 9.</b> Imágenes al microscopio de <i>Pneumocystis jirovecii</i> en muestra de lavado broncoalveolar. ....	32
<b>Figura 10.</b> Estimación del número de publicaciones relacionadas con las diferentes técnicas de laboratorio aplicables al diagnóstico de la neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	33
<b>Figura 11.</b> Carga fúngica esperada en función del tipo de muestra utilizado para el diagnóstico de la neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	34

<b>Figura 12.</b> Representación gráfica de la relación entre los valores de Ct y el diagnóstico de neumonía por <i>P. jiroveci</i> en función del tipo de paciente.....	35
<b>Figura 13.</b> Curvas ROC de las PCR con diana DHPS y mtSSU rRNA aplicadas sobre muestras de lavado broncoalveolar para el diagnóstico de la neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	73
<b>Figura 14.</b> Distribución de la carga fúngica detectada en función del grupo de población, tipo de muestra, diana genética y estatus respecto a <i>Pneumocystis</i> .....	74
<b>Figura 15.</b> Diferencia de carga fúngica detectada por cada diana en función del tipo de muestra y el estatus de colonización/infección por <i>Pneumocystis jirovecii</i> para cada paciente.....	76
<b>Figura 16.</b> Rectas de regresión lineal de la proporción de secuenciación exitosa respecto a la carga fúngica (Ct) para cada diana.....	81
<b>Figura 17.</b> Tasas de secuenciación exitosa para cada diana segregadas por el estatus respecto a <i>Pneumocystis</i> .....	82
<b>Figura 18.</b> Dendrograma resultante del esquema MLST 1.....	86
<b>Figura 19.</b> Dendrograma resultante del esquema MLST 2.....	87
<b>Figura 20.</b> Dendrograma resultante del esquema MLST 3.....	88

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Diferencias entre los parámetros clínicos y diagnósticos de la neumonía por <i>P. jirovecii</i> en pacientes VIH y pacientes inmunodeprimidos no VIH.....	23
Tabla 2. Regímenes de tratamiento recomendados para la neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	27
Tabla 3. Indicación de profilaxis para la infección por <i>Pneumocystis jirovecii</i> en pacientes VIH positivos y VIH negativos.....	30
Tabla 4. Dianas genéticas y secuencias de los cebadores y sondas de las PCR a tiempo real utilizadas para el diagnóstico de la infección por <i>P. jirovecii</i> .....	59
Tabla 5. Cebadores utilizados en los esquemas de genotipado, condiciones de amplificación y secuencias de referencia utilizadas.....	64
Tabla 6. Resumen de las principales características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el estudio 1.....	70
Tabla 7. Principales datos clínicos y de laboratorio de los pacientes incluidos en el estudio 1.....	71
Tabla 8. Rendimiento diagnóstico de las PCR con diana DHPS y mtSSU rRNA aplicado sobre muestras de lavado oral y lavado broncoalveolar para el diagnóstico de la neumonía por <i>Pneumocystis jirovecii</i> .....	75
Tabla 9. Principales características de los pacientes incluidos en el estudio 2 (epidemiológico), tipos de muestras y carga fúngica (Ct) presente en las mismas.....	78
Tabla 10. Distribución alélica, ratios de amplificación, proporción de secuenciotipos mixtos e índice de Hunter de los loci secuenciados en el estudio 2.....	80
Tabla 11. Tasas de secuenciación exitosa para cada diana en función del el estatus respecto a <i>Pneumocystis</i> y del tipo de muestra analizada.....	82

**Tabla 12.** Rendimiento de los dos esquemas MLST para el tipado de *Pneumocystis jirovecii* en el estudio 2, así como de otras combinaciones de loci que mostraron los mejores rendimientos para el genotipado. .... 89

**Tabla 13.** Características principales de los pacientes con potenciales conexiones espacio-temporales que se agruparon en los mismos MLG (*multilocus genotypes*) ... 91

## Resumen

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PJP) ha experimentado cambios en su epidemiología en las últimas décadas, sobre todo en países con acceso a los tratamientos antirretrovirales de alta eficacia. La prevalencia de la PJP en pacientes inmunocomprometidos VIH negativos (oncológicos, hematológicos, trasplantados, enfermedades autoinmunes o aquellos que reciben terapias inmunodepresoras) está en aumento. En ellos, por lo general, la infección es más aguda y grave, presentando mayor requerimiento en UCI y mortalidad más elevada, comparado con los VIH positivos. Su diagnóstico se ve dificultado porque característicamente cursa con menor carga fúngica y, con frecuencia, no pueden someterse a una fibrobroncoscopia, poniendo en evidencia la necesidad de mejorar el rendimiento las herramientas convencionales para el diagnóstico de laboratorio. Por otra parte, conocer la diversidad genética de *Pneumocystis* puede facilitar la comprensión de su ecología. Este conocimiento se ha visto limitado hasta la fecha por la ausencia de un método de tipado estandarizado con rendimiento aceptable.

Los objetivos principales de esta tesis son: (i) evaluar el rendimiento de dos PCR a tiempo real sobre muestras obtenidas de forma invasiva y no invasiva para optimización del diagnóstico de la PJP, especialmente en población no VIH, así como la influencia de la diana utilizada, y generando los correspondientes criterios de interpretación; (ii) comparar el rendimiento de dos esquemas de MLST ( $\beta$ -TUB, DHPS, mt26S, ITS versus CYB, mt26S, SOD) propuestos previamente y posibles combinaciones alternativas de sus loci para identificar la estrategia MLST más adecuada para el genotipado de *Pneumocystis*, prestando atención a la influencia de la carga fúngica sobre la tasa de amplificación y (iii) utilizar la combinación de loci con mejor rendimiento describir la epidemiología molecular de *Pneumocystis* en una cohorte retrospectiva en un hospital terciario de Barcelona, incluyendo pacientes colonizados e infectados.

Independientemente de la diana de la PCR utilizada, las muestras de lavado oral resultaron útiles para el diagnóstico rápido y certero de la PJP, mediante una interpretación cualitativa de los resultados. También resultaron útiles en su aplicación a muestras invasivas, aunque se requiere interpretación cuantitativa de los resultados. La carga fúngica tuvo impacto en las tasas de éxito de secuenciación, principalmente en los loci nucleares. Una selección cuidadosa de dianas y la optimización de protocolos técnicos permitió identificar la combinación de CYB, mt26S,  $\beta$ -TUB y SOD como la más adecuada y discriminatoria para el genotipado de *Pneumocystis*, mejorando el rendimiento con respecto a los dos esquemas MLST previamente descritos. La nueva combinación de loci reveló una elevada diversidad genética presente en la cohorte, sin predominancia de secuenciotipos. No se identificó asociación entre variantes alélicas o secuenciotipos y rasgos clínicos. El esquema MLST seleccionado permitió descartar la transmisión cruzada del hongo entre pacientes.

## Summary

In recent decades the epidemiology of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PJP) has experienced changes, particularly in countries with access to highly effective antiretroviral treatment. The prevalence of PJP in immunocompromised HIV-negative patients (oncological, hematological, transplanted, autoimmune diseases or those receiving immunosuppressive therapies) is increasing. They experience an infection that, in general, is more acute, more severe, with a greater requirement of advanced vital support and a higher mortality as compared to HIV-positive patients. The diagnosis of PJP in the former is hampered by their low fungal loads and a critical condition that impedes the performance of a bronchoscopy, highlighting the need to improve the performance of conventional laboratory diagnostic tools. On the other hand, a deeper knowledge of the genetic diversity of *Pneumocystis* could facilitate the understanding of its ecology. To date, this knowledge has been limited by the absence of a standardized typing method with acceptable performance.

The main objectives of this thesis are: (i) to optimize the diagnosis of PJP, especially in non-HIV population, by evaluating the performance of two real-time PCRs on invasively and non-invasively obtained samples, the assessment of the influence of the genetic target and the generation of interpretation criteria; (ii) to compare the performance of two previously proposed MLST schemes ( $\beta$ -TUB, DHPS, mt26S, ITS versus CYB, mt26S, SOD) as well as possible alternative combinations of loci to identify the most suitable MLST strategy for *Pneumocystis* genotyping, paying attention to the influence of fungal load on the rate of amplification and (iii) using the best performing combination of loci, to describe the molecular epidemiology of *Pneumocystis* in a retrospective cohort in a tertiary hospital in Barcelona, including colonized and infected patients.

Regardless of the PCR target used, the oral lavage samples proved to be useful for the rapid and accurate diagnosis of PJP, through a qualitative interpretation of the results.

Both PCR were also useful in their application to invasive samples, although quantitative interpretation of the results is required.

The fungal load had an impact on sequencing success rates, mainly in nuclear loci. A careful selection of targets and the optimization of technical protocols allowed the identification of CYB-mt26S- $\beta$ -TUB-SOD as the most suitable and discriminatory combination for *Pneumocystis* genotyping, improving the performance with respect to the two previously described MLST schemes. The new combination of loci revealed a high genetic diversity present in the cohort, without predominance of sequence types. No association was identified between allelic variants or sequence types and clinical features. The selected MLST scheme allowed to rule out cross transmission of the fungus between patients.





# **INTRODUCCIÓN**



# 1. Introducción

## 1.1. Perspectiva histórica

La historia de *Pneumocystis jirovecii* ha sido tortuosa y llena de avatares. Se inicia en Brasil en 1909, cuando Carlos Chagas, durante sus investigaciones sobre un modelo animal de infección por *Trypanosoma cruzi*, visualiza por primera vez formas quísticas de *Pneumocystis* en los pulmones de cobayas (1). Chagas interpretó el hallazgo de estas formas quísticas como esquizontes que formaban parte del ciclo biológico de *Trypanosoma* y así lo describió en su publicación de aquel año. En 1910 Antonio Carinii, entonces director del Instituto Pasteur de Sao Paulo, también observó la presencia de quistes pulmonares similares a los descritos por Chagas en ratas infectadas con *Trypanosoma lewysi* (2). Ante la sospecha de que dichas formas quísticas pertenecieran a una especie diferente, Chagas envió muestras de cortes histológicos a su colega y experto parasitólogo Charles Louis Alphonse Laveran, del Instituto Pasteur de París. Allí, el matrimonio Delanoë, discípulos del profesor Laveran, demostraron en 1912 que los quistes correspondían a un nuevo microorganismo tras revisar publicaciones previas, las preparaciones de Carini y observar quistes similares en pulmones de ratas capturadas en las cloacas parisienses no relacionadas con la tripanosomiasis que se investigaba en Brasil (3), confirmando así la hipótesis de Antonio Carinii. El matrimonio Delanoë comprobó en posteriores experimentos que, tras la inoculación de dichas formas quísticas, no se desarrollaban formas circulantes del tripanosoma, que tenían tropismo por el pulmón y que su transmisión ocurría, probablemente por vía aérea. Describieron, por tanto, la existencia de un nuevo parásito y sugirieron el nombre de *Pneumocystis carinii*, para denominar unas formas quísticas que sólo se habían visualizado en tejido pulmonar y honrar a quien en primer lugar sospechó la existencia de una nueva especie (4). En los años siguientes, aunque fue descrito en otros mamíferos como monos y conejos, poco más se dio a conocer

acerca del nuevo microorganismo. Probablemente la ausencia de asociación de *Pneumocystis* con cuadros patológicos hizo disminuir el interés por él.

A finales de los años 30, Ammich y Benecke describieron un cuadro neumónico fatal de origen desconocido que afectaba a niños prematuros y/o malnutridos que denominaron neumonía intersticial de células plasmáticas (5). Esta entidad adquirió proporciones epidémicas en Europa Central durante el transcurso de la Segunda Guerra Mundial. En 1942 van der Meer y Brug en Holanda describieron la presencia de formas tróficas de *Pneumocystis* en humanos (6) y fueron los primeros en publicar una imagen fotográfica del microorganismo. Su trabajo, presentado en una revista local en plena ocupación alemana, pasó desapercibido. No fue hasta 1951, cuando Vanek, Jirovec y Lukes descubrieron la presencia de *Pneumocystis* en muestras de los pulmones de los niños fallecidos y establecieron la relación causal entre *P. carinii* y la enigmática neumonitis de células plasmática (7), corroborando el hallazgo de van der Meer y Brug.

La infección causada por *Pneumocystis* fue considerada una enfermedad infantil hasta que, a partir de 1960, aparecieron los primeros casos en pacientes adultos. Principalmente se detectó en pacientes atendidos en grandes hospitales norteamericanos con diferentes causas de inmunosupresión como cáncer, trasplante de órgano sólido, inmunodeficiencias primarias o malnutrición (8). Más tarde, en 1976 Frenkel demostró que la especie de *Pneumocystis* que infectaba a las ratas era diferente a la que producía patología en humanos mediante estudios serológicos (9). La especie que infecta las ratas quedó nombrada como *P. carinii* y Frenkel propuso el nombre de *Pneumocystis jirovecii*, en honor a Otto Jirovec, al ser quien, por primera vez, había identificado la presencia de *Pneumocystis* en humanos, en su estudio sobre la neumonitis de células plasmáticas. El cambio de nomenclatura, junto a la errónea consideración de *Pneumocystis* como parásito en lugar de hongo, suscitó agrias polémicas editoriales y confusiones relativas a su asignación taxonómica que han perdurado hasta 2009 (9–13).

La primera serie amplia de casos fue publicada por Walzer en 1974 (14). En ella se incluyeron 194 casos de neumonía por *P. jirovecii*, poniendo de manifiesto que los pacientes afectados habitualmente padecían situaciones de inmunodepresión severas. Además, se demostró que la malnutrición es un factor de riesgo para la neumonía por *P. jirovecii*.

La infección por *Pneumocystis* se asociaba a pacientes inmunodeprimidos hasta 1981, cuando en distintas áreas geográficas de Estados Unidos empezaron a aparecer casos de neumonía por *P. jirovecii* que afectaban a varones jóvenes sin causa alguna de inmunosupresión conocida (15) pero que presentaban como características comunes ser homosexuales y/o adictos a drogas intravenosas con bajos recuentos o disfunción de linfocitos T. Este hecho acabó siendo desencadenante del descubrimiento del SIDA y llevó a la descripción de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). En los siguientes años, la prevalencia de la infección por *Pneumocystis* fue incrementándose rápidamente en este colectivo de manera que en 1983 se reportó la presencia de infección por *P. jirovecii* en más del 35% de los casos de SIDA (16). Pocos años más tarde, en 1989, el *Center for Disease Control* publicó la guía de profilaxis de la infección por *Pneumocystis* en pacientes infectados por el VIH, indicando su aplicación en aquellos pacientes con mayor riesgo de infección (adultos con subpoblación linfocitaria  $CD4+ < 200/cm^3$ ). Con ello se logró una considerable disminución de la prevalencia de la infección en los siguientes años. En 1996 la aparición de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) cambió el escenario clínico y epidemiológico de la infección por el VIH. La TARGA mejoró sustancialmente el estado inmunológico de los pacientes con infección por VIH, permitiendo la retirada de la profilaxis en pacientes con recuento de  $CD4+$  restablecido. De este modo, la combinación de TARGA y la profilaxis han permitido que la neumonía por *P. jirovecii* en los pacientes VIH quede controlada al menos en los países más desarrollados y con acceso a estas terapias. En las últimas dos décadas, aunque en los países en vías de desarrollo la infección por *Pneumocystis* en

pacientes VIH sigue representando un problema prevalente, en nuestro entorno ha pasado a estar relacionada con pacientes con infección por VIH no controlada y pacientes con otras causas de inmunosupresión. Actualmente, lejos de ser una infección rara, se estima que la neumonía por *P. jirovecii* afecta a más de 500.000 personas/año en todo el mundo (17).

## **1.2. Aspectos microbiológicos relacionados con *P. jirovecii***

### **1.2.1. Taxonomía**

La taxonomía de *Pneumocystis spp* ha cambiado a lo largo de los años. Desde su descubrimiento y durante casi 80 años, *Pneumocystis* fue considerado un protozoo basándose, principalmente, en (i) sus características morfológicas, (ii) la identificación de dos formas de vida (trofozoito y quiste), (iii) la incapacidad de aislarlo en un cultivo in vitro y (iv) la respuesta a fármacos antiparasitarios (pentamidina) y no a los antifúngicos conocidos en aquellos momentos.

Con el advenimiento de las técnicas moleculares, en 1988 se consiguió estudiar una secuencia del fragmento 18S del ARNr y se pudo determinar que *Pneumocystis* presentaba una relación más cercana con los hongos que con los protozoos (18,19). Otros genes mitocondriales, incluyendo la subunidad mayor del ARNr mitocondrial (mtLSU rRNA), también mostraron homología con los organismos fúngicos (20). Además, la demostración de la presencia de un tercer factor de elongación en la síntesis proteica, presente en hongos, pero no en el resto de eucariotas, así como la existencia de la timidilato sintasa (TS) y dihidrofolato reductasa (DHFR) como dos enzimas diferentes (en protozoos existe una única enzima con la doble función), fueron evidencias que demostraron fehacientemente la pertenencia de *Pneumocystis* al reino Fungi. Así pues, el género tiene una entidad propia dentro de los Ascomicetos: Phylum: *Ascomycota*, Subphylum: *Taphrinomycotina*, Clase: *Pneumocystidomycetes*, Orden: *Pneumocystidales*, Familia: *Pneumocystidaceae* (20,21).

### 1.2.2. Genética

Actualmente gran parte de los avances en el conocimiento de la biología de los microorganismos se basan en aspectos genéticos. En el caso particular de *Pneumocystis*, estos avances se producen muy lentamente, principalmente debido a la falta de un sistema de propagación *in vitro* eficiente. En 1997 se lanzó un proyecto internacional de secuenciación del genoma de *Pneumocystis* (22), que preveía la inclusión de dos especies: *P. carinii*, que se usaría como modelo ya que es la especie que predominantemente se halla en ratas de laboratorio, y *P. jirovecii*. Debido a las dificultades para obtener ADN de calidad, los primeros resultados del proyecto no fueron comunicados hasta 2006, cuando se publicó el primer ensamblaje, parcial y altamente fragmentado, del genoma de *P. carinii* (23). En 2012, se publicó el primer ensamblaje de *P. jirovecii*, que utilizaba tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) (24).

Pese a pertenecer al mismo género, existen importantes diferencias entre especies en lo que a la organización del material genético se refiere: se sabe que el genoma nuclear de *P. carinii* y *P. murina* está estructurado en 5 cromosomas, mientras que en *P. jirovecii* se presume la existencia de hasta 17 potenciales cromosomas (21). Las diferencias entre especies se extienden, además, al genoma mitocondrial: mientras que el mitogenoma de *P. carinii* y *P. murina* es lineal y sigue el mismo orden, el de *P. jirovecii* es circular y con diferente orden de los genes (25).

Una característica importante es que el tamaño del genoma es considerablemente inferior al de otros ascomicetos: el de *P. jirovecii* es de 8.4 Mb y el de *P. carinii* de 7.7 Mb, aproximadamente la mitad que el de *Candida albicans* (de 14.3 Mb) y 4 veces menor que el de *Aspergillus fumigatus*, de 29.4 Mb (21). Este pequeño tamaño refleja una reducción evolutiva en distintas especies de *Pneumocystis* atribuible a pérdida de genes, reducción de la longitud de genes, reducción de los espacios intergénicos y simplificación de las estructuras génicas. La reducción del genoma se traduce en pérdida de funciones metabólicas (síntesis de proteínas, metabolismo de

carbohidratos, lípidos y cofactores, así como respuesta al estrés) y una reducción en la estructura de la pared celular de *Pneumocystis spp* en comparación con otros hongos (ausencia de quitina y de mananos; figuras 1 y 2). Estas pérdidas de funciones parecen estar relacionadas con la optimización de recursos celulares producida en el curso de la adaptación a la forma de vida parasitaria característica de las especies de *Pneumocystis spp* (21,26). Otro hecho destacable es la alta expansión de proteínas de superficie, fundamentalmente a expensas de la superfamilia de genes de glicoproteínas de superficie, directamente implicada en la evasión de la respuesta inmune del hospedador (26).

**Figura 1.** Comparación de la estructura de la pared celular de *Pneumocystis spp* (trofozoito y quiste) y *Candida albicans*. Obtenida de Ma et al (21).

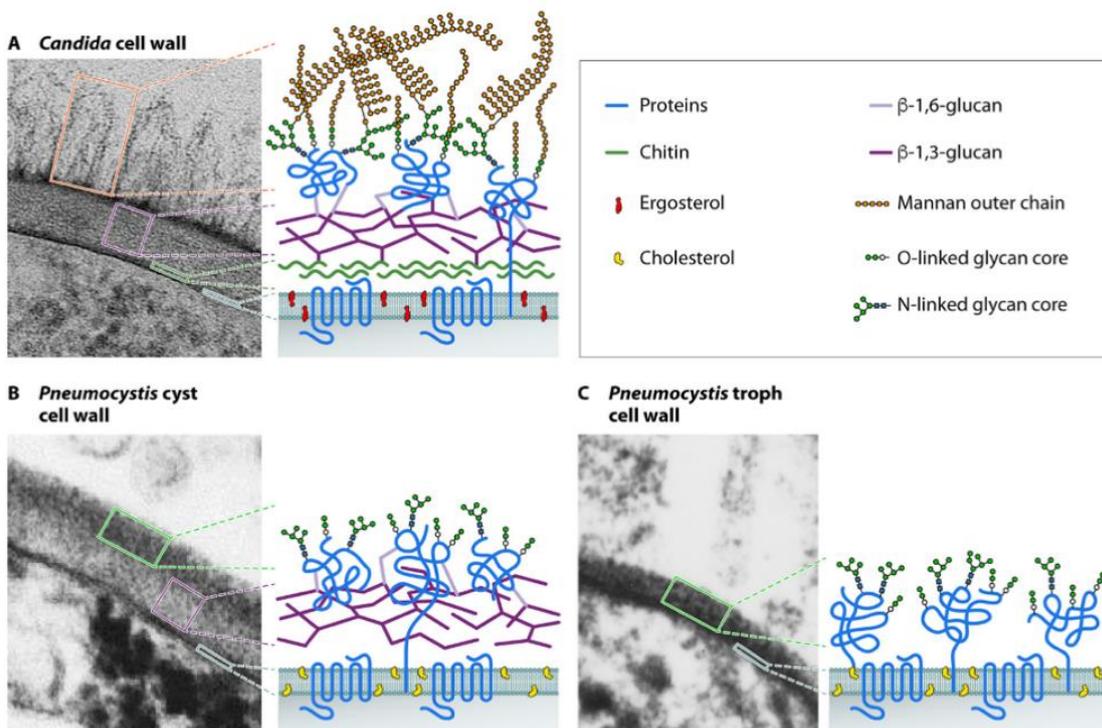
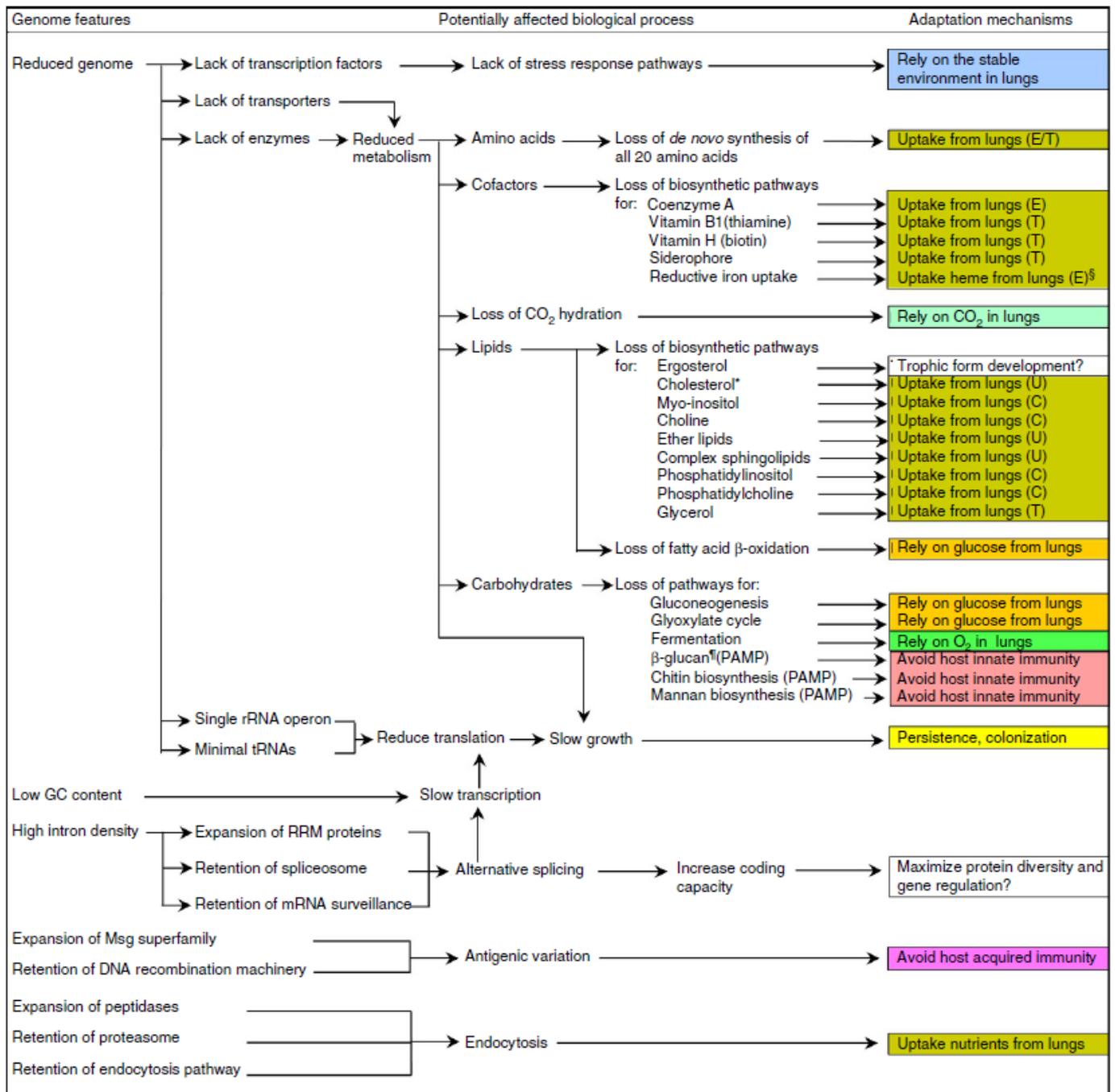


Figura 2. Características del genoma de *Pneumocystis jirovecii* que condicionan su relación parasítica con el ser humano. Figura obtenida de Ma et al (26).



(T) transportadores localizados en la membrana plasmática. (C) conversión de metabolitos recolectados del huésped. (E) endocitosis. (U) desconocido. §Posible recaptación de hemo o hemoglobina desde los pulmones por endocitosis mediada por proteínas que contienen el dominio CFEM. \*Se observa pérdida de la síntesis de colesterol en *P. murina* y *P. carinii* pero se conserva en *P. jirovecii*. ¶ El β-glucano está presente solamente en los quistes. Ausencia de otros patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP).

### 1.2.3. Ciclo vital y transmisión

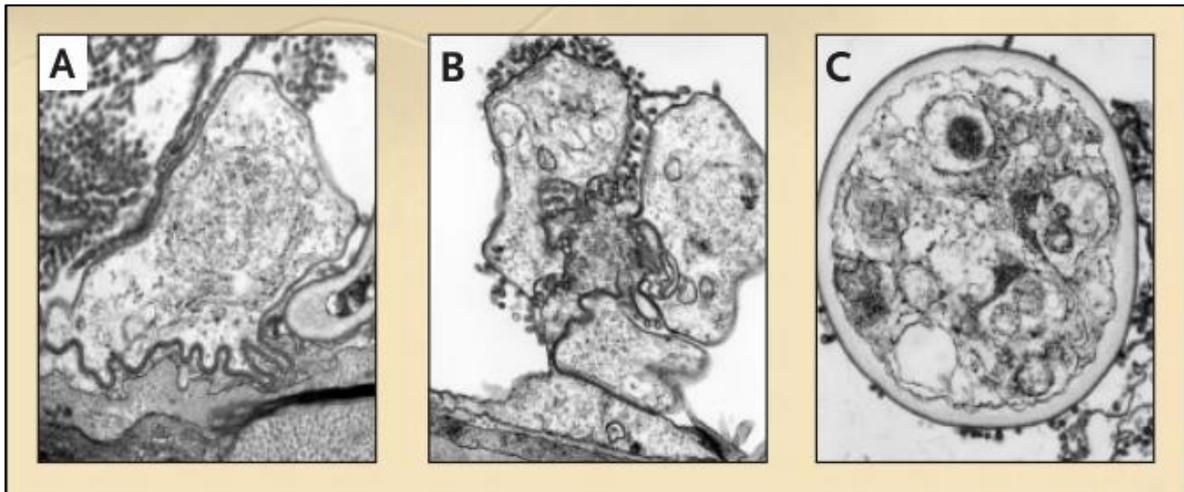
Se desconoce el ciclo vital completo de *Pneumocystis*, principalmente debido a la dificultad de obtener un cultivo axénico *ex vivo* continuo, aunque se ha propuesto un modelo teórico a partir del conocimiento obtenido de la observación microscópica y de la extrapolación del ciclo de vida de otros hongos ascomicetos (27).

Las características genéticas anteriormente descritas sugieren que *Pneumocystis* es un biótrofo obligado que suple sus carencias metabólicas mediante la parasitación de las células del huésped. Se sabe que las distintas especies de *Pneumocystis spp* presentan alto tropismo por el pulmón de los mamíferos, donde residen extracelularmente en los alveolos del hospedador. El hallazgo de células de *Pneumocystis* fuera del tracto respiratorio de sus hospedadores es extremadamente infrecuente (28).

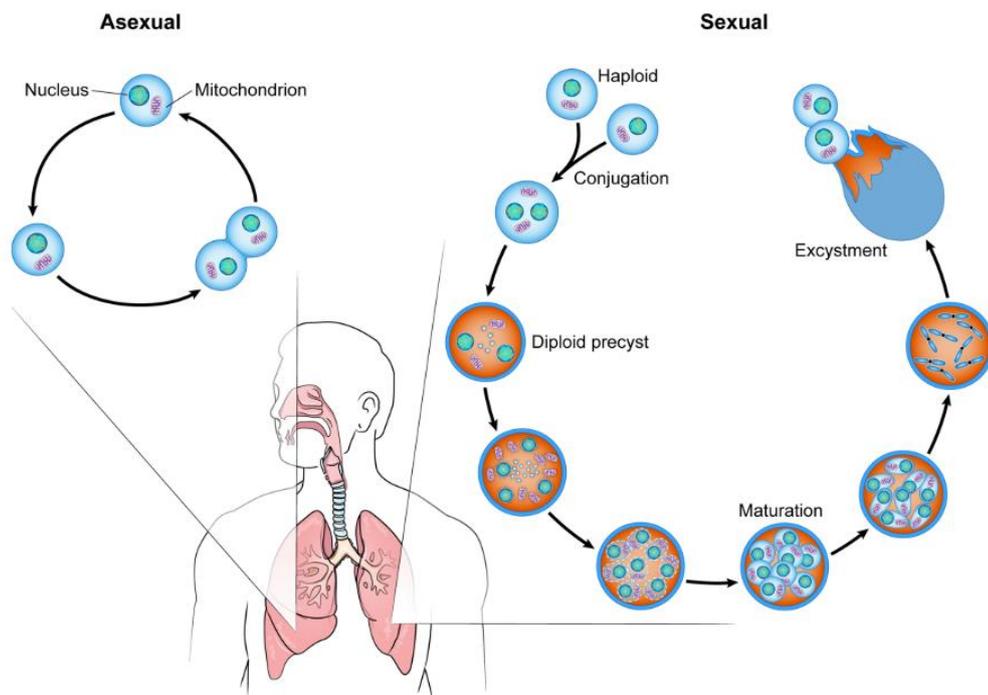
Se han identificado dos formas morfológicas principales del hongo. Al haber sido considerado un protozoo durante 8 décadas, aún se conserva y admite la denominación antigua de las mismas. Éstas son el trofozoito o la forma trófica y el quiste o ascus (saco de esporas) y se hipotetiza que, en un ciclo conjugativo o sexual, a través de formas o estadios intermedios, una forma origina la otra (27,29,30).

La forma trófica es mononuclear, mayoritariamente haploide, pleomórfica, de longitud variable (1 a 8  $\mu\text{m}$ ) y con una fina pared celular (figura 1). Esta forma predomina durante la infección activa, adhiriéndose específicamente a las células epiteliales tipo I de los alveolos (figura 3), tapizando la pared alveolar y rellenando los espacios aéreos (28,30). Se postula que los trofozoitos son capaces de multiplicarse mediante mitosis siguiendo un ciclo asexual durante la infección activa (figura 4). Aunque aún no está claro, se especula que *Pneumocystis* podría ser capaz, además, de reproducirse por homotalismo (31).

**Figura 3.** Imágenes de *Pneumocystis* al microscopio electrónico. **A.** Trofozoito adherido a la pared alveolar. **B.** Agrupación de trofozoitos en el alveolo. **C.** Quiste. Obtenida de Thomas et al (28)



**Figura 4.** Ciclo de vida propuesto para *Pneumocystis jirovecii*. Obtenido de Skalski et al (27).



Se cree que el ciclo sexual da lugar a estadios intermedios que, a medida que van madurando, generan la forma quística (27,29). Los quistes, característicamente, presentan una pared celular gruesa (figura 1) con alto contenido en  $\beta$ -glucano. Los quistes maduros son predominantemente esféricos, de unos 4-8  $\mu\text{m}$  de diámetro, y en su interior albergan típicamente 8 cuerpos intraquísticos, de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, uninucleados y con una sola mitocondria. Una vez el quiste maduro se rompe, libera los cuerpos intraquísticos, que darán lugar a nuevos trofozoitos (figura 4).

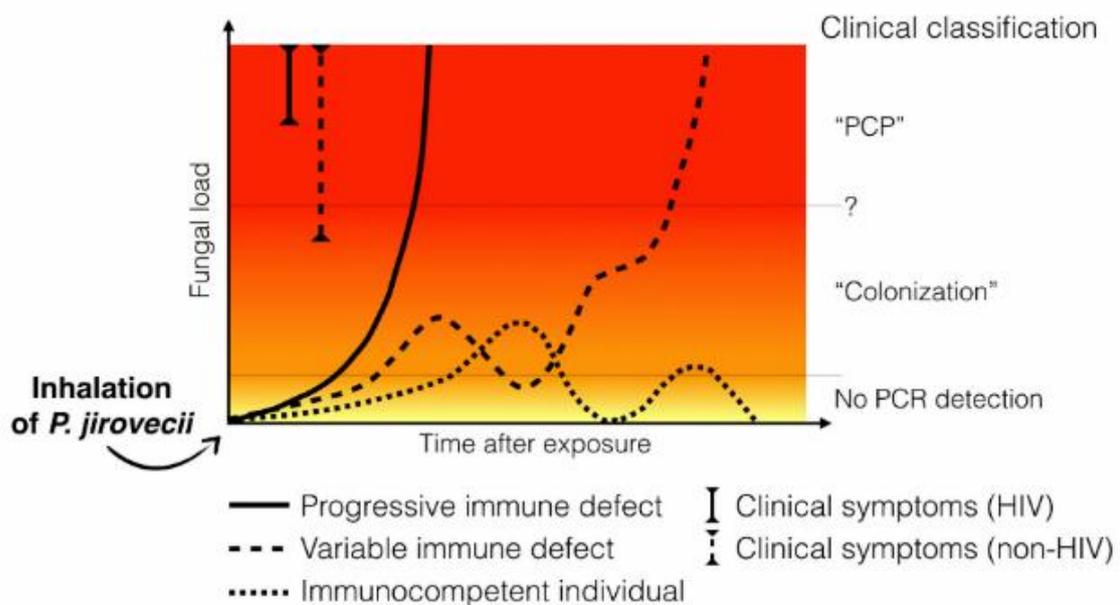
Aunque inicialmente se creyó que la infección por *Pneumocystis* era una zoonosis, los estudios filogenéticos han demostrado que *Pneumocystis* es un género compuesto por diferentes especies y que éstas presentan especificidad en cuanto al hospedador mamífero que son capaces de infectar (32). La especificidad de especie llevó a descartar el reservorio animal como posible fuente de infección humana y a pensar en la existencia de reservorios ambientales como ocurre con otros hongos como *Aspergillus spp*, *Cryptococcus spp*, o *Histoplasma spp*, entre otros. Hasta el momento, sin embargo, no se ha identificado ninguna fuente ambiental para *Pneumocystis spp* (33). Actualmente, las evidencias parecen apuntar a que los humanos sean el principal reservorio de este hongo (34), donde se comporta como huésped obligado, encontrando en sus pulmones los nutrientes, gases, pH, temperatura, presión osmótica y entorno de estrés oxidativo adecuado para su supervivencia (21). Presumiblemente, la forma quística es la que podría mantenerse viable fuera de los pulmones y la que se comportaría como forma infectiva, con un tamaño ideal para poder alcanzar los alveolos de su nuevo hospedador (35,36). La hipótesis de la transmisión por vía aérea entre hospedadores parece estar apoyada por (i) modelos murinos experimentales de transmisión entre individuos (37), (ii) por la presencia de concentraciones de ADN de *P. jirovecii* en el aire tanto más altas cuanto más próxima a un paciente infectado se haga la medición (38) y (iii) por la demostración de que los profesionales sanitarios en contacto con pacientes con neumonía por este hongo

presentan mayor frecuencia de colonización que los profesionales que no lo están (39,40).

### 1.3. Aspectos relacionados con la infección por *P. jirovecii*

La relación entre *Pneumocystis* y su hospedador se extiende por un espectro de situaciones que abarca desde la colonización asintomática a la neumonía grave y con pronóstico mortal. Los factores que condicionan que la balanza se incline hacia uno u otro extremo son complejos y dependen del equilibrio entre la capacidad del hongo para proliferar (la carga fúngica neta) y la capacidad del hospedador para mantener esta proliferación bajo control (la inmunidad celular basada, fundamentalmente, en la respuesta de los linfocitos CD4+).

Figura 5. Evolución de la carga fúngica de *Pneumocystis jirovecii* en función del estatus inmunológico del huésped. Obtenido de Alanio et al (41).



### 1.3.1. Colonización por *Pneumocystis jirovecii*

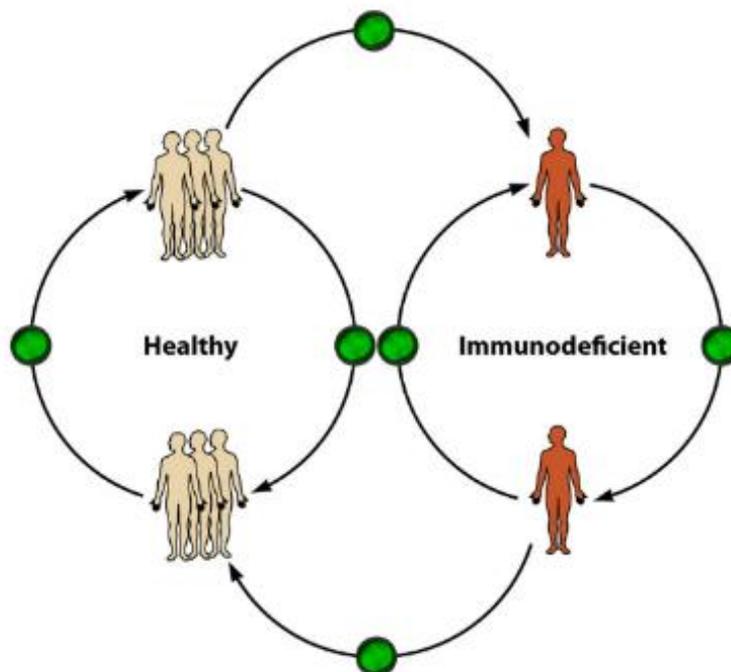
El concepto de colonización o estado de portador asintomático hace referencia a la presencia de *P. jirovecii* en el tracto respiratorio de personas sin que esta presencia se traduzca en un cuadro de patología respiratoria aguda (34,42,43). En este contexto, la carga fúngica es menor que la detectada en casos de neumonía (figura 5).

Se sabe que el contacto con *P. jirovecii* está muy extendido en la población general y que ocurre ya en los primeros años de vida. Así lo demuestran estudios de seroprevalencia en población infantil, que revelan la presencia de anticuerpos frente a *Pneumocystis* en niños de corta edad (44,45). No está claro si el hongo es capaz de persistir de forma latente durante periodos prolongados o si su presencia en el tracto respiratorio es intermitente y atribuible al contacto repetido con reservorios.

*Pneumocystis* puede colonizar tanto a personas inmunocompetentes como a inmunodeprimidas. Aunque se han observado diferencias entre los distintos grupos de población, por lo general la prevalencia de colonización por *P. jirovecii* es mayor en población inmunodeprimida que en la inmunocompetente (41–43). Los niños de corta edad, en especial aquellos con cuadros de infección de vía respiratoria alta, presentan elevadas tasas de colonización (44). Se han reportado prevalencias de hasta el 16% en embarazadas en el tercer trimestre de gestación, en las que probablemente los cambios fisiológicos del sistema inmune que acontecen durante el embarazo favorezcan esta colonización (46,47). Los pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) muestran tasas de colonización elevada (10-55 %) y se postula la hipótesis de que *P. jirovecii* pueda contribuir al desarrollo de algunas enfermedades pulmonares (21,48,49). También se ha observado que las personas fumadoras presentan mayor tendencia a la colonización por *P. jirovecii* que los no fumadores (50). De los pacientes inmunodeprimidos, los infectados por el VIH son el colectivo en el que se evidencia mayor prevalencia de colonización por *Pneumocystis* (20-69 %) (21,34,42,51), mientras que en los inmunodeprimidos por otras causas la colonización es menos frecuente (16-46 %) (50,52–56).

La colonización asintomática por *P. jirovecii* puede tener implicaciones a nivel individual, así como a nivel poblacional. Los portadores asintomáticos parecen jugar un papel clave en la diseminación del hongo entre la población (34,41). Como ya se ha comentado, la aérea es presumiblemente la principal vía de transmisión y el propio ser humano se postula como su principal reservorio (figura 6) (21,34,41). Además, la colonización puede constituir, por sí misma, un factor de riesgo para el desarrollo posterior de neumonía (41–43).

**Figura 6.** Posibles circuitos de transmisión de *P. jirovecii* entre la población. Obtenida de Ma et al (21)



### 1.3.2. Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*

*P. jirovecii* se comporta como patógeno oportunista causando neumonía en pacientes inmunodeprimidos (28,57–59). Clásicamente la neumonía por *P. jirovecii* se asocia a pacientes infectados por el VIH con bajos recuentos de CD4+ (habitualmente < 200/mm<sup>3</sup>); en estos pacientes la neumonía por *Pneumocystis* es una enfermedad definitoria de SIDA y comúnmente incluye una fuerte disociación clínico-radiológica, con una triada de disnea de esfuerzo, tos seca y fiebre baja o febrícula acompañada generalmente de infiltrados intersticiales extensos en la radiografía de tórax. Los síntomas se inician de forma subaguda y se mantienen varios días o incluso semanas (7-21 días), hecho que ayuda a diferenciar la neumonía por *Pneumocystis* de una neumonía bacteriana. En estos pacientes la disnea es progresiva pero puede llegar a insuficiencia respiratoria de manera abrupta (60–62). De forma característica la tomografía axial computarizada (TAC), más sensible que la radiología convencional, suele mostrar un patrón de afectación bilateral con imágenes en vidrio deslustrado. En lo que respecta a los parámetros analíticos, suele haber elevación de los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH), que puede usarse como marcador de pronóstico, mientras que la proteína C reactiva suele ser normal. El curso de la infección puede revestir poca gravedad, alcanzándose una mortalidad de hasta el 15% (60–62).

Además de la infección por VIH, existen otras causas de inmunosupresión que también ponen a los pacientes en riesgo de padecer la infección. La lista de patologías y situaciones que exponen a los pacientes a desarrollar cuadros de neumocistosis incluye trasplantes de órgano sólido (TOS) o de progenitores hematopoyéticos (TPH), neoplasias de órgano sólido (NOS), neoplasias hematológicas, enfermedades autoinmunes (enfermedad inflamatoria intestinal, artritis reumatoide, etc), la recepción de tratamientos prolongados con corticoides sistémicos o la recepción de algunos tratamientos inmunomoduladores y terapias biológicas (60,61,63–66). Comparado con la neumonía del paciente VIH, en este grupo tan heterogéneo, la infección por *Pneumocystis* presenta, por lo general, un inicio de los síntomas más rápido (4-7 días),

con fiebre elevada, disnea y progresión rápida a fallo respiratorio; su pronóstico es habitualmente peor, con requerimiento de ingreso en Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) hasta en el 50% de los casos, y una mortalidad que alcanza el 30-60% (60). Inicialmente la radiografía de tórax puede ser normal. En el TAC puede observarse el patrón bilateral en vidrio deslustrado y, con más frecuencia que en los pacientes VIH, se pueden presentar nódulos y consolidaciones (28,60,61,63–66). De forma característica, la neumonía por *Pneumocystis* del paciente inmunocomprometido VIH negativo cursa con cargas fúngicas más bajas que la del VIH positivo (60,64).

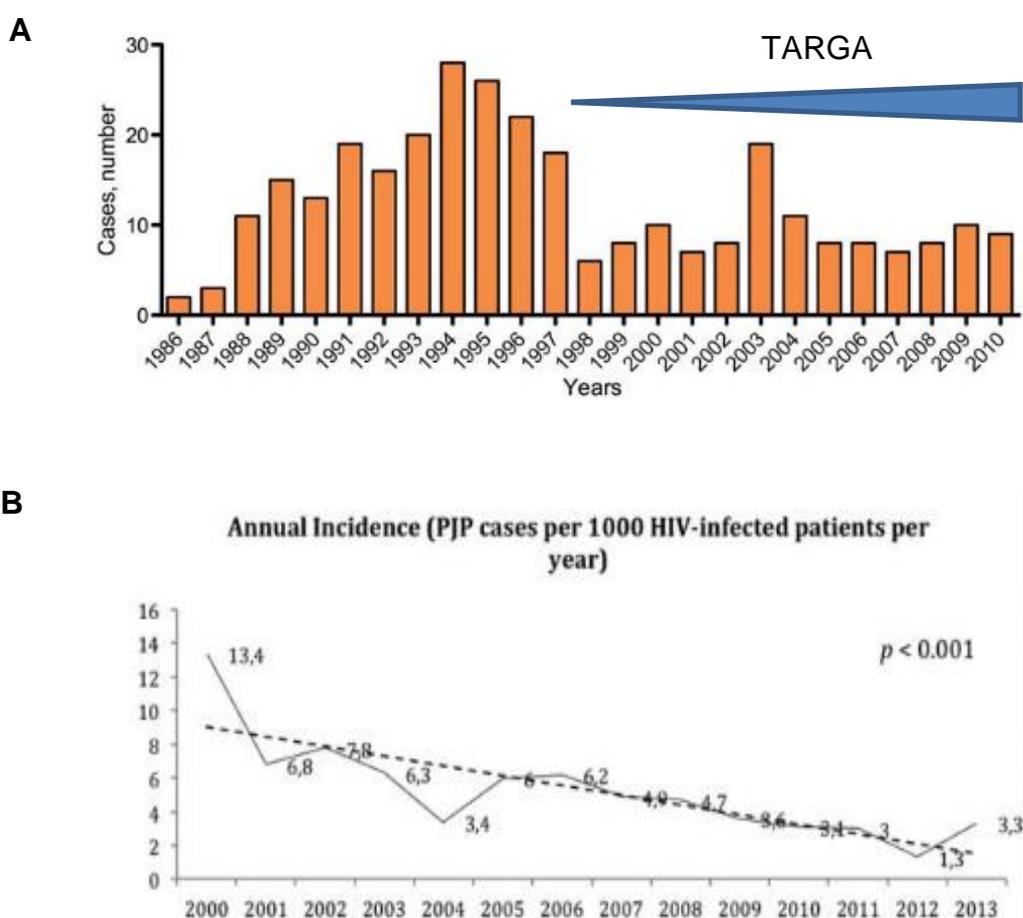
**Tabla 1.** Diferencias entre los parámetros clínicos y diagnósticos de la neumonía por *P. jirovecii* en pacientes VIH y pacientes inmunodeprimidos no VIH. Adaptada de Salzer et al (60) y Cillóniz et al (61).

Características de la neumonía por <i>P. jirovecii</i>	Pacientes VIH/SIDA	Pacientes inmunodeprimidos no VIH
Gravedad y curso de la infección	De inicio y curso subagudo con riesgo de deterioro rápido a pesar de largo tiempo estable	De inicio agudo y de rápida progresión de los síntomas
Duración de los síntomas	Mayor duración: 7-21 días	Menor duración: 4-7 días
Signos y síntomas	Triada clásica: disnea de esfuerzo, tos seca y fiebre baja o febrícula	Fiebre alta, disnea y tos no productiva. La hipoxia/fallo respiratorio es más frecuente
Patrón en la radiografía de tórax	Infiltrados bilaterales e infiltrados alveolares perihiliares	
	Con mayor frecuencia, lesiones cavitadas	Al inicio, la radiografía puede ser normal. Se observan con mayor frecuencia nódulos, consolidaciones y derrame pleural
Patrón en el TAC	Patrón bilateral en vidrio deslustrado	
Requerimiento de ingreso en UCI	10-20% de los pacientes	Hasta el 50 % de los pacientes
Mortalidad	Del 10-15%	Del 30-60%
Carga fúngica	Alta	Baja

### 1.3.3. Epidemiología de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*

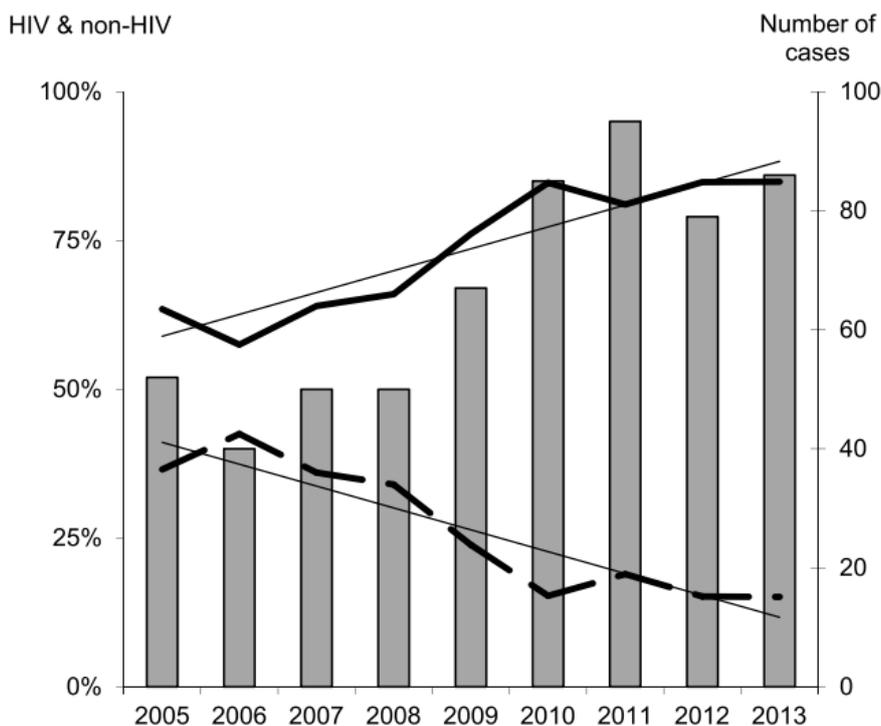
Se estima que a nivel mundial ocurren alrededor de 500.000 episodios de neumonía por *P. jirovecii* anualmente (17). Aunque a nivel global la mayoría de episodios se sigue asociando a la infección por VIH, la incidencia en este grupo de población ha disminuido notablemente en países desarrollados gracias a la combinación de TARGA y profilaxis frente a *Pneumocystis* en pacientes VIH de alto riesgo (54,63,65–68). La incidencia se mantiene elevada en pacientes con infección por VIH no conocida, en aquellos que no tienen acceso a la TARGA y en aquellos que abandonan el tratamiento (17,59,62,67).

**Figura 7. A.** Distribución de casos de neumonía por *P. jirovecii* en población VIH atendida en el Hospital Germans Trias i Pujol (1986-2010). **B.** Casos de neumonía por *P. jirovecii* por 1000 pacientes VIH y año en el Hospital Universitario Vall d'Hebron (2000-2013). Adaptado de Llibre et al (67) y López-Sánchez et al (62).



En los países desarrollados se ha observado un incremento en el número de nuevos casos de neumocistosis a expensas de la creciente población inmunocomprometida VIH negativa (54,63,65,66,68,69). En España se estima que la incidencia de la neumonía por *Pneumocystis* es de 3.4 casos por cada 100.000 habitantes, de los que aproximadamente dos tercios se diagnostican en pacientes inmunocomprometidos sin infección por VIH (70).

**Figura 8.** Distribución anual de casos de neumonía por *P. jirovecii* en un hospital de tercer nivel en Lyon (Francia) (2005-2013). Obtenido de Bienvenu et al (66).



Las columnas representan en número de casos de neumonía por *P. jirovecii* al año. La línea discontinua representa la proporción de pacientes VIH y la línea continua, la proporción de pacientes con causa de inmunosupresión distinta al VIH.

### 1.3.4. Tratamiento

Desde casi 80 años *P. jirovecii* se consideró erróneamente un parásito porque la infección sólo respondía al tratamiento con fármacos antiparasitarios. Aunque hasta los años 70 la pentamidina fue el único fármaco conocido efectivo frente a *Pneumocystis*, ya a mediados de los sesenta empezaron a probarse alternativas terapéuticas como la combinación de pirimetamina con sulfonamidas que obtuvieron resultados prometedores. En 1974, se ensayó la combinación trimetoprim-sulfametoxazol (cotrimoxazol) demostrándose tan efectiva como la pentamidina pero sin sus efectos adversos. Aquellos estudios acabaron llevando a relegar a la pentamidina a un segundo plano y a la adopción de cotrimoxazol como tratamiento y también como principal fármaco en la profilaxis de la neumocistosis, situación que se ha mantenido hasta la actualidad (71). Aunque es un fármaco económico y muy activo, el uso de cotrimoxazol presenta limitaciones derivadas de su toxicidad (especialmente en pacientes pluripatológicos y polimedicados) y de la emergencia de resistencia al componente sulfamida descrita en algunas áreas geográficas y en contextos donde la infección por VIH es muy prevalente (72–74).

Hoy en día el arsenal farmacológico con actividad frente a *Pneumocystis* se ha ampliado con la adición de atovaquona, dapsona con o sin trimetoprim, la combinación de primaquina con clindamicina, e incluso equinocandinas como la caspofungina. En la tabla 2 se resumen los regímenes de tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis*. En general, para la infección leve-moderada se prefiere la vía oral (v.o.); en los casos de neumonía moderada-grave es preferible la vía intravenosa (i.v.), con posibilidad de cambiar a la v.o. cuando se observe mejoría clínica. Independientemente de la vía de administración, se recomienda que la duración del tratamiento sea de 21 días (60,61,75).

**Tabla 2.** Regímenes de tratamiento recomendados para la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. Adaptada de Salzer et al (60) y Cillóniz et al (61).

Fármaco	Vía de admin.	Posología	Comentario
<b>De elección</b>			
Cotrimoxazol	i.v. / v.o.	15-20 + 75-100 mg/kg/día dividido en 3-4 tomas	En infecciones graves, iniciar i.v. y pasar a v.o. después de observar mejoría clínica.
<b>Alternativas</b>			
Pentamidina	i.v.	4 mg/kg/día una vez al día (administrado en, al menos, 60 min)	Se puede reducir a 3 mg/kg/día si efectos adversos
Atovaquona	v.o.	750 mg dos veces al día	Administrar con las comidas
Primaquina + Clindamicina	v.o. + i.v. / v.o.	30 mg/día + 600 mg/6h ó 900 mg/8h (i.v.) ó 450 mg/6h ó 600 mg/8h (v.o.)	Descartar déficit de glucosa 6P deshidrogenasa previo al tratamiento con primaquina
Dapsona + Trimetoprim	v.o.	100 mg/día + 5 mg/kg/día en 3 tomas	Descartar déficit de glucosa 6P deshidrogenasa previo al tratamiento con dapsona
Caspofungina	i.v.	70 mg primer día y 50 mg a partir del segundo día	Tratamiento de rescate (segunda línea). En combinación con cotrimoxazol

En los pacientes VIH positivos la administración concomitante de corticoides intravenosos está indicada en casos de neumonía moderada-grave si presentan hipoxemia ( $PaO_2 < 70$  mm Hg en aire ambiente o un gradiente alveolo-arterial de oxígeno  $> 35$  mm Hg). El uso de corticoides tiene como objetivo reducir la respuesta inflamatoria que puede ocurrir después de iniciar el tratamiento, que genera daños, sobre todo, a nivel pulmonar. En estos casos, los corticosteroides se deben administrar lo antes posible, dentro de las primeras 72 horas tras el inicio del tratamiento antimicrobiano. La pauta recomendada consiste en prednisona 40 mg/12 h los primeros 5 días, con reducción progresiva a 40 mg/24 h los días 6-10 y, posteriormente, a 20 mg/24 h hasta el día 21 (60,61). La administración de corticoides sistémicos no está indicada en los casos leves-moderados. En los pacientes inmunodeprimidos no VIH no existe un consenso sobre la indicación de terapia

corticoidea, por lo que se debe valorar el beneficio que ésta pueda aportar en cada paciente (61).

### **1.3.5. Profilaxis**

La indicación de profilaxis frente a *Pneumocystis* está claramente establecida en los pacientes VIH positivos. Se debe iniciar la profilaxis primaria en aquellos con un recuento de CD4+ <200/mm<sup>3</sup>, una proporción de CD4+ <14%, en caso de muguet oral o cuando existe una causa relevante de inmunosupresión concomitantemente. La profilaxis primaria se debe suspender si se alcanzan recuentos de CD4+ >200 células/mm<sup>3</sup> durante 3 meses, o si el recuento de CD4+ se mantiene entre 100-200 células/mm<sup>3</sup> con cargas virales indetectables durante 3 meses. En el caso de profilaxis secundaria, ésta debe finalizarse si los niveles de CD4+ >200/mm<sup>3</sup> y la carga viral es indetectable durante 3 meses (60,61).

En los pacientes inmunocomprometidos no infectados por el VIH, por el contrario, no existen unas indicaciones tan claras y generalizadas (60,61); en estos pacientes, además, los niveles de CD4+ no parecen ser un buen discriminador (76). Recientemente se han publicado recomendaciones sobre el uso de cotrimoxazol como profilaxis que quedan restringidas a grupos concretos de pacientes. En pacientes oncohematológicos (77,78) la profilaxis sólo estaría indicada en (i) receptores de TPH autólogo o alogénico, durante los 6 meses post trasplante y mientras se mantenga la inmunosupresión; (ii) en aquellos con tratamientos superiores a un mes con dosis equivalente  $\geq 20$  mg/día de prednisona, o que reciban tratamiento con alentuzumab, temozolamida o análogos de purinas (fludarabina) y rituximab (79); (iii) en los pacientes con leucemia linfocítica aguda, desde la inducción al mantenimiento y, (iv) en todos aquellos tratados de un episodio previo de neumonía por *P. jirovecii*. En el caso de los pacientes receptores de trasplante de órgano sólido se recomienda la instauración de profilaxis al menos durante los 6-12 meses post trasplante, y se debe considerar mayor duración, incluso de por vida, en trasplante de pulmón, intestino

delgado o si hay enfermedad por CMV (80). La profilaxis anti-*Pneumocystis* también se recomienda en pacientes con vasculitis asociada a anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) que reciben ciclofosfamida (81). Adicionalmente, se aconseja valorar el uso de profilaxis en pacientes inmunodeprimidos en los que se combinan factores de riesgo como comorbilidades pulmonares y la administración de dosis altas y prolongadas de corticoides en pacientes añosos, o pacientes que reciben otros inmunosupresores (por ejemplo anti-TNF $\alpha$  en enfermedades inflamatorias) o pacientes con inmunodeficiencias idiopáticas (60,82–84).

Los fármacos empleados tanto en profilaxis primaria y como secundaria son los mismos que se utilizan en el tratamiento de la neumonía. Así, el cotrimoxazol oral es el de elección también en profilaxis, con una de las siguientes posologías: 160/800 mg tres veces por semana en profilaxis primaria y 80/400 mg/día o 160/800 mg/día en profilaxis secundaria en el caso de pacientes VIH positivos (85). En pacientes hematológicos adultos no hay evidencia de ventaja en el uso de las formulaciones 80/400 o 160/400 una vez al día o tres veces por semana, mientras que en el caso de pacientes pediátricos, la dosis de cotrimoxazol se debe ajustar a 150/750 mg/m<sup>2</sup>/día 1 o 2 dosis/día o usar la misma dosis 2 o 3 días/semana (evidencia AI) (77). Como alternativas, se puede usar dapsona 100 mg/día v.o., atovaquona 1500 mg/día v.o., o pentamidina aerosolizada (300 mg en 6 mL), una o dos veces al mes. Tanto a la dapsona como a la atovaquona se les puede asociar pirimetamina (50-75 mg) y ácido folínico (25-30 mg) semanales (60,61).

**Tabla 3.** Indicación de profilaxis para la infección por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes VIH positivos y VIH negativos. Adaptada de la guía de prevención y tratamiento de infecciones oportunistas y otras coinfecciones del grupo GESIDA (85), de Maertens et al (77) y de Salzer et al (60).

Indicación	Suspender/Reiniciar	Primera elección	Segunda elección
<b>Pacientes con infección por VIH</b>		Cotrimoxazol 400/80 mg al día o bien 800/160 tres veces por semana vía oral	Pentamidina inhalada 300 mg 1-2 veces al mes
<p>Linfocitos CD4+ &lt; 200 cél/μl (AI) o &lt; 14%.</p> <p>Candidiasis orofaríngea previa.</p> <p>Enfermedad definitoria de sida previa o si no se pueden asegurar visitas cada 3 meses.</p>	<p>Suprimir profilaxis tras ≥ 6 meses de terapia antirretroviral eficaz, si CD4+ &gt;200/mm<sup>3</sup> y la carga viral es indetectable durante 3 meses.</p> <p>Reiniciar si CD4+ &lt; 100-200/mm<sup>3</sup></p>		
<b>Pacientes sin infección por VIH</b>			
<p><b><u>Pacientes oncohematológicos</u></b></p> <p>Receptores de TPH autólogo o alogénico, durante los 6 meses post trasplante y mientras se mantenga la inmunosupresión.</p> <p>Tratamiento por más de un mes de prednisona ≥ 20 mg/día o equivalente.</p> <p>Aquellos que reciban tratamiento con alentuzumab, temozolamida o análogos de purinas (fludarabina) y rituximab.</p> <p>Pacientes con leucemia linfocítica aguda, desde la inducción hasta el mantenimiento.</p> <p>Episodio previo de neumonía por <i>P. jirovecii</i></p>	<p>No existe una recomendación general para suprimir la profilaxis, la decisión debe ser tomada de forma individual</p>		
<b><u>Pacientes receptores de trasplante de órgano sólido</u></b>			
<p>Durante los 6-12 meses post trasplante</p> <p>Considerar mayor duración, incluso de por vida, en trasplante de pulmón, intestino delgado o si hay enfermedad por CMV</p>			
<b><u>Otros</u></b>			
<p>Pacientes con vasculitis asociada a ANCA que reciben ciclofosfamida</p> <p>Valorar el uso de profilaxis en pacientes inmunodeprimidos en los que se combinan factores de riesgo como la administración de dosis altas y prolongadas de corticoides en pacientes añosos con comorbilidades pulmonares o neoplasias sólidas, pacientes que reciben otros inmunosupresores (por ejemplo anti-TNFα en enfermedades inflamatorias) o pacientes con inmunodeficiencias idiopáticas</p>			

### **1.3.6. Diagnóstico microbiológico de la neumonía por *P. jirovecii***

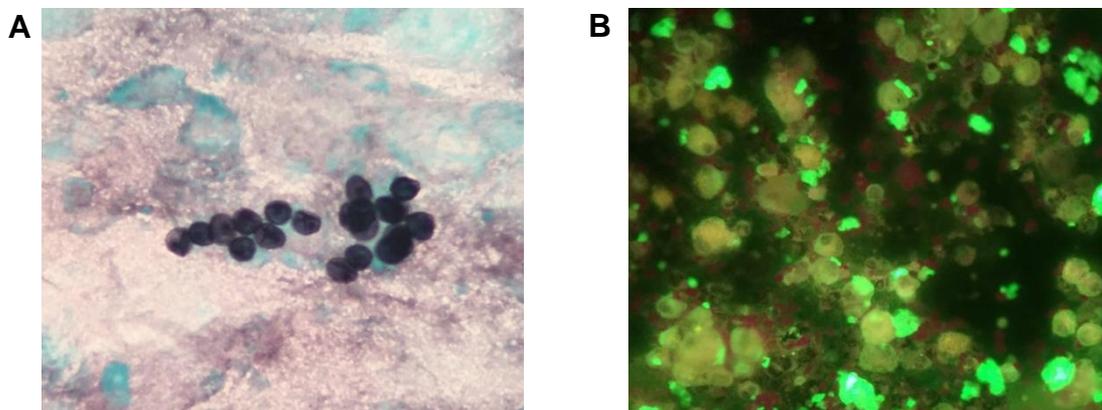
Las características excepcionales de *Pneumocystis* hacen que, hasta la fecha, no se haya descubierto un método de cultivo *in vitro* eficiente, por lo que el diagnóstico microbiológico de la neumonía por *Pneumocystis* se basa en la demostración de la presencia del hongo en una muestra procedente del tracto respiratorio inferior (TRI), generalmente un lavado broncoalveolar (LBA), o un esputo inducido; es excepcional que se recurra a la obtención de biopsias pulmonares para el diagnóstico de esta entidad (28,86,87). En el momento del diagnóstico, no obstante, no es infrecuente que los pacientes se encuentren en una situación de insuficiencia respiratoria y fragilidad que impide la realización inmediata de una fibrobroncoscopia o la inducción del esputo. Esta situación es más frecuente en pacientes inmunocomprometidos VIH negativos, en los que la insuficiencia respiratoria, además obliga a realizar un diagnóstico diferencial con otras entidades que se manifiestan clínica y radiológicamente de forma similar (toxicidad farmacológica, hemorragia pulmonar o infección por CMV entre otros) y en los que la instauración empírica de tratamiento con cotrimoxazol puede sobreañadir toxicidad. A pesar de que en estas circunstancias el diagnóstico microbiológico rápido es crucial para orientar el manejo terapéutico dirigido, es habitual que la obtención de las muestras se retrase hasta que el paciente esté en condiciones de ser sometido a una exploración broncoscópica y no es infrecuente, incluso, que estos episodios, queden sin poder ser documentados microbiológicamente (60)-

#### **1.3.6.1. Técnicas basadas en la microscopía**

Los métodos clásicos de diagnóstico se basan en la observación al microscopio de los trofozoitos y/o quistes en muestras del TRI tras tinción con colorantes convencionales o con anticuerpos monoclonales específicos marcados con agentes fluorescentes (86). No todas las técnicas tintoriales tienen capacidad para teñir las dos formas morfológicas del hongo, por lo que es importante conocer sus características. Así,

mientras que las tinciones de Papanicolau, Gram-Weigert, Wright-Giemsa o Diff-Quick tiñen preferentemente los trofozoitos, otras tiñen específicamente los quistes, como la de plata metenamina de Gomori-Grocott, el violeta crisol, el azul de toluidina O o el blanco de calcoflúor. Las tinciones basadas en inmunofluorescencia directa (IFD) son las más sensibles y específicas aunque, de nuevo, no todos los kits comerciales permiten la observación de trofozoitos y quistes (86).

**Figura 9.** Imágenes al microscopio de *Pneumocystis jirovecii* en muestra de lavado broncoalveolar.



A. Tinción de plata metenamina o Gomori-Grocott. B tinción de inmunofluorescencia directa.

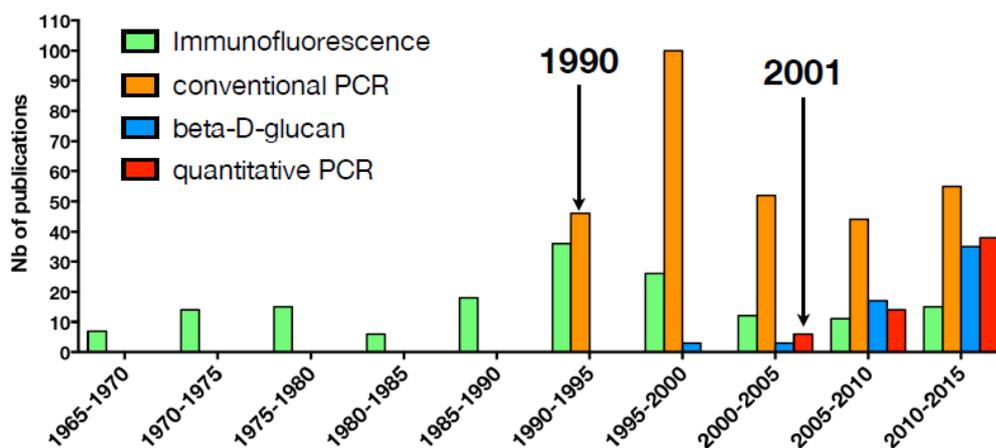
El principal inconveniente de las técnicas basadas en la microscopía es su limitada sensibilidad, así como la necesidad de ser realizadas por personal debidamente entrenado y con experiencia. El rendimiento de la microscopía es inferior en casos de neumonía en pacientes VIH negativos y resulta prácticamente nula para detección de colonizaciones (88), situaciones que, de forma característica, cursan con cargas fúngicas inferiores a las presentes en la neumonía de los pacientes VIH positivos (89). Ello hace que se haya cuestionado el papel del examen microscópico como técnica patrón universal en el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis* (60,86,90).

### 1.3.6.2. Técnicas de biología molecular

Desde su descripción a principios de la década de los 90 (91,92), las técnicas de Biología Molecular han ido ganando protagonismo en el diagnóstico de la neumocistosis (90,93) (figura 10). En comparación con la microscopía, las técnicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ofrecen una mayor sensibilidad y se han mostrado como esenciales para la detección de cargas fúngicas reducidas, lo que ha permitido poner de manifiesto, por ejemplo, el estado de portador asintomático (34,41,42,54,94).

Las primeras técnicas utilizadas fueron las de PCR convencional o tiempo final, así como técnicas de PCR anidada, que ofrecen resultados cualitativos. La introducción de las técnicas de PCR en tiempo real en la primera década del siglo XXI, permitió, además, cuantificar la carga fúngica en la muestra, fundamental para interpretar los resultados obtenidos.

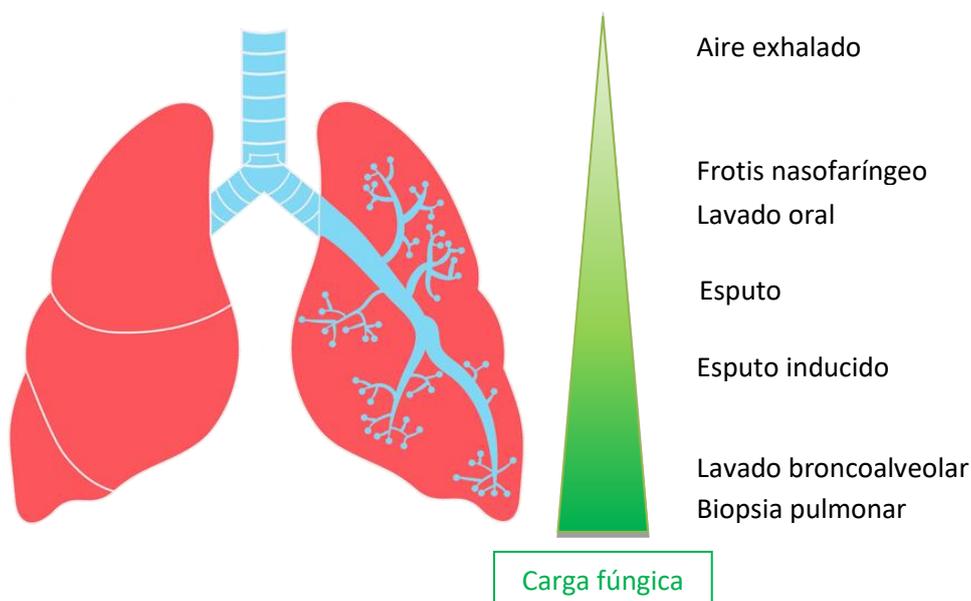
**Figura 10.** Estimación del número de publicaciones relacionadas con las diferentes técnicas de laboratorio aplicables al diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. Obtenido de la presentación “New diagnostic tools for *P. jirovecii*” del Dr Alexander Alanio en el 7th TIMM (2015).



Entre las ventajas que aportan las técnicas de PCR a tiempo real está su elevada sensibilidad. En el caso de *P. jirovecii*, serían aplicables a la detección del hongo incluso en muestras de tracto respiratorio superior, que se pueden obtener de forma

sencilla y no invasiva, y en las que *Pneumocystis*, de estar presente, se encuentra en concentraciones más bajas que en TRI (figura 11) (95). La utilidad diagnóstica de la PCR a tiempo real en este tipo de muestras, sin embargo, ha sido muy poco estudiada.

**Figura 11.** Carga fúngica esperada en función del tipo de muestra utilizado para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*.

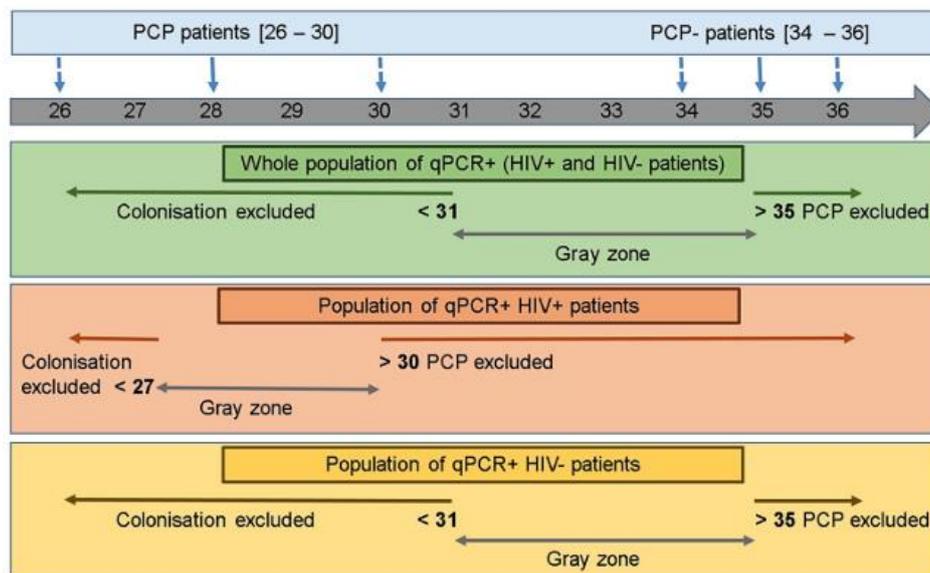


Pese a mejorar notablemente la sensibilidad del diagnóstico de laboratorio, el uso de las técnicas de PCR a tiempo real no está exento de inconvenientes. Además de ser más caro que la microscopía y requerir instalaciones específicas (86), uno de los principales escollos que afronta la generalización del diagnóstico molecular de la neumonía por *P. jirovecii* es la inexistencia de una técnica estandarizada y universalmente aceptada (96–101).

Se han descrito multitud de dianas genéticas para uso con fines diagnósticos. Una de las más ampliamente utilizadas es la basada en la detección del gen mtLSU rRNA (98,102–105). Otros genes empleados como diana son el de la glicoproteína mayor de superficie (MSG) (98,106,107), la dihidropterato sintasa (DHPS) (96,108,109), la proteína de shock térmico de 70 kDa (Hsp70) (110), la subunidad pequeña del ARN

ribosomal (mtSSU rRNA) (97) o la  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -TUB) (104,111). Mientras que habitualmente sólo hay una copia por genoma de los genes nucleares, los genes mitocondriales pueden presentar varias copias y su número puede variar en función del estatus metabólico del hongo (112). Esta variabilidad es un factor bien conocido que afecta tanto a la cuantificación de la carga fúngica como al rendimiento de la PCR, lo que, junto al distinto grado de susceptibilidad del huésped, dificulta el establecimiento de puntos de corte que ayuden a discriminar los estatus de colonización e infección (figura 12) (103): el desarrollo de la infección está modulado por la capacidad de respuesta inmune del huésped (86,87,98,105,108,113–117), por lo que los rangos intermedios de carga fúngica se pueden asociar tanto a estados de infección activa como de portador (95,103).

**Figura 12.** Representación gráfica de la relación entre los valores de Ct y el diagnóstico de neumonía por *P. jiroveci* en función del tipo de paciente. Obtenido de Fauchier et al (103).



El recuadro azul se muestra los valores medios de Ct (IC 95%) para pacientes colonizados e infectados. Los recuadros verde, naranja y amarillo muestran los valores de Ct utilizados para excluir el diagnóstico de neumonía y colonización con un 80% sensibilidad y un 80% especificidad.

### 1.3.6.3. Otras herramientas diagnósticas: marcadores serológicos

En las últimas décadas se han incorporado biomarcadores serológicos complementarios para el diagnóstico de la neumocistosis. El más utilizado es el  $\beta$ -D-glucano, detectable en muestras de suero o plasma. Presenta una elevada sensibilidad, pero una especificidad limitada para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis*, ya que este antígeno también está presente en la pared de otros hongos causantes de patología invasora en humanos como *Candida spp.* y *Aspergillus spp.* (90,118,119). Su mayor utilidad, no obstante, reside en su elevado valor predictivo negativo. Como marcador complementario que no puede utilizarse aisladamente, y es mandatorio confirmar siempre el diagnóstico mediante las técnicas mencionadas anteriormente en muestras respiratorias (90,119).

Algunos autores han demostrado que el diagnóstico serológico, basado en la detección de IgM frente a *Pneumocystis*, puede ser otra herramienta para el diagnóstico de la infección (120). Otros marcadores potencialmente útiles pero no específicos de infección por *Pneumocystis* incluyen: (i) los niveles de LDH en suero, que suelen estar elevados en los pacientes con neumonía por *Pneumocystis* probablemente debido a la inflamación y daño pulmonar (86,118,121); (ii) el antígeno de Krebs von den Lungen-6 (KL-6), una glicoproteína de membrana que expresan los neumocitos de tipo II cuyos niveles, usualmente, se encuentran elevados en el suero de pacientes con neumonía intersticial, incluida la causada por *Pneumocystis*, y que además se comporta como marcador de daño pulmonar (86,118,121); (iii) S-adenosil metionina (SAM), un compuesto intermedio de múltiples funciones celulares que *Pneumocystis* no puede sintetizar por sí mismo y que necesita adquirir a partir del hospedador, por lo que los niveles de SAM en el suero de pacientes con neumocistosis suelen ser inferiores a lo normal (86,118,121).

### **1.3.7. Técnicas moleculares aplicadas al estudio de la epidemiología de *Pneumocystis jirovecii***

Las técnicas basadas en la detección de ácidos nucleicos representan una herramienta esencial para la generación de respuestas referentes al comportamiento y distribución de *P. jirovecii* (21,41), así como para el estudio de la posible asociación entre cepas y poblaciones de hospedadores particularmente susceptibles, la gravedad de la infección que producen o la capacidad para producir brotes, entre otros (21,122–124) .

Se han empleado diferentes métodos moleculares para genotipar este hongo. Difieren en cuanto a aspectos técnicos, capacidad discriminatoria, capacidad de detección de mezclas de genotipos y dianas genéticas utilizadas, y su aplicabilidad varía en lo referente a coste y disponibilidad de la tecnología necesaria. El principal factor limitante para su uso, no obstante, reside en la carencia de un sistema de propagación *in vitro* de este microorganismo que garantice la disponibilidad permanente de cantidades suficientes de material genético. El tipado molecular de *P. jirovecii*, por tanto, debe realizarse directamente sobre muestras clínicas, finitas por naturaleza, y su rendimiento se ve seriamente afectado por la cantidad de hongo presente en las mismas.

#### **1.3.7.1. Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)**

El análisis que detecta variaciones conformacionales en una sola hebra generados por polimorfismos en un único nucleótido se basa en la modificación que dichos cambios provocan en la movilidad de monocadenas de ADN cuando se realiza una electroforesis en condiciones no desnaturizantes. El primer paso consiste en una amplificación mediante PCR, de fragmentos de 100 a 500 pb, seguido de electroforesis en gel de poliacrilamida. En el genotipado mediante SSCP de

*Pneumocystis*, se han utilizado diferentes genes como diana, incluyendo la región *internal transcribed spacer 1* (ITS1), mtLSU rRNA,  $\beta$ -TUB y DHPS (125–128).

Aunque tedioso, se trata de un método relativamente poco complejo, económico y accesible que consigue la detección de hasta el 10% de mezclas de genotipos. Sus principales inconvenientes radican en su limitada capacidad para la detección de mutaciones, la calidad de la migración del ADN y el gran esfuerzo necesario para su puesta a punto ya que cada patrón necesita de validación mediante clonación y secuenciación. La aparición de técnicas más eficaces ha hecho que, actualmente, haya caído en desuso (21,122).

#### **1.3.7.2. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis (RFLP)**

El análisis de fragmentos mediante enzimas de restricción se basa en la amplificación mediante PCR de un gen o región concreta de ADN y la posterior digestión del producto de amplificación mediante enzimas de restricción; seguidamente analiza el tamaño de los fragmentos mediante electroforesis en gel, observándose distintos patrones de bandas en función de las variaciones o polimorfismos en la secuencia del gen estudiado. Durante la década de los 80 y principios de los 90 fue un método de tipado ampliamente utilizado para multitud de microorganismos.

El análisis mediante RFLP no requiere equipos costosos y la técnica se puede realizar en un tiempo relativamente corto. Sus principales desventajas son la dependencia de la existencia de sitios de restricción de la secuencia de ADN concreta y la dificultad en la interpretación de patrones de bandas con diferencias mínimas.

En *P. jirovecii* se utilizó para el estudio de mutaciones en el gen DHPS, de especial interés ya que, algunas de ellas se asocian a resistencia al cotrimoxazol (129–133). También se aplicó para el estudio de polimorfismos en la familia de genes de MSG (*msg*-RFLP) (134,135). Mediante amplificación de fragmentos de hasta 1300 pb de MSG y posterior digestión, se obtiene una amplia variedad de patrones electroforéticos. Los primeros estudios de *msg*-RFLP permitieron demostrar

diferencias en los patrones obtenidos de diferentes pacientes con SIDA y neumonía por *Pneumocystis* así como la conservación en el tiempo de dichos patrones en muestras consecutivas del mismo paciente obtenidas con menos de 3 meses de diferencia (135).

### **1.3.7.3. Short Tandem Repeat (STR) o microsatélites**

En eucariotas, los microsatélites o secuencias de ADN cortas de repetición en tándem se encuentran en numerosos loci y se caracterizan por su alta proporción de mutaciones, entre 10 y 100.000 veces más frecuentes que en las regiones no repetitivas (122). El tipado mediante microsatélites se basa en la amplificación de la región STR específica y su posterior cuantificación, usualmente mediante electroforesis capilar. Se trata de un método fácil, rápido y económico, sin necesidad de secuenciación de ADN.

En *Pneumocystis*, la primera aproximación con este método se realizó en el intrón de la secuencia previa conservada o *upstream conserved sequence* (UCS,) del gen MSG (136). Este locus presenta un motivo repetitivo de 10 pb y una gran variedad de secuencias de acuerdo al número de repeticiones de dicho motivo (137). En 2014, Parobek y colaboradores publicaron el primer estudio en que describían el tipado de *P. jirovecii* basado en ocho marcadores STR, alcanzando un excelente poder discriminatorio (índice de Hunter de 0.999) (138). Un año más tarde, se propuso otro esquema basado en seis STR, también con excelentes resultados (índice de Hunter de 0.992) (139), que fue aplicado al estudio de poblaciones de *Pneumocystis* procedentes de varios centros hospitalarios europeos (140). Dichos estudios demostraron, además, una alta capacidad de detección de genotipos mixtos, hasta el 70%. La principal limitación del uso de microsatélites para el tipado de *P. jirovecii* es que la técnica no está estandarizada y no están definidos qué STR deben utilizarse, por lo que no es posible comparar resultados entre diferentes estudios y solamente está optimizada para muestras con cargas fúngicas elevadas (141).

#### **1.3.7.4. Single-Base Extension Methods (SBE)**

El método de extensión de base única se utiliza para la detección de polimorfismos de nucleótido único (SNP) conocidos. Requiere una amplificación previa mediante PCR y una posterior hibridación con un cebador complementario a la secuencia que contiene dicho SNP, con extensión de la cadena en presencia de didesoxinucleótidos (ddNTPs) terminadores. La detección posterior puede realizarse mediante marcaje fluorescente, isótopos o electroforesis capilar.

Este método fue utilizado por Esteves y colaboradores en 2011 usando las dianas DHFR, mtLSU rRNA y superóxido dismutasa (SOD) para la investigación de los SNPs dhfr312, mt85, sod110 y sod125, hallando una concordancia con la secuenciación directa del 94% (142,143). Alanio y colaboradores también lo utilizaron para el loci mtLSU rRNA analizando tres alelos de mt85 (144).

Aunque el tipado mediante SBE permite prescindir de la secuenciación, se limita a la detección de SNP conocidos y, comparado con la secuenciación Sanger, resulta ser un método más caro (122).

#### **1.3.7.5. Secuenciación directa de ADN**

La secuenciación Sanger continúa siendo el método de tipado de *P. jirovecii* más extensamente utilizado ya que se trata de una técnica relativamente accesible. A diferencia de otros métodos de tipado, la secuenciación permite detectar tanto SNP previamente descritos como otros potencialmente nuevos en los loci estudiados (21,122), también denominados secuenciotipos (ST). La principal desventaja de la secuenciación Sanger es que presenta rendimiento limitado para la detección y diferenciación de secuencias mixtas dentro de un mismo amplicón, ya que no puede detectar alelos minoritarios por debajo del umbral del 20-30%.

### 1.3.7.5.1. Secuenciación de un único locus

El estudio de polimorfismos en locus únicos mediante secuenciación ha sido ampliamente utilizado en estudios de genotipado de *P. jirovecii* con resultado desigual. El significado y repercusión de los SNP en la actividad celular depende de su posición en el genoma. Cuando el SNP se localiza en regiones codificantes, puede tener impacto a nivel fenotípico, alterando la función de un gen o la estructura de la proteína codificada. En cambio, cuando se trata de regiones no codificantes, se pueden producir alteraciones en la estabilidad del ADN (145).

ITS1 e ITS2 son las regiones más polimórficas del genoma de *P. jirovecii*, identificándose hasta 120 genotipos distintos (127,146–151); su gran variabilidad se debe a la presencia de repeticiones poli-A y poli-T de longitudes variables en los extremos. Las regiones poli-A y poli-T dificultan la alineación de secuencias, limitando la precisión con la que la secuenciación puede identificar los polimorfismos verdaderos, ya que las variantes pueden ser ocasionadas por deslizamientos durante la replicación del ADN *in vivo* o bien a errores o recombinaciones generadas durante la PCR (21,122,152). El locus mtLSU rRNA también ha sido frecuentemente utilizado (136,144,153–159). Presenta un menor grado de polimorfismo, por lo que su capacidad discriminatoria es inferior, habiéndose descrito 25 genotipos. DHPS es otro de los loci más estudiados (133,155,160–166); presenta muy bajo polimorfismo por lo que su uso para el genotipado es limitado. No obstante, la detección de SNP en los codones 55 y 57 de DHPS es de gran relevancia ya que se han relacionado con resistencia al cotrimoxazol (161,162). Otros loci estudiados con propósitos de genotipado son el intrón de la subunidad 26S del operón del RNA ribosomal nuclear (26S) (127,134,153,167,168), y fragmentos de los genes que codifica para la  $\beta$ -tubulina ( $\beta$ -TUB) (168,169), mtSSU rRNA (154,170), la citocromo oxidasa B (CYB) (145,156,171,172), la timidilato sintasa (TS) (156,173), la superóxido dismutasa (SOD) (156,171,174–176), la dihidrofolato reductasa (DHFR) (166,172,177), la kexina (kex1) (178) y el producto multifuncional arom (179).

#### **1.3.7.5.2. Multilocus Sequence Typing (MLST)**

La estrategia *Multilocus Sequence Typing* (MLST) consiste en la secuenciación de varios loci; la combinación de sus secuencias permite generar perfiles alélicos únicos denominados genotipos multilocus (MLG). Esta estrategia permite incrementar notablemente el poder discriminativo del tipado ya que la diversidad obtenida es sustancialmente superior respecto a la de un único locus.

A pesar de ser la técnica con mayor potencial, aplicación y rendimiento, presenta las ya descritas limitaciones propias de la secuenciación Sanger. Además, la necesidad de combinar la amplificación de varias dianas puede suponer pérdidas de rendimiento del tipado de gran impacto lo que, sumado a la posible presencia de secuencias mixtas, reduce sustancialmente el número de casos con asignación exitosa de MLG. Su principal inconveniente, sin embargo, reside en la falta de un protocolo o esquema consensado de utilidad universal. Numerosos trabajos muestran el uso de esquemas con diferentes combinaciones de loci para el estudio de cohortes de pacientes o bien para la investigación de brotes de neumocistosis (102,123). Algunos ejemplos de esquemas incluyen combinaciones de: mt26S y DHPS (124,130,131,155), DHPS e ITS (180,181) o mt26S, DHPS e ITS (160), entre otros. La principal consecuencia de esta heterogeneidad es que no resulta posible extrapolar datos y comparar resultados entre estudios.

En los últimos años, han surgido dos iniciativas que tienen como objetivo generar un esquema MLST consensado para el tipado de *Pneumocystis*. La primera, auspiciada por la *International Society of Human and Animal Mycology* (ISHAM), propuso un esquema de tipado que incluye las dianas  $\beta$ -TUB, DHPS, mt26S e ITS; este proyecto cuenta con una base de datos pública para depósito y consulta de secuencias accesible a través de internet (<http://mlst.mycologylab.org/pijrovecii>). La segunda iniciativa, publicada en 2013 por Maitte y colaboradores (182) consistió en la evaluación de ocho dianas diferentes (26S,  $\beta$ -TUB, DHPS, DHFR, mt26S, ITS, SOD y CYB) proponiendo el uso de una estrategia compleja basada en el uso de todas las dianas o, alternativamente,

dos estrategias simplificadas pero con una capacidad discriminatoria válida basadas en la combinación de mt26S, SOD y CYB o bien de 26S, mt26S,  $\beta$ -TUB e ITS. A día de hoy ningún esquema MLST ha sido adoptado de forma generalizada, dificultando así el avance del conocimiento de la epidemiología de *Pneumocystis* (102).



# **JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## 2. Justificación, hipótesis y objetivos

### 2.1. Justificación del estudio

La neumonía por *P. jirovecii* ha sufrido cambios epidemiológicos en los últimos años, con incidencia decreciente en pacientes VIH positivos y aumento progresivo en los inmunocomprometidos VIH negativos. En estos últimos, y comparado con los pacientes VIH positivos, la neumonía por *P. jirovecii* es más grave, acarrea mayor mortalidad, y cursa con menor carga fúngica. La técnica de diagnóstico microbiológico de referencia, basada en el examen microscópico, presenta bajo rendimiento y, con frecuencia, no es posible obtener una muestra broncoscópica. El uso de muestras respiratorias no invasivas y la aplicación de técnicas moleculares de diagnóstico en esta población, aunque se plantean como alternativas potencialmente útiles, tienen un rendimiento desconocido y que puede variar en función de la diana molecular seleccionada para detectar *Pneumocystis*. Representaría un gran avance en el cuidado de los pacientes inmunocomprometidos disponer de una técnica de muestreo no invasiva que, combinada con técnicas microbiológicas sensibles y específicas, permitiese aumentar el rendimiento diagnóstico de la neomoncistosis.

La información relacionada con aspectos epidemiológicos relevantes de la infección por *Pneumocystis* (ej.: las poblaciones circulantes en cada área geográfica, las diferencias de patogenicidad entre cepas, su asociación con factores de riesgo, grupos específicos de pacientes, o gravedad, o la capacidad para producir brotes) es escasa e incluso contradictoria. Ello se debe, principalmente, a la ausencia de un método de genotipado estandarizado y de aplicabilidad general. La generación de un esquema eficiente de genotipado permitiría hacer estudios en diferentes escenarios, comparar sus resultados y acumular datos a gran escala para avanzar en el conocimiento de esta infección.



## **2.2. Hipótesis**

### **2.2.1. Optimización del diagnóstico microbiológico de la infección por *Pneumocystis jirovecii***

Las técnicas de PCR a tiempo real permiten detectar cargas fúngicas muy bajas, mejorando el diagnóstico de la neumonía por *P. jirovecii* en pacientes inmunodeprimidos no infectados por el VIH y permitiendo la detección de colonizaciones. Debido a su elevada sensibilidad, las técnicas de PCR a tiempo real son de potencial utilidad en muestras no invasivas, donde la carga fúngica es muy baja, aunque la diana genética utilizada puede influir en su rendimiento diagnóstico. La elección de la diana, por su parte, puede ser un factor crítico a la hora de seleccionar puntos de corte que ayuden a diferenciar colonizaciones de infecciones.

### **2.2.2. Genotipado y epidemiología basada en técnicas moleculares**

MLST es una estrategia de genotipado útil para el estudio epidemiológico de *P. jirovecii* en el ámbito clínico. El desarrollo de un esquema MLST de genotipado discriminatorio y aplicable a la variedad de situaciones clínicas asociadas a *Pneumocystis* puede ser de gran ayuda para profundizar de forma efectiva en el conocimiento de su epidemiología. La capacidad discriminatoria y aplicabilidad de los esquemas de MLST, no obstante, podría verse influida por las dianas seleccionadas y la cantidad de hongo presente en las muestras.



## 2.3. Objetivos

### 2.3.1. Optimización del diagnóstico microbiológico de la infección por *Pneumocystis jirovecii*

#### Objetivo principal:

- Evaluar el rendimiento de muestras de lavado oral para el diagnóstico de la neumonía por *P. jirovecii* mediante el uso de técnicas de PCR a tiempo real particularmente en pacientes inmunocomprometidos no infectados por el VIH.

#### Objetivos secundarios:

- Comparar el rendimiento diagnóstico de dos técnicas de PCR en tiempo real con diferente diana genética aplicadas a muestras de lavado oral (muestra no invasiva) y lavado broncoalveolar (muestra invasiva).

- Comparar el rendimiento de las muestras de lavado oral (muestra diagnóstica alternativa) y lavado broncoalveolar (muestra diagnóstica de referencia), para el diagnóstico de la neumonía por *P. jirovecii*, especialmente en población inmunocomprometida no infectada por el VIH.

- En base a los resultado de las técnicas de PCR, establecer criterios de interpretación para cada tipo de muestra estudiada que ayuden a diferenciar los estados de colonización e infección en pacientes portadores de *P. jirovecii*.



### 2.3.2. Genotipado y epidemiología basada en técnicas moleculares

#### Objetivo principal:

- Comparar el rendimiento de dos esquemas MLST de genotipado propuestos previamente que incluyen los siguientes loci:  $\beta$ -TUB, DHPS, mt26S e ITS versus mt26S, SOD y CYB respectivamente, así como el de posibles combinaciones de alternativas de estos loci para identificar el esquema MLST más adecuado para el tipado de *P. jirovecii*.

#### Objetivos secundarios:

- Describir la influencia de la carga fúngica presente en la muestra sobre la tasa de amplificación de los loci estudiados.
- Describir la diversidad genética de *P. jirovecii* para cada uno de los loci estudiados en la cohorte de estudio.
- Comparar las variantes alélicas de cada loci halladas en la población sometida a estudio con las previamente descritas en la literatura, haciendo particular énfasis en la comparación con variantes descritas en España.
- Para la población estudiada, describir la diversidad genética de *P. jirovecii* en base a los resultados de la combinación de los loci anteriormente mencionados.
- Describir la posible presencia de mutaciones en el gen DHPS previamente descritas asociadas a potencial resistencia a cotrimoxazol.
- Identificar las variantes alélicas que solas o en combinación se asocien con alguno de los siguientes rasgos: (i) neumonía versus colonización, (ii) gravedad de la infección, (iii) enfermedad de base, (iv) tratamientos inmunosupresores, (v) percepción de cuidados en centro sanitario.



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



## **3. Material y Métodos**

### **3.1. Estudio 1: Optimización del diagnóstico microbiológico de la infección por *Pneumocystis jirovecii***

#### **3.1.1. Diseño del estudio, pacientes, tipo de muestra clínica y clasificación de los episodios.**

Se realizó un estudio retrospectivo comprendido entre marzo del 2016 y marzo del 2018 en el Hospital Universitario Vall d'Hebron, hospital terciario de referencia en la ciudad de Barcelona. Se incluyeron en el estudio aquellos pacientes inmunodeprimidos que presentaron signos y síntomas de insuficiencia respiratoria aguda en cuyo diagnóstico diferencial se incluyera la neumonía por *P. jirovecii* y de los cuales se hubiese obtenido muestras pareadas de lavado oral y LBA con no más de 48 horas de diferencia. Se incluyó, además, un paciente del que se obtuvo una biopsia pulmonar que presentaba hallazgos anatomopatológicos compatibles con *Pneumocystis* y del que se disponía de un lavado oral recogido 4 días antes.

Para la recogida de muestras de lavado oral se indicó a los pacientes que realizaran durante 30 segundos gárgaras con 10 mL de suero fisiológico tan vigorosamente como fuesen capaces y que depositasen el líquido resultante en un recipiente de boca ancha estéril. Las muestras de LBA se obtuvieron mediante fibrobroncoscopia flexible según el procedimiento habitual.

Se revisaron las historias clínicas y se registraron las siguientes variables: edad, sexo, enfermedad o causa de inmunosupresión de base, tratamientos inmunosupresores habituales incluyendo el uso previo de corticoides sistémicos, fiebre, presencia de disnea, saturación de oxígeno en aire ambiente (%), recuento de linfocitos en sangre (células/mm<sup>3</sup>) y patrón radiológico, así como el uso de fármacos con actividad frente a *Pneumocystis* en las semanas previas a la toma de las muestras y su duración.

Para cada episodio de insuficiencia respiratoria incluido en el estudio, el diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii* se estableció por consenso entre microbiólogos y especialistas en enfermedades infecciosas teniendo en cuenta tanto los datos clínicos como los hallazgos radiológicos y de laboratorio. Los casos de insuficiencia respiratoria aguda en los que se detectó presencia de *Pneumocystis* en alguna de las muestras, pero en los que el resto de hallazgos clínicos y de laboratorio apuntaron como causa principal o más probable a una etiología alternativa fueron etiquetados como colonizaciones.

### **3.1.2. Procedimientos de laboratorio**

#### **3.1.2.1. Detección de *P. jirovecii* mediante inmunofluorescencia directa**

Para detección de *P. jirovecii* por microscopía se aplicó una técnica comercial de IFD (Merifluor Pneumocystis; Meridian Bioscience Inc.) basada en anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína y capaz de detectar tanto las formas trofozoíticas como las quísticas. La tinción se aplicó a muestras de LBA, siempre que el volumen disponible fuese  $\geq 5$  mL. Siguiendo las instrucciones del fabricante, la tinción se realizó sobre una alícuota del sedimento obtenido tras centrifugar el volumen; las extensiones se fijaron con acetona y se cubrieron con 50  $\mu$ L de la solución de tinción. Tras incubación en cámara húmeda a 35-37°C durante 30 minutos y posterior aclarado para eliminar el exceso de reactivo, las preparaciones fueron examinadas inmediatamente a 100 y 400 aumentos utilizando para ello un microscopio de fluorescencia. Se consideraron positivas aquellas extensiones en las que se observaron, al menos, dos formas trofozoíticas y/o quísticas.

#### **3.1.2.2. Extracción de ácidos nucleicos**

La extracción de ADN se realizó mediante el kit de columnas QIAamp DNA minikit (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para las muestras de lavado oral y de LBA, se partió de un volumen de 1 mL y 400  $\mu$ L, respectivamente,

obteniéndose tras dos ciclos de centrifugación, lavado y filtrado, un volumen final de elución de 60 µL. Los eluidos fueron empleados inmediatamente para realizar el diagnóstico molecular; los remanentes, siempre que fue posible, se conservaron a -20°C.

### 3.1.2.3. Técnicas de PCR a tiempo real

A los eluidos de todas las muestras incluidas en el estudio se aplicaron, en paralelo y por separado, dos técnicas de PCR en tiempo real previamente descritas (108,112) con pequeñas modificaciones. Cada una de las técnicas estaba dirigida contra una diana genética diferente: DHPS (gen nuclear de copia única) y mtSSU rRNA (gen mitocondrial presente en un número de copias múltiple y poco variable). Las secuencias de los cebadores y las sondas se detallan en la tabla 4. La reacción de amplificación se realizó en un termociclador SmartCycler Thermal Cycler (Cepheid, Sunnyvale, CA) bajo las siguientes condiciones de temperatura: 95°C 15 minutos para la activación de la polimerasa, seguido de 45 ciclos de 15 segundos a 95°C para la desnaturalización del ADN y 1 min a 60°C para la hidridación de los cebadores y la extensión. Brevemente, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µL, con los cebadores a concentración 0.4 µM y la sonda a 0.2 µM. Se utilizó la RNAsa P humana marcada con el fluoróforo VIC (Applied Biosystems, Texas) como control de inhibición.

**Tabla 4.** Dianas genéticas y secuencias de los cebadores y sondas de las PCR a tiempo real utilizadas para el diagnóstico de la infección por *Pneumocystis jirovecii*.

Diana	Cebadores y sonda	Secuencia (5'-3')
<b>DHPS</b>	DHPS_F	GCTTGGTCCAAGTCGCAAAA
	DHPS_R	AGCAGTGCCCCAAATCC
	DHPS_P	FAM-ATTTACAGGGTGTCTTACAGGTGATGTTATGCCAA-BHQ1
<b>mtSSU rRNA</b>	mtSSU_Pj1098F	TCATGACCCTTATGAAGTGGGC
	mtSSU_Pj1173R	GCTCCGACTTCCATCATTGC
	mtSSU_P1125P	FAM-ACGTGCTGCAAAATTTTCTACAATGGG-BHQ1

### **3.1.3. Expresión de los resultados y análisis estadístico**

Los resultados de las PCR en tiempo real se expresaron como valores de Ct (cycle threshold). Los valores cuantitativos se expresaron como media (95% de intervalo de confianza [IC95%]). Las proporciones se expresaron como porcentajes. Para el análisis de las variables categóricas se utilizó la prueba chi-cuadrado o el test exacto de Fisher, mientras que para analizar las variables cuantitativas se aplicó el estadístico t de Student o bien el test de Mann-Whitney según correspondiese.

Se calcularon la sensibilidad, la especificidad y los valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) para cada tipo de muestra y diana genética. Se utilizó el índice kappa (k) para evaluar la concordancia de los resultados cualitativos entre las muestras para cada técnica de PCR y entre las técnicas de PCR para cada tipo de muestra. Se midió la eficiencia diagnóstica mediante el cálculo del área bajo la curva (AUC) ROC (Receiver Operator Characteristic) considerando deseable un valor  $> 0.9$ .

Para el análisis estadístico se utilizó el programa Stata Statistical Package versión 15.0 (StataCorp, College Station, TX, USA). Para elaborar los gráficos se contó con el apoyo adicional del programa GraphPad Prism 8.1.

## **3.2. Estudio 2: Genotipado y epidemiología basada en técnicas moleculares**

### **3.2.1. Diseño del estudio, pacientes y tipo de muestra clínica**

Se realizó un estudio retrospectivo observacional en el periodo comprendido entre abril de 2014 y abril de 2018. Se incluyeron pacientes atendidos en el Hospital Universitario Vall d'Hebron, en los que, como parte del proceso de diagnóstico o seguimiento de la patología del paciente, se remitió una muestra de lavado oral y/o LBA para la detección de *P. jirovecii* mediante PCR y ésta resultó positiva. Se incluyeron pacientes en los que la detección de *P. jirovecii* correspondió, según criterios clínicos, radiológicos y de laboratorio, tanto a casos de neumonía como de colonización.

El diagnóstico de laboratorio se realizó como se ha descrito en los apartados 3.1.2.2 y 3.1.2.3 y los resultados se expresaron como Ct. En el estudio se incluyeron eluidos que se hubiesen conservado a -20°C después del diagnóstico y, en caso de disponer de más de uno, sólo se incluyó un eluido por paciente.

De cada paciente se registraron variables demográficas y clínicas relativas al episodio patológico que motivó la obtención de la muestra, incluyendo edad, sexo, patologías y tratamientos inmunosupresores de base, el uso de profilaxis frente a *Pneumocystis* y asociación del episodio a la asistencia sanitaria (ingreso hospitalario en los tres meses previos o detección de *Pneumocystis* en el curso de un ingreso por una causa no relacionada) y, en los casos de neumonía, variables indicadoras de gravedad: saturación de O<sub>2</sub> en aire ambiente (%), necesidad de intubación orotraqueal (IOT), necesidad de ingreso en UCI y mortalidad en el episodio. A cada paciente se le asignó un número de identificación consecutivo en orden cronológico.

### 3.2.2. Tipado mediante MLST

Para el genotipado de *P. jirovecii* se utilizaron inicialmente dos protocolos MLST basadas en el resultado de la secuenciación parcial de 3 o 4 genes. El primero de ellos (“esquema 1”), es el propuesto por la ISHAM (disponible en <http://mlst.mycologylab.org/page/PJ%20Main>) e incluye como dianas  $\beta$ -TUB (168), DHPS (131), mt26S (168) e ITS (146). El segundo protocolo (“esquema 2”), fue propuesto por Maitte y colaboradores en 2013 (182) e incluye CYB (156), mt26S (183) y SOD (156). Para amplificar la diana mt26S, presente en ambos esquemas, se utilizaron dos protocolos diferentes: el previamente descrito en la literatura (protocolo “mt26S-A”) (178) y un protocolo diseñado *de novo* generado por el consorcio formado por integrantes del Molecular Mycology Research Laboratory, Sydney Medical School - Westmead Hospital, University of Sydney, Sydney, Australia, el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile y nuestro propio grupo (protocolo “mt26S-B” disponible en <http://mlst.mycologylab.org/page/PJ%20Primers%20Pasic%202020>).

Todas las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu$ L, con una concentración de cebadores al 0.4  $\mu$ M y un volumen de eluido de ADN de 2.5  $\mu$ L. La información de los cebadores, tamaño de los fragmentos, condiciones térmicas y secuencias de referencia están detalladas en la tabla 5. Para la amplificación del ADN se utilizó la polimerasa GoTaq® Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA). La amplificación se verificó mediante visualización de las bandas del tamaño esperado en un gel de agarosa al 2%. A continuación, se procedió a la purificación enzimática de los productos de amplificación mediante el uso de ExoSAP-IT™ (Applied Biosystems), añadiendo 2  $\mu$ L del reactivo a 5  $\mu$ L del producto de amplificación y procediendo a 15 minutos de incubación a 37°C y posteriormente, 15 minutos a 80°C. Una vez purificados, se procedió a la secuenciación de las hebras *forward* y *reverse* mediante secuenciación Sanger

utilizando la tecnología BigDye™ Terminator (Applied Biosystems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los alelos identificados fueron nombrados siguiendo la nomenclatura preestablecida para cada diana (tabla 10).

Se realizaron un máximo de 2 intentos de amplificación por cada muestra y diana. Se consideró la amplificación fallida si, tras los dos intentos, el resultado obtenido fue la no amplificación o la obtención de una secuencia no analizable.

**Tabla 5.** Cebadores utilizados en los esquemas de genotipado, condiciones de amplificación y secuencias de referencia utilizadas.

Loci	Cebadores (secuencia 5´-3´)	Tamaño del fragmento (pb)	Protocolo de temperatura	Secuencia de referencia
<b>β-TUB</b>	<b>BTubF:</b> TCATTAGGTGGTGGAAACGGG <b>BTubR:</b> ATCACCATATCCTGGATCCG	283	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C 2 min</li> <li>• 40 ciclos (94°C 15s, 62°C 20s, 72°C 30s)</li> <li>• 72°C 5 min</li> </ul>	AF170964
<b>DHPS</b>	<b>DHPS3:</b> GCGCCTACACATATTATGGCCATTTTAAATC <b>DHPS4:</b> GGAACCTTCAACTTGGCAACCAC	361	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C 2 min</li> <li>• 10 ciclos (94°C 15s, 72°C 30s –decrecer 1°C por ciclo, 72°C 20s)</li> <li>• 40 ciclos (94°C 15s, 62°C 20s, 72°C 30s)</li> <li>• 72°C 5 min</li> </ul>	AF139132
<b>mt26S-A</b>	<b>mt26SF:</b> GATGGCTGTTTCCAAGCCCA <b>mt26SR:</b> GTGTACGTTGCAAAGTACTC	297	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C 2 min</li> <li>• 40 ciclos (94°C 15s, 52°C 20s, 72°C 30s)</li> <li>• 72°C 5 min</li> </ul>	M58605
<b>mt26S-B</b>	<b>PneumoLSU-F:</b> TCAGGTCGAACTGGTGACG <b>PneumoLSU-R:</b> TGTCCAAAGCCACTTCTT	297	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C 2 min</li> <li>• 40 ciclos (94°C 30s, 55°C 45s, 72°C 45s)</li> <li>• 72°C 5 min</li> </ul>	
<b>CYB</b>	<b>CytbFw:</b> CCCAGAACTTCTCGTTTGGTCTATT <b>CytbRw:</b> AAGAGGTCTAAAAGCAGAACCTCAA	576	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C 2 min</li> <li>• 40 ciclos (94°C 30s, 55°C 45s, 72°C 45s)</li> <li>• 72°C 5 min</li> </ul>	AF320344
<b>SOD</b>	<b>MnSODFw:</b> GGGTTTAATTAGTCTTTTTAGGCAC <b>MnSODRw:</b> CATGTTCCACGCATCCTAT	601	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C 2 min</li> <li>• 40 ciclos (94°C 30s, 60°C 45s, 72°C 45s)</li> <li>• 72°C 5 min</li> </ul>	AF146753
<b>ITS</b>	<u>Primera PCR:</u> <b>1724F2:</b> AGTTGATCAAATTTGGTCATTTAGAG <b>ITS2R:</b> CTCGGACGAGGATCCTCGCC <u>Segunda PCR:</u> <b>ITS1F2:</b> CGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATC <b>ITS2R1:</b> GTTCAGCGGGTGTATCCTGCCTG	481	<u>Primera PCR:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C 2 min</li> <li>• 40 ciclos (94°C 30s, 52°C 30s, 72°C 60s)</li> <li>• 72°C 5 min</li> </ul> <u>Segunda PCR:</u> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 94°C 2 min</li> <li>• 30 ciclos (94°C 30s, 56°C 30s, 72°C 60s)</li> <li>• 72°C 5 min</li> </ul>	Desde AF013806 hasta AF013834

### 3.2.3. Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas se depuraron y alinearon con ayuda de los programas MEGA v5.2 y MEGA-X (The Biodesign Institute, Tempe, AZ) según procediese. Una vez depuradas, las secuencias de cada locus se ordenaron de forma independiente y se sometieron a un análisis de variantes con la herramienta `snpsites` (<https://github.com/sanger-pathogens/snp-sites>) con el objetivo de identificar las variantes alélicas presentes para cada locus y definir los genotipos. Una vez definidos los genotipos se concatenaron las secuencias de los loci correspondientes a cada esquema y combinación alternativa y se realizó el análisis filogenético de los mismos utilizando el programa R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.r-project.org/>) y la herramienta PhyloViz (<https://online.phyloViz.net/index>). Se generaron los correspondientes dendrogramas utilizando el método (*UPGMA unweighted pair group method with arithmetic mean*) (184).

Debido al riesgo de ambigüedad de interpretación se excluyeron del análisis filogenético las secuencias individuales de loci que presentaban más de un posible nucleótido por posición, es decir, las secuencias obtenidas de muestras en las que podrían estar presentes mezclas de variantes alélicas (“genotipos mixtos”).

Se utilizó el índice de Hunter (índice H) para evaluar la diversidad genética y la capacidad discriminadora de cada locus y de cada esquema MLST, así como de nuevos esquemas generados mediante combinaciones alternativas de las dianas secuenciadas, entendiendo como “capacidad discriminadora” la capacidad para diferenciar secuencias procedentes de cepas no relacionadas. El índice H se calculó con la fórmula estándar

$$\text{Índice H} = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^s n_j(n_j - 1)$$

donde  $N$  es el número total de secuencias,  $s$  el número de variantes identificadas y  $n_j$  el número de variantes pertenecientes al patrón  $j$ . Se consideró que la diversidad

genética y la capacidad discriminatoria de cada locus y esquema eran adecuados cuando el valor del índice H alcanzado fue  $> 0.95$  (185).

#### **3.2.4. Análisis estadístico**

Las variables continuas se expresaron como media y desviación estándar (SD). Las variables discontinuas se expresaron como proporciones en forma de porcentaje (%). El análisis univariado se realizó utilizando la prueba t de Student y la prueba  $\chi^2$  según correspondiese. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Stata versión 15.0 (StataCorp, College Station, Texas, USA).

### **3.3. Consideraciones éticas**

Los datos relativos a pacientes incluidos en la presente tesis doctoral se obtuvieron y trataron de acuerdo con los códigos establecidos en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial sobre principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos tras la revisión de 2013. Debido al carácter retrospectivo no intervencionista de los estudios incluidos en esta tesis, no se precisó la obtención de consentimiento informado por parte de los pacientes. Los protocolos de investigación y el requerimiento de obtención de datos relacionados con los mencionados estudios fueron aprobados por el Comité de ética del Hospital Universitario Vall d'Hebron, con número de protocolo PR(AG)450/2018.

# RESULTADOS



## 4. Resultados

### 4.1. Estudio 1: Optimización del diagnóstico microbiológico de la infección por *P. jirovecii*

En este estudio se incluyeron 36 pacientes, de los que 31 (88.6%) eran inmunocomprometidos VIH negativos. En 15 casos (41.7%) el episodio respiratorio fue etiquetado como neumonía por *Pneumocystis*, mientras que en los 21 pacientes restantes la causa de la insuficiencia respiratoria aguda fue atribuida a otras causas; entre estos últimos se identificaron 8 pacientes (22.2% del total) portadores de *P. jirovecii* que se etiquetaron como colonizados. Las principales características demográficas y clínicas de los pacientes incluidos en el estudio se encuentran resumidas en la tabla 6.

Las muestras de lavado oral y LBA se obtuvieron, de media, con 1 día (IC95% 0.71-1.30) de diferencia. Ningún paciente recibió tratamiento profiláctico con actividad frente a *P. jirovecii* en los seis meses previos al episodio correspondiente al estudio. Previamente a la toma del lavado oral, 11 pacientes recibieron tratamiento dirigido frente a *P. jirovecii* durante una media de 0.75 días (IC95% 0.21-1.29), mientras que antes de obtener muestras de LBA 28 pacientes recibieron tratamiento dirigido un promedio de 1.63 días (IC95% 0.97-2.30). En lo que respecta a los resultados de la detección por PCR, el efecto de la corta duración del tratamiento dirigido previo a la toma de muestra fue escaso y estadísticamente no significativo, como se detalla en la tabla 7.

**Tabla 6.** Resumen de las principales características clínicas y demográficas de los pacientes incluidos en el estudio 1.

Características de los pacientes	Total (n = 36)	Neumonía por <i>P. jirovecii</i> (n=15)	Otros diagnósticos (n=21)	valor <i>p</i>
Edad (Años) [media, desviación estándar]	60.3 (11.3)	60.5 (10.4)	60.1 (12.1)	0.933
Género [n (%)]				0.955
Masculino	19 (52.8)	8 (53.3)	11 (52.4)	
Femenino	17 (47.2)	7 (46.7)	10 (47.6)	
Causa de la inmunosupresión [n (%)]				0.206
Neoplasia de órgano sólido	11 (30.5)	6 (40.0)	5 (23.8)	
Neoplasia hematológica	10 (27.8)	3 (20.0)	7 (33.4)	
Trasplante de progenitores hematopoyéticos	5 (13.9)	0 (0.0)	5 (23.8)	
VIH	5 (13.9)	3 (20.0)	2 (9.5)	
Trasplante de órgano sólido	3 (8.3)	1 (6.7)	2 (9.5)	
Enfermedad autoinmune	1 (2.8)	1 (6.7)	0 (0.0)	
VIH y trasplante de órgano sólido	1 (2.8)	1 (6.6)	0 (0.0)	
Fiebre [n (%)]	35 (97.2)	15 (100.0)	20 (95.2)	0.391
Disnea [n (%)]	32 (88.9)	14 (93.3)	18 (85.7)	0.473
Saturación de O <sub>2</sub> en aire ambiente [% (SD)]	91.2 (5.7)	91.8 (7.3)	90.8 (4.4)	0.609
Patrón radiológico: intersticial o en vidrio deslustrado [n (%)]	26 (72.2)	13 (86.7)	13 (62.0)	0.102
Linfocitos en sangre [Cells/mm <sup>3</sup> (SD)]	911.1 (596.7)	718.7 (311.8)	1048.4 (712.4)	0.103
Uso previo de corticoides sistémicos [n (%)]	16 (44.4)	6 (40)	10 (47.6)	0.650

**Tabla 7.** Principales datos clínicos y de laboratorio de cada uno de los pacientes incluidos en el estudio 1.

Paciente	S.	Edad	Patología de base	Linfos. (cels/mm3)	Uso previo de corticoides	PJP	OW			Días entre muestreo	BAL		
							Días tto. previo	PCR DHPS (Ct)	PCR mtSSU (Ct)		Días tto. previo	PCR DHPS (Ct)	PCR mtSSU (Ct)
1	F	65	Cáncer de mama	330	Sí	Sí	-	36.8	35.3	0	-	33.2	28.8
2	F	60	Linfoma marginal	2278	No	No	2	Neg	Neg	1	1	37.8	38.3
3	M	56	Trasplante renal	1500	Sí	No	8	Neg	Neg	2	10	Neg	Neg
4	F	58	TPH (LMA)	300	No	No	-	Neg	Neg	2	2	Neg	Neg
5	F	70	Cáncer de pulmón	203	Sí	Sí	1	37.4	35.2	1	2	35.1	30.6
6	F	71	Linfoma folicular	290	No	No	3	Neg	ND	2	5	Neg	Neg
7	F	53	TPH (SMD)	1400	No	No	-	36.5	33.5	1	-	35.6	31.1
8	M	65	Carcinoma de vejiga	1300	Sí	No	-	36.2	30.9	0	-	36.8	32.1
9	M	69	TPH (policitemia vera)	200	No	No	-	Neg	Neg	2	2	Neg	Neg
10	F	69	LLA	1090	No	No	-	Neg	Neg	1	1	Neg	Neg
11	M	71	Adenocarc. de esófago	697	Sí	Sí	-	36.9	33.1	2	1	35.5	Neg
12	M	68	LBDCG	1011	Sí	No	-	37.6	34.8	1	-	37.6	33.3
13 (*)	M	60	VIH y trasplante de hígado	1130	No	Sí	-	30.4	26.3	-	-	-	-
14	M	64	Trasplante de hígado	800	Sí	No	4	Neg	Neg	0	4	Neg	Neg
15	F	65	LLC	800	No	Sí	-	36.9	33.9	2	1	38.4	32.1
16	F	62	Dermatomio-sitis	900	Sí	Sí	1	35.7	35.7	1	2	33.4	29.1
17	M	27	TPH (EGC)	780	Sí	No	3	Neg	Neg	1	4	Neg	Neg
18	M	51	Linfoma cerebral primario	323	No	Sí	1	35.1	31.7	0	1	33.1	30.2
19	M	54	Linfoma colicular	289	Sí	No	-	Neg	Neg	0	-	Neg	Neg
20	F	79	LBDCG	331	No	No	-	Neg	Neg	1	-	Neg	Neg
21	M	51	Astrocitoma	1098	Sí	No	1	Neg	Neg	0	1	38.0	30.9
22	M	68	Cáncer de páncreas	478	No	Sí	-	34.9	32.1	1	1	35.7	32.0
23	F	55	Linfoma folicular	1039	No	Sí	-	38.1	35.2	1	1	34.2	30.1
24	F	51	TPH (LLA)	2808	Sí	No	-	Neg	Neg	2	2	Neg	Neg

25	F	75	Melanoma de coroides	942	No	No	-	Neg	Neg	0	-	37.0	33.9
26	F	53	Cáncer de pulmón	700	No	No	2	Neg	Neg	2	4	Neg	Neg
27	F	59	Cáncer de mama	500	Sí	Sí	-	33.1	29.5	2	2	32.7	28.4
28	M	63	Cáncer de pulmón	1100	Sí	No	-	Neg	Neg	2	2	Neg	33.9
29	F	58	Cáncer de mama	584	Sí	Sí	-	36.2	36.0	1	1	35.8	30.5
30	M	71	LBDCG	200	Sí	No	-	Neg	Neg	1	1	37.3	33.6
31	M	78	Trasplante de hígado	664	No	Sí	-	36.6	29.7	1	1	33.8	ND
32	M	40	VIH	1113	No	Sí	1	26.6	22.7	0	1	24.0	23.0
33	F	44	VIH	1600	No	No	-	Neg	Neg	2	1	Neg	Neg
34	M	42	VIH	900	No	Sí	-	35.1	29.8	1	1	31.5	25.1
35	M	56	VIH	1120	No	Sí	-	34.7	28.3	1	1	23.1	18.7
36	M	49	VIH	2000	No	No	-	Neg	Neg	0	1	Neg	Neg

(\*) No se dispuso de BAL pero el paciente fue diagnosticado mediante análisis citológico sobre muestra de biopsia pulmonar.

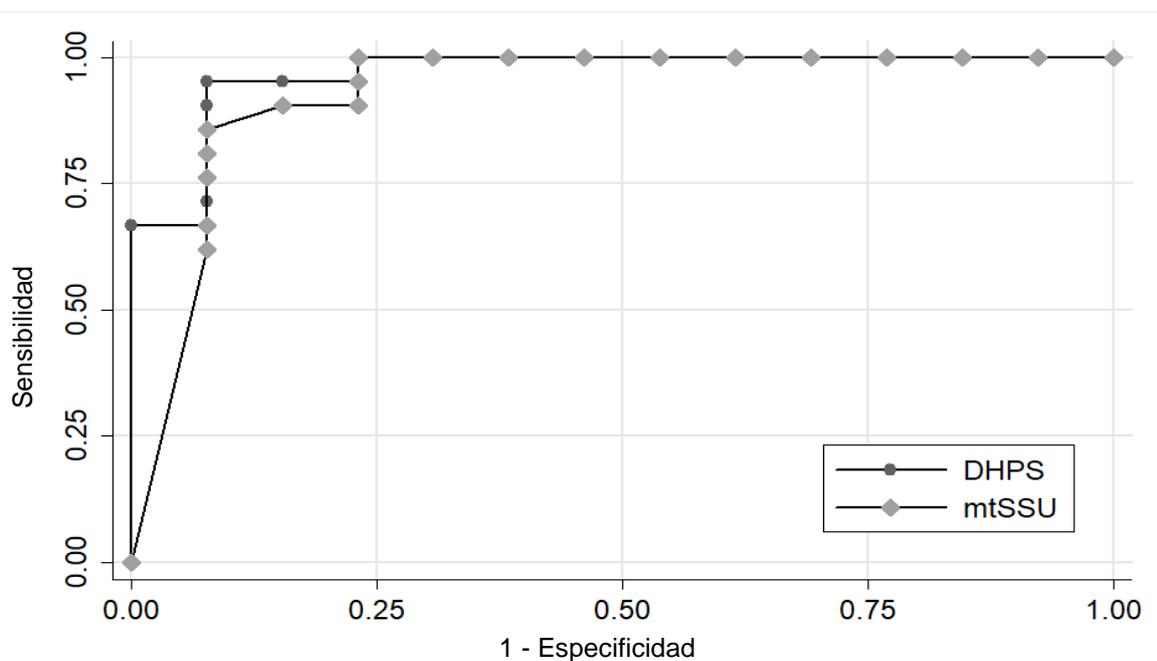
S: sexo; M: masculino; F: femenino; Linfos: recuento de linfocitos en sangre periférica; PJP: neumonía por *Pneumocystis jirovecii*; OW: lavado oral; BAL: lavado broncoalveolar; tto: tratamiento; DHPS: dihidropteroato sintasa; mtSSU: subunidad menor del ARN ribosomal mitocondrial; Neg: negativo; TPH: trasplante de progenitores hematopoyéticos; LMA: leucemia mieloide aguda; SMD: síndrome mielodisplásico; LLA: leucemia linfocítica aguda; LBDCG: linfoma B de células grandes; EGC: enfermedad granulomatosa crónica; VIH: virus de la inmunodeficiencia humana.

#### 4.1.1. Rendimiento diagnóstico de DHPS y mtSSU rRNA aplicadas a muestras de lavado broncoalveolar

Cuando se aplicaron a la muestra patrón, el LBA, ambas técnicas moleculares mostraron una capacidad de detección de *P. jirovecii* similar, tanto en lo que respecta a los casos de neumonía como a los de colonización, pese a la diferencia en el número de copias del gen diana. Únicamente se identificó una discordancia relacionada con un falso negativo de la técnica mtSSU, de causa desconocida, en un caso de neumonía, y un falso negativo de la técnica DHPS en un caso de colonización atribuible a la menor sensibilidad teórica de esta diana para cargas fúngicas extremadamente bajas. La carga fúngica fue estadísticamente superior en los casos de neumonía comparado con los de colonización, aunque la diferencia fue más

evidente cuando se cuantificó mediante DHPS (Ct neumonía 32.8 [30.6-35.1], Ct colonización 37.2 [36.6-38.4],  $p=0.0071$ ) que mediante mtSSU (Ct neumonía 29.1 [26.4-31.9]; Ct colonización 33.4 [31.8-35]  $p=0.04$ ). En las muestras de LBA obtenidas de casos de neumonía se observaron cargas fúngicas significativamente más altas en los pacientes VIH positivos que en los pacientes VIH negativos y esta diferencia se observó con ambas técnicas (DHPS: VIH positivos 26.2 [21.0-31.4] frente a 34.6 [33.6-35.6] en VIH negativos,  $p \leq 0.0055$ ; mtSSU: VIH positivos 22.3 [18.6-26.0] frente a 31.2 [29.1-33.3] en VIH negativos,  $p \leq 0.002$ ). Pese a estas diferencias, el análisis mediante curva ROC (figura 13) permitió establecer unos puntos de corte de 36.8 para DHPS y 30.9 para mtSSU para el diagnóstico de la neumonía por *P. jirovecii* independientemente del estatus VIH, con un rendimiento del 96.9% y 93.0%, respectivamente. No se hallaron diferencias significativas en el rendimiento diagnóstico sobre LBA entre ambas PCR ( $p= 0.525$ ) y la concordancia entre ambas técnicas en el BAL fue buena ( $k=0.879$ ).

**Figura 13.** Curvas ROC de las PCR con diana DHPS y mtSSU rRNA aplicadas sobre muestras de lavado broncoalveolar para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*.



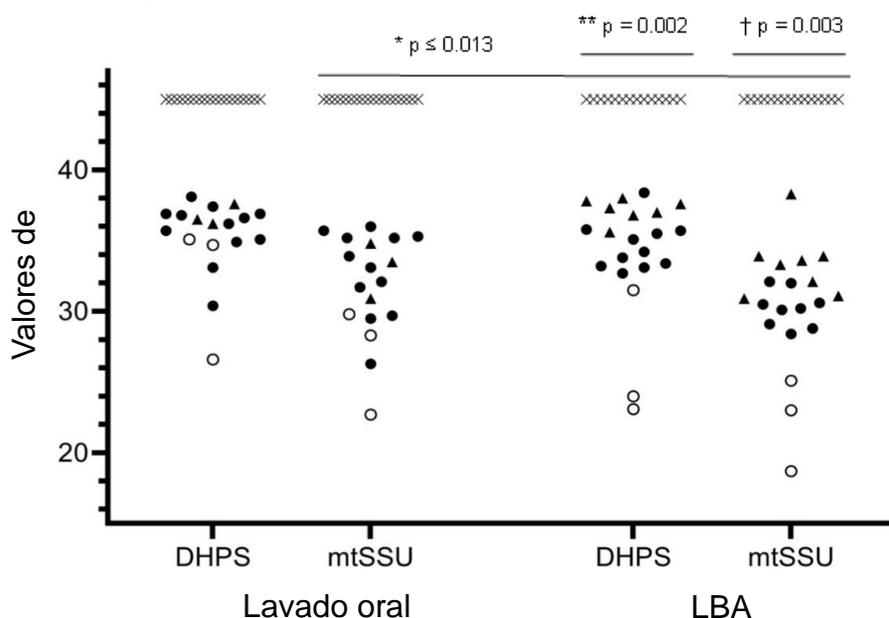
#### **4.1.2. Rendimiento diagnóstico de DHPS y mtSSU aplicadas a muestras de lavado oral**

Las muestras de lavado oral ofrecieron un resultado positivo en todos los casos de neumonía diagnosticados en los LBA, con ambas técnicas de PCR, mostrando por tanto una sensibilidad del 100% y una concordancia excelente entre ambas ellas ( $k=1$ ). La especificidad para el diagnóstico de neumonía, en cambio, fue inferior, del 84.2%, ya que se obtuvo un resultado positivo en muestras de lavado oral correspondientes a 3 pacientes colonizados. No se apreciaron diferencias significativas en la carga fúngica detectada entre los casos de colonización y los de neumonía (figura 14), independientemente del gen utilizado. Tampoco se apreciaron diferencias significativas en las cargas fúngicas de los LBA de los pacientes colonizados lavado oral positivo y los negativos ( $p=0.229$  para DHPS y  $p=0.281$  para mtSSU) (figura 15), por lo que la carga detectada en el lavado oral no se pudo utilizar como predictora de la carga presente en LBA.

Expresadas en Cts, las cargas medidas en los lavados orales mediante DHPS fueron 36.8 (35.9-37.6) para colonizados frente a 35.6 (34.5-36.9) ( $p=0.407$ ) en casos de neumonía; en el caso de mtSSU, las cargas fúngicas en colonizados fueron 33.1 (30.8-35.3) frente a 32.8 (31.0-34.5) en casos de neumonía ( $p=0.893$ ). En lo relativo a la causa de inmunosupresión, no se observaron diferencias en la carga fúngica detectada entre los lavados orales de pacientes VIH positivos y negativos con la diana DHPS [32.1 (26.7-37.6) y 35.7 (34.5-36.9), respectivamente], pero sí con la diana mtSSU [26.9 (22.7-31.2) en el caso de los VIH positivos frente a 32.8 (31.1-34.5) en VIH negativos,  $p= 0.013$ ]. A diferencia de lo observado para las muestras de LBA, el solapamiento de cargas fúngicas entre los distintos perfiles de pacientes no permitió establecer un punto de corte universal que ayudase a discriminar entre casos de colonización e infección y que fuese aplicable a las muestras de lavado oral para cada una de las dianas. La interpretación cualitativa de los resultados de las técnicas de

PCR aplicadas a muestras de lavado oral, en cambio, ofreció un rendimiento diagnóstico del 91.7%, independientemente de la técnica utilizada y el tipo de inmunosupresión de base.

**Figura 14.** Distribución de la carga fúngica detectada en función del grupo de población, tipo de muestra, diana genética y estatus respecto a *Pneumocystis*.



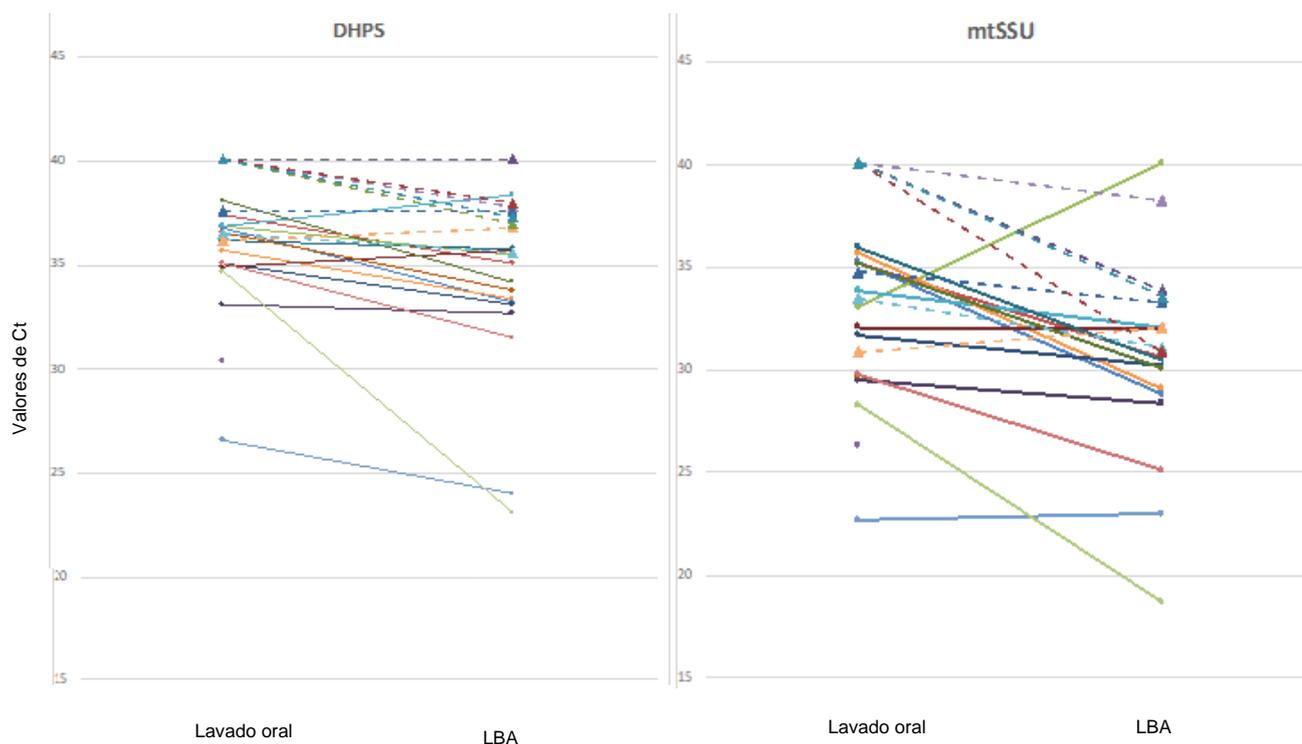
○ Neumonía por *P. jirovecii* en pacientes VIH (+); ● Neumonía por *P. jirovecii* en pacientes VIH (-); ▲ Pacientes colonizados por *P. jirovecii*; X Pacientes en los que no se detecta *P. jirovecii*. Los valores de p corresponden a las diferencias de carga fúngica entre (\*) Neumonía VIH(+) versus VIH(-), (\*\*) Neumonía vs colonización en pacientes VIH(-) para muestras de LBA, y (†) Neumonía vs colonización en pacientes VIH(-) para muestras de LBA.

**Tabla 8.** Rendimiento diagnóstico de las PCR en tiempo real aplicado sobre muestras de lavado oral y lavado broncoalveolar para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*.

Muestra	Diana	Media (95% IC) de los valores de Ct		Interpretación	Sens.	Espec.	VPP	VPN	Rendimiento
		Colonización	Neumonía						
Lavado oral	DHPS	36.8 (35.9-37.6)	35.6 (34.5-36.9)	Cualitativa	100	85.7	83.3	100	91.7
	mtSSU	33.1 (30.8-35.3)	32.8 (31.1-34.5)						
LBA	DHPS	37.2 (36.6-38.4)	32.8 (30.6-35.1)	Cuantitativa (punto de corte 36.8)	95.2	92.9	95.2	92.9	96.9
	mtSSU	33.4 (31.8-35)	29.1 (26.4-31.9)	Cuantitativa (punto de corte 30.9)	100	76.9	87.5	100	93.0

Sens: sensibilidad, Espec: especificidad, VPP: valor predictivo positivo, VPN: valor predictivo negativo.

**Figura 15.** Diferencia de carga fúngica detectada por cada diana en función del tipo de muestra y el estatus de colonización/infección por *Pneumocystis* para cada paciente.



Los ● y líneas continuas representan los casos de neumonía; los ▲ y las líneas discontinuas representan los casos de colonización. Se pueden observar cargas fúngicas más elevadas con la diana mtSSU respecto a la DHPS, siendo, por lo general, más elevadas en los LBA respecto a los lavados orales.

#### 4.1.3. Rendimiento diagnóstico de la técnica microscópica de referencia

Otro dato interesante desprendido de este estudio fue que el diagnóstico basado en la microscopía tras tinción IFD sobre LBA sólo permitió identificar el 48% de los casos de neumonía por *P. jirovecii* incluidos. Aunque la sensibilidad de la microscopía fue menor en los pacientes VIH-negativos que en los VIH-positivos (4/9, 44.4% versus 3/3, 100%, respectivamente) la diferencia no fue significativa ( $p=0.205$ ).

## 4.2. Estudio 2: Genotipado y epidemiología basada en técnicas moleculares

En el estudio 2 se incluyeron muestras de 86 pacientes positivos para *P. jirovecii* correspondientes a 36 casos de neumonía (41.9%) y 50 de colonización (58.1%). En la tabla 9 se describen los datos demográficos y las características basales de los pacientes, incluidos los tratamientos farmacológicos y la existencia de relación entre la detección de *P. jirovecii* y contacto previo con el sistema sanitario, así como el tipo de muestra y su carga fúngica.

Clínicamente, los pacientes con diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii* (n=36) presentaron una saturación media de O<sub>2</sub> en aire ambiente del 89% (SD 6.5%), 14 (38.9%) pacientes requirieron ingreso en UCI, 9 (25.0%) precisaron intubación y soporte ventilatorio y 17 (47.2%) fueron *exitus*. En conjunto 27 (75%) de los pacientes con diagnóstico de neumonía presentaron al menos uno de los indicadores de gravedad considerados en el estudio.

Las características demográficas y clínicas de pacientes colonizados e infectados fueron homogéneas en todos los aspectos excepto para el contacto previo o relación con el sistema sanitario y el uso previo de profilaxis, significativamente más frecuente en colonizados. No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre indicadores de gravedad y patologías de base particulares en la cohorte estudiada aunque tendió sin alcanzar significación estadística a ser más grave en varones (21/25, 84%) que en mujeres (6/11, 54.4%),  $p = 0.060$ .

**Tabla 9.** Principales características de los pacientes incluidos en el estudio 2, tipos de muestras y carga fúngica (Ct) presente en las mismas.

Características de los pacientes	Total (n=86)	Neumonía (n=36)	Colonización (n=50)	valor p
Edad (Años) [media, desviación estándar]	57.3 (15.9)	58.0 (14.6)	56.8 (16.9)	0.734
Género [n (%)]				0.148
Masculino	52 (60.5)	25 (69.4)	27 (54.0)	
Femenino	34 (39.5)	11 (30.6)	23 (46.0)	
Causa de la inmunosupresión [n (%)]				0.182
Neoplasia de órgano sólido	28 (32.6)	14 (38.9)	14 (28.0)	
Neoplasia hematológica	19 (22.1)	6 (16.7)	13 (26.0)	
Trasplante de progenitores hematopoyéticos	10 (11.6)	2 (5.5)	8 (16.0)	
VIH	8 (9.3)	6 (16.7)	2 (4.0)	
Trasplante de órgano sólido	6 (7.0)	2 (5.5)	4 (8.0)	
Otros	6 (7.0)	1 (2.8)	5 (10.0)	
Enfermedad autoinmune	5 (5.8)	3 (8.3)	2 (4.0)	
VIH y neoplasia de órgano sólido	1 (1.15)	1 (2.8)	0	
Neo. órgano sólido y trasplante órgano sólido	1 (1.15)	0	1 (2.0)	
Neo. órgano sólido y neo. hematológica	1 (1.15)	0	1 (2.0)	
VIH, neo. órg. sólido y trasplante órg. sólido	1 (1.15)	1 (2.8)	0	
Tratamientos farmacológicos [n (%)]				
Corticoesteroides sistémicos	58 (67.4)	22 (61.1)	36 (72.0)	0.288
Terapias biológicas	28 (32.6)	10 (27.8)	18 (36.0)	0.422
Quimioterapia	36 (41.9)	18 (50.0)	18 (36.0)	0.194
Fármacos inmunomoduladores/inmunosupresores	19 (22.1)	7 (19.4)	12 (24.0)	0.615
Asociación con el sistema sanitario [n (%)]	58 (67.4)	20 (55.6)	38 (76.0)	0.046
Uso previo de profilaxis frente a PJ [n (%)]	8 (9.3)	0	8 (16.0)	0.012
Tipo de muestra estudiada y carga fúngica [Ct (desviación estándar)]				
Lavado oral	23	17 Ct 33.0 (3.5)	6 Ct 35.1 (1.9)	0.197
Lavado broncoalveolar	63	19 Ct 31.7 (4.4)	44 Ct 35.6 (2.6)	0.000

#### **4.2.1. Tasas de amplificación y relación con la carga fúngica.**

Los genes incluidos en los dos esquemas MLST preestablecidos (ITS,  $\beta$ -TUB, DHPS, SOD, mt26S-A, mt26S-B y CYB) mostraron tasas de amplificación no homogéneas (tabla 10). Los loci nucleares (ITS,  $\beta$ -TUB, DHPS y SOD) mostraron tasas de secuenciación exitosa menores; la falta de éxito en la amplificación de las dianas nucleares se correlacionó significativamente con valores de Ct más altos de la PCR diagnóstica, que indicaban la presencia de cargas fúngicas menores en la muestra problema ( $p < 0.007$ ). Los loci mitocondriales (mt26S-A, mt26S-B y CYB), por el contrario, presentaron tasas de secuenciación exitosa más altas y no asociadas con los valores de Ct de la PCR en tiempo real ( $p > 0.05$ ). La tasa de amplificación y su correlación con la carga fúngica en función de la situación clínica (colonización/neumonía) y el tipo de muestra se reflejan en las figuras 16 y 17 y la tabla 11.

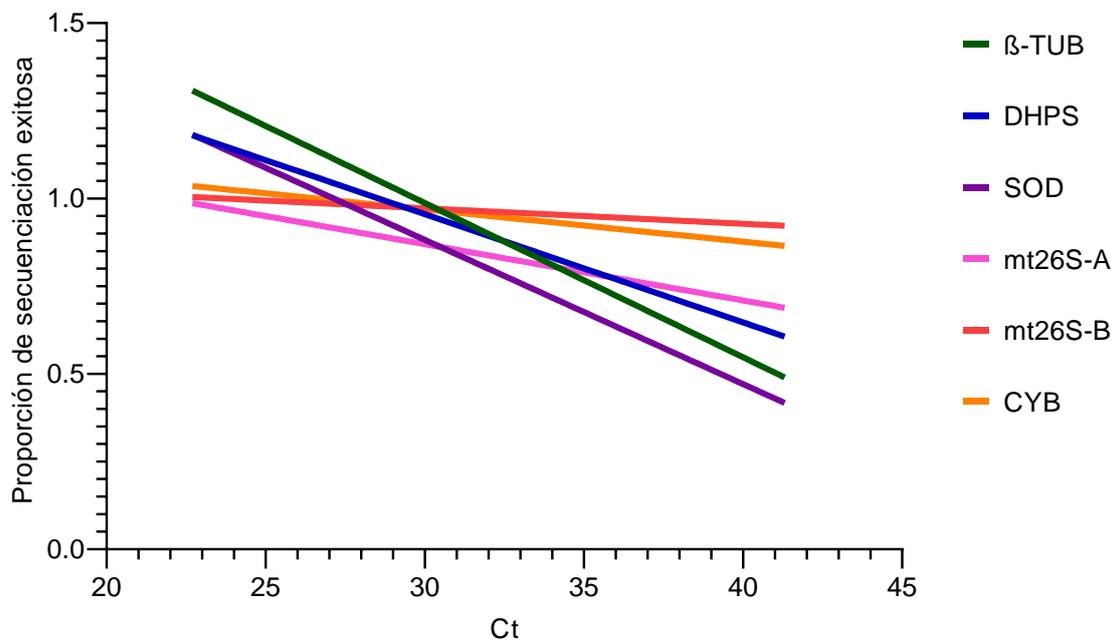
**Tabla 10.** Distribución alélica, ratios de amplificación, proporción de secuenciotipos mixtos e índice de Hunter de los loci secuenciados.

Locus	Alelos	Número (%) de pacientes con alelo secuenciados		Posición del SNP (aminoácido) y referencia para la nomenclatura de los alelos	Índice de Hunter
<b>β-TUB</b>		69/86 (80,2)		Gianella et al (134)	0.495
	β-TUB 1	42 (61,0)		24A; 282G	
	β-TUB 3	26 (37,7)		24A; 282A	
	β-TUB 3 variante <sup>a</sup>	1 (1,4)		24A; 87A <sup>a</sup> ; 282A	
<b>DHPS</b>		71/86 (82,6)		Lane et al (161)	0
	Wt			165 (55)/A (Thr); 171 (57)/C (Pro)	
<b>ITS<sup>b</sup></b>		18/48 (37,5)		Lee et al (146)	0.817
	Eg	7 (39,0)			
	Bi	4 (22,2)			
	Ee	2 (11,1)			
	Ai	1 (5,5)			
	Ea	1 (5,5)			
	Eh	1 (5,5)			
	Jh <sup>a</sup>	1 (5,5)			
	Ne	1 (5,5)			
<b>mt26S</b>		Protocolo A	Protocolo B	Esteves et al (156)	0.767 (prot. A)
		69/86 (80,2)	82/86 (95,3)		
	Genotipo 1	12 (17,4)	12 (14,6)	85C; 248C	0.754 (prot. B)
	Genotipo 2	16 (23,2)	20 (24,4)	85A; 248C	
	Genotipo 3	15 (21,7)	17 (20,7)	85T; 248C	
	Genotipo 4	17 (24,6)	15 (18,3)	85C; 248T	
	Genotipo 5	1 (1,5)	-	85A; 248T	
	Mezcla de genotipos:	8 (11,6)	18 (22,0)		
	Genotipos 1/4	4 (50,0)	8 (44,4)		
	Genotipos 1/3	2 (25,0)	7 (38,9)		
	Genotipos 2/5	-	1 (5,6)		
	Genotipos 2/3	-	1 (5,6)		
	Genotipos 4/5	1 (12,3)	1 (5,5)		
Genotipos 1/3/4	1 (12,2)	-			
<b>CYB</b>		80/86 (93,0)		Esteves et al (156)	0.535
	CYB 1	49 (61,3)		279C; 348A; 516C; 547C; 566C; 838C	
	CYB 2	5 (6,3)		279C; 348A; 516C; 547C; 566C; 838T	
	CYB 4	3 (3,8)		279C; 348A; 516C; 547T; 566C; 838C	
	CYB 5	1 (1,3)		279T; 348A; 516T; 547C; 566C; 838C	
	CYB 6	3 (3,8)		279C; 348A; 516T; 547C; 566C; 838C	
	CYB 7	6 (7,5)		279C; 348A; 516C; 547C; 566T; 838C	
	CYB 8	6 (7,5)		279T; 348A; 516C; 547C; 566C; 838C	
	Mezcla de genotipos:	7 (8,8)			
	CYB 1/4		1 (14,3)		
CYB 1/6		5 (71,4)			
CYB 1/2/6		1 (14,3)			
<b>SOD</b>		61/86 (70,9)		Esteves et al (156)	0.507
	SOD 1	33 (54,1)		110C; 215T	
	SOD 2	22 (36,1)		110T; 215C	
	SOD 3	1 (1,6)		110T; 215T	
	Mezcla de genotipos:	5 (8,2)			
	SOD 1/3		4 (80,0)		
SOD 2/3		1 (20,0)			

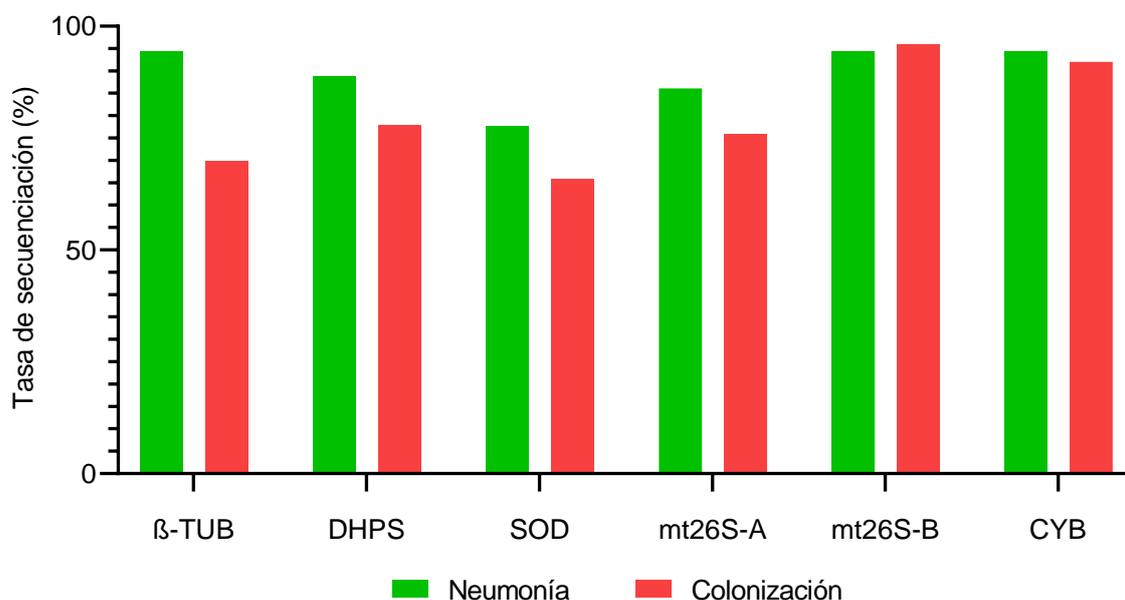
(a): nueva variante descrita; (b) solo se secuenciaron los 48 pacientes con cargas fúngicas más altas (Ct 33,0, desv. estándar 3,2)

En consonancia con lo mencionado anteriormente, los pacientes con neumonía mostraron, en general, tasas de secuenciación exitosa más altas que los pacientes colonizados para todas las dianas excepto ITS:  $\beta$ -TUB, 34 (94.4%) vs 35 (70%); DHPS 32 (88.9%) vs 39 (78%); SOD, 28 (77.8%) vs 33 (66%); mt26S-A 31 (86.1%) vs 38 (76%); mt26S-B 34 (94.4%) vs 48 (96%); CYB 34 (94.4%) vs 46 (92%). El protocolo optimizado mt26S-B ofreció resultados significativamente mejores que el protocolo convencional mt26S-A ( $p = 0.0025$ ). En el caso ITS, los intentos iniciales de amplificación se realizaron con las 48 muestras que presentaban los valores de Ct de PCR en tiempo real más bajos (33.0, SD 3.6). Dado que, tras dos intentos de amplificación, sólo se obtuvieron resultados en 18 de ellas (37.5%), y que la tasa de amplificación de este gen era significativamente peor que la del resto de dianas ( $p < 0.000$ ), se decidió suspender la amplificación de ITS en las muestras de los 38 pacientes restantes, que presentaban cargas fúngicas más bajas (Ct 37.5, SD 1.2).

**Figura 16.** Rectas de regresión lineal de la proporción de secuenciación exitosa respecto a la carga fúngica (Ct) para cada diana.



**Figura 17.** Tasas de secuenciación exitosa para cada diana segregadas por el estatus respecto a *Pneumocystis*.



**Tabla 11.** Tasas de secuenciación exitosa para cada diana en función del estatus respecto a *Pneumocystis* y del tipo de muestra analizada.

Loci	Neumonía			Colonización por <i>P. jirovecii</i>		
	Lavado oral (n=17)	LBA (n=19)	Total (n=36)	Lavado oral (n=6)	LBA (n=44)	Total (n=50)
<b>β-TUB</b>	17 (100)	17 (89.5)	34 (94.4)	5 (83.3)	30 (68.2)	35 (70)
<b>DHPS</b>	15 (88.2)	17 (89.5)	32 (88.9)	6 (100)	33 (75)	39 (78)
<b>SOD</b>	13 (76.5)	15 (78.9)	28 (77.8)	3 (50)	30 (68.2)	33 (66)
<b>ITS1-2</b>	5/15 (33.3)	3/14 (21.4)	8/29 (27.6)	1/6 (16.7)	9/13 (69.2)	10/19 (52.6)
<b>mt26S-A</b>	16 (94.1)	17 (89.5)	33 (91.7)	6 (100)	32 (72.7)	38 (86.4)
<b>mt26S-B</b>	16 (94.1)	18 (94.7)	34 (94.4)	6 (100)	42 (95.5)	48 (96)
<b>CYB</b>	16 (94.1)	18 (94.7)	34 (94.4)	6 (100)	40 (90.9)	46 (92)

#### **4.2.2. Estudio de locus individuales: variantes alélicas, capacidad discriminadora y polimorfismos mixtos**

En el conjunto de muestras estudiadas se observó un bajo número de variantes en el caso de los loci nucleares SOD y  $\beta$ -TUB (3 variantes cada uno). En lo que respecta a  $\beta$ -TUB, la variante dominante en la cohorte fue la 1, presente en el 61% de las muestras estudiadas. Pese a su escasa diversidad se debe destacar que una de las variantes de  $\beta$ -TUB identificada, la denominada  $\beta$ -TUB3v, mutación no sinónima (sustitución de valina por isoleucina), es de nueva descripción, aunque sólo se encontró presente en una de las muestras (1.4%).

Un 9.8% de las muestras en las que se amplificó con éxito SOD presentaron la variante 3, que no había sido descrita previamente en pacientes españoles, la mayoría (4/6, 66.7%) en combinación con la variante 1, dominante en la cohorte y presente en el 60.7% de las muestras. SOD fue el único locus nuclear para el que se identificó la presencia de secuencias mixtas en las muestras estudiadas, aunque con una frecuencia baja (5/61, 8.2%).

La escasez de variantes SOD y  $\beta$ -TUB, tres para cada locus, así como la agrupación de la mayoría de ellas en solo dos de los tipos identificados, justificó que sus índices H se encontrasen muy por debajo del considerado como óptimo, quedando por debajo de 0.51.

Pese a ser nuclear y presentar una tasa de éxito de amplificación baja, ITS fue el locus con el máximo número de variantes identificadas, un total de 8, entre las cuales se encontró un polimorfismo nunca antes descrito y que se denominó Jh siguiendo el esquema de nomenclatura propuesto por Lee y colaboradores (146). ITS fue el locus que, considerado de forma individual, presentó el máximo poder discriminatorio de todos los estudiados, alcanzando un índice H de 0.817. No obstante, en 11 de las 18 muestras (61.1%) en las que se consiguió amplificar este locus las variantes identificadas correspondieron solo a dos tipos, Eg y Bi.

DHPS resultó ser el locus con el poder discriminatorio más bajo, ya que sólo se identificó la presencia de secuencias *wild-type*.

Los loci mitocondriales mostraron mayor polimorfismo que los nucleares DHPS, SOD y  $\beta$ -TUB, encontrando hasta 8 variantes alélicas en el caso de CYB. Al contrario que en el caso de los nucleares, no se halló ningún polimorfismo nuevo en las muestras estudiadas. Pese a que el número de variantes alélicas de CYB fue mayor que el de mt26S, el hecho de que CYB1 fuese la variante dominante (identificada hasta en el 65.1% del total de las muestras y el 61.3% de muestras con polimorfismo CYB único) justificó que el poder discriminatorio de CYB (índice H 0.535) fuese menor que el de mt26S (índice H  $\leq 0.77$ ).

Un 8.8% de las muestras presento mezcla de polimorfismos CYB a expensas, fundamentalmente de CYB-1 y CYB-6 (6 de 7 muestras, 85.7%). En 1 paciente se llegó a detectar la presencia de hasta 3 variantes diferentes de CYB.

La optimización del protocolo de amplificación de mt26S resultó en un incremento significativo del número de muestras amplificadas con éxito sin impacto apreciable de la distribución de polimorfismos o la detección de nuevas mutaciones, pero sí en un aumento en la detección de polimorfismos mixtos: las mezclas de variantes mt26S fueron evidentes en 8/69 de las muestras amplificadas mediante el protocolo convencional (11.6%), frente a 18/82 (22%) cuando se utilizó el protocolo optimizado; este incremento en la proporción de genotipos mixtos identificados, sin embargo, no alcanzó significación estadística ( $p=0.2$ ). Las mezclas detectadas con más frecuencia fueron a expensas de las variantes mt26S-1 con mt26S-3 o mt26S-4 (en 15 de 18 muestras amplificadas con el protocolo mt26S optimizado, 83.3%). Consideradas de forma individual ninguna variante mt26S se presentó como claramente dominante en la cohorte, con una distribución aparentemente homogénea para todas ellas excepto mt26S-5, que sólo fue identificada en 2 pacientes. La presencia de una mezcla de 3 variantes en un paciente, detectada mediante el protocolo convencional, no fue confirmada tras la aplicación del protocolo de amplificación optimizado.

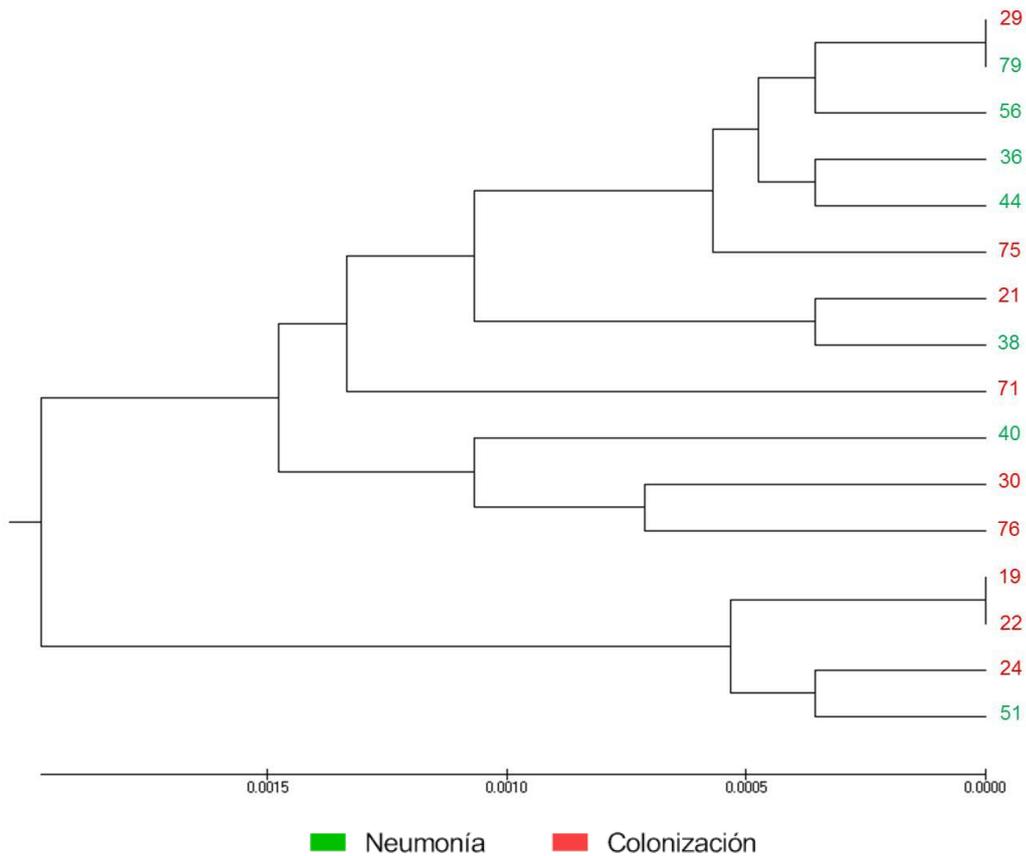
Globalmente, 30 pacientes (34.9%) mostraron genotipos mixtos en al menos un locus, y es destacable que dos pacientes presentaron mezcla de secuencia en dos loci simultáneamente (genotipos mt26s1/4 y CYB1/6; SOD1/3 y CYB1/6). Las cargas fúngicas más altas tendieron a asociarse de forma no significativa a la presencia de alelos mixtos ( $p > 0,09$ ).

#### **4.2.3. Capacidad discriminadora de diferentes combinaciones de loci**

Los dos esquemas preestablecidos de MLST y evaluados en este estudio mostraron una capacidad discriminadora adecuada para la tipificación molecular de *P. jirovecii*. Tanto el esquema 1 ( $\beta$ -TUB, DHPS, mt26S-A, ITS) como el esquema 2 optimizado (CYB, mt26S-B, SOD) mostraron valores de índice de Hunter superiores a 0.95: 0.983, en el caso del esquema 1 y 0.954 en el caso del esquema 2. El rendimiento de ambos esquemas, no obstante, presentó diferencias en cuanto a número de MLG identificados (14 mediante uso del esquema 1 y 18 con el esquema 2) y éxito de amplificación de todas las dianas del esquema, imprescindible para la asignación inequívoca de MLG (33.3% para el esquema 1 y 41.9% para el esquema 2) (figuras 18 y 19).

Se exploró la posibilidad de mejora del rendimiento del esquema 1 mediante la introducción de modificaciones. Se suprimió del esquema el locus ITS, el de peor tasa de amplificación, con lo que se aumentó el porcentaje de pacientes con amplificación completa exitosa al 58.1% ( $n=50$ ). En contrapartida, la supresión de ITS resultó en una pérdida sustancial de capacidad discriminadora, quedando rebajado el índice H a 0.87 independientemente del protocolo mt26S utilizado; asimismo, el número de MLG diferentes disminuyó de 14 a 9. La inclusión o exclusión de DHPS en el esquema, en cambio, no modificó los resultados dada la total ausencia de polimorfismos en este locus.

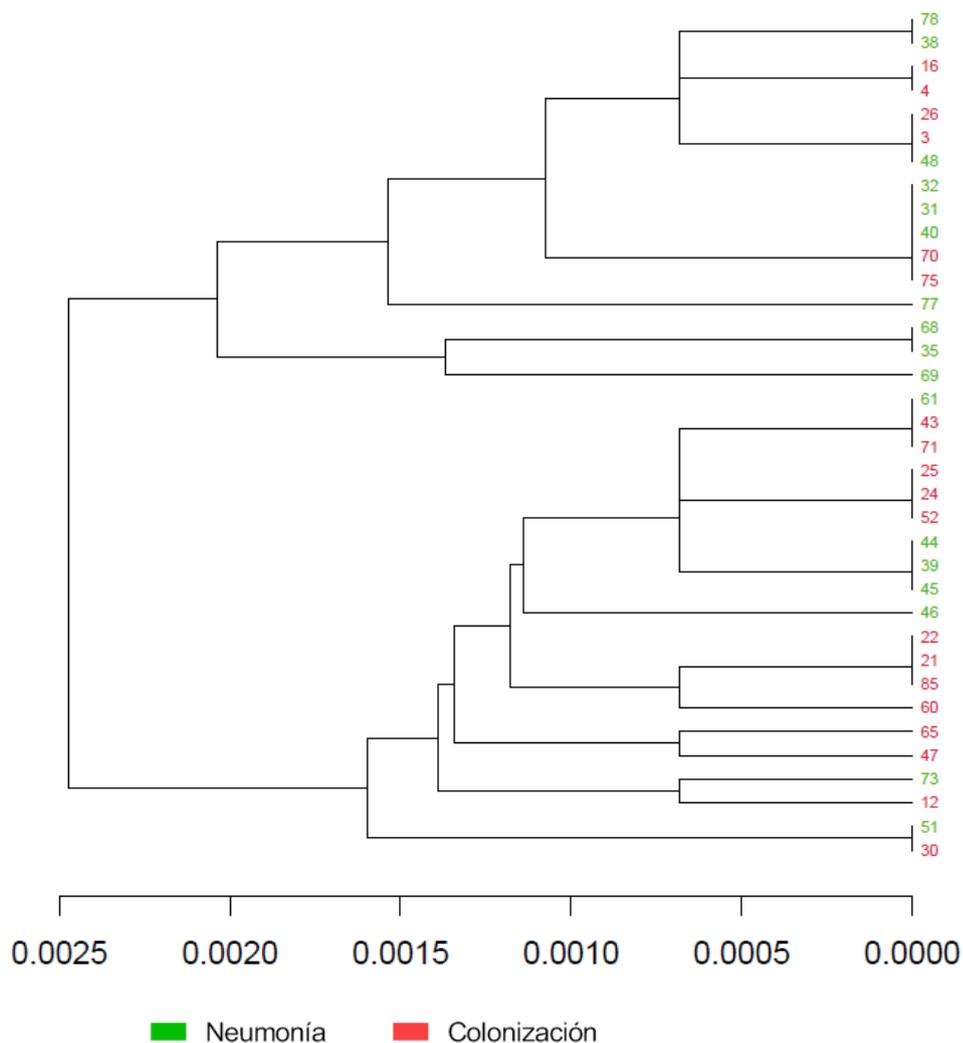
Figura 18. Dendrograma resultante del esquema MLST 1.



Los números que figuran en los extremos de las ramas corresponden a los pacientes de los que se obtuvo amplificación exitosa del esquema.

El esquema 2, por su parte, se vio parcialmente beneficiado por la modificación del protocolo de amplificación de mt26S, alcanzando un índice H por encima de lo considerado como óptimo ( $H = 0.954$  cuando se empleó el protocolo optimizado mt26S-B vs  $0.941$  cuando se aplicó el protocolo convencional). De nuevo, esta mejora se obtuvo a expensas de la reducción en el porcentaje de amplificación exitosa, que paso del 46.5% ( $n=40$  muestras con el esquema 2 convencional) al 41.9% ( $n=36$  muestras amplificadas con el esquema 2 modificado).

Figura 19. Dendrograma resultante del esquema MLST 2.

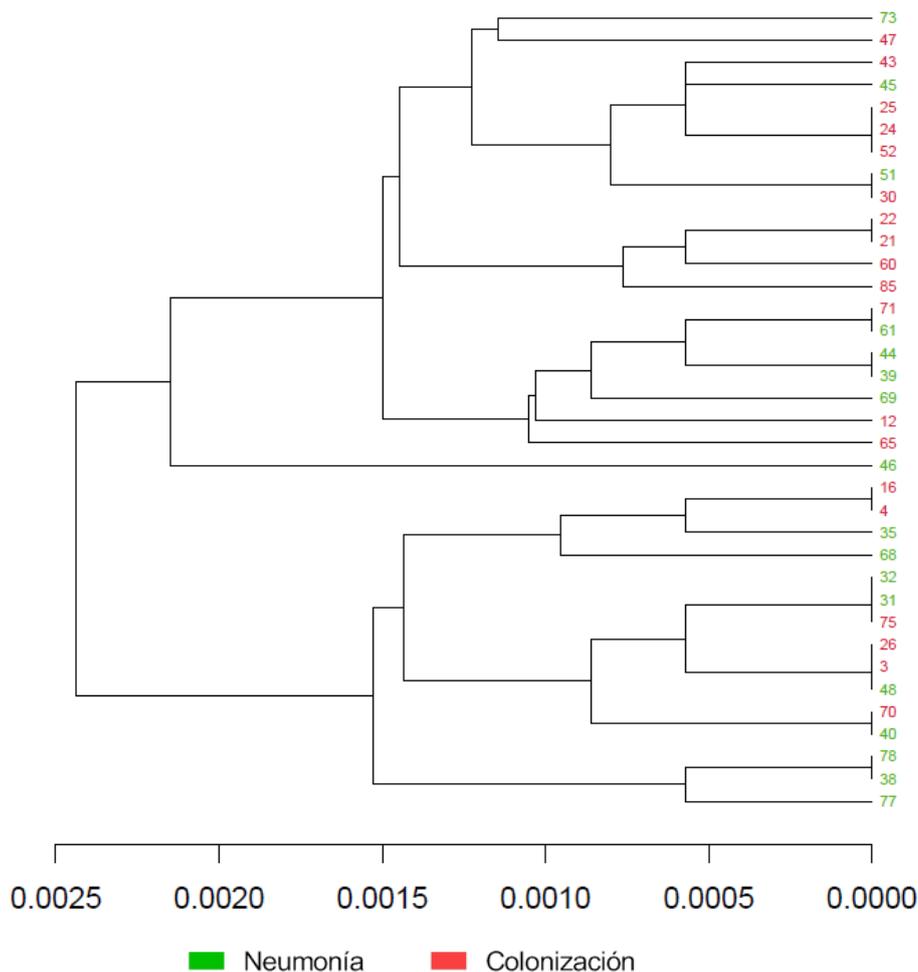


Los números que figuran en los extremos de las ramas corresponden a los pacientes de los que se obtuvo amplificación exitosa del esquema.

Con el fin de mejorar los resultados de genotipado ofrecidos por los 2 esquemas predefinidos, se analizaron combinaciones alternativas de los loci que presentaron mayores tasas de éxito de amplificación y al menos 2 variantes polimórficas. Para este análisis sólo se consideraron las muestras en las que no se detectó la presencia de alelos mixtos con el fin de evitar interpretaciones erróneas. Debido a su mayor rendimiento, en la evaluación de combinaciones alternativas solo se consideraron las secuencias obtenidas mediante el protocolo mt26S optimizado (mt26S-B). Se evaluaron 4 combinaciones alternativas denominadas, respectivamente, “esquema 3”,

“esquema 4”, “esquema 5” y “esquema 6”. Sus resultados, así como los de los dos esquemas predefinidos y sus modificaciones se encuentran resumidos en la tabla 12. De las combinaciones alternativas evaluadas, solo el esquema 3 alcanzó un poder discriminatorio categorizado como óptimo (índice H=0.975) siendo, además, el que permitía identificar el máximo número de MLG de entre todos los posibles esquemas (n=23).

Figura 20. Dendrograma resultante del esquema MLST 3.



Los números que figuran en los extremos de las ramas corresponden a los pacientes de los que se obtuvo amplificación exitosa del esquema

Con ninguna combinación de loci se consiguió asignar un MLG a más del 70% de las muestras. La tasa de éxito de los esquemas evaluados fue no significativamente superior para las muestras procedentes de los casos de neumonía (mediana 55.6%, rango: 50-69.4%) que para los de colonización (mediana 47.4%, rango: 36-64%).

**Tabla 12.** Rendimiento de los esquemas 1 y 2 para el tipado de *Pneumocystis jirovecii* en el estudio 2, así como de otras combinaciones de loci que mostraron los mejores rendimientos para el genotipado.

Esquema MLST	Loci	Número de pacientes con secuencias leibles (%)			Número de pacientes para el análisis del rendimiento del esquema MLST (%) (pacientes sin secuencias mixtas)			N. de MLG	Índice H
		Total	Neumonía	Colonización	Total	Neumonía	Colonización		
1	β-TUB, DHPS, mt26S-A, ITS	17/48 (35.4)	8/29 (27.6)	9/19 (47.4)	16/48 (33.3)	7/29 (24.1)	9/19 (47.4)	14	0.983
		57 (66.3)	28 (77.8)	29 (58.0)	50 (51.1)	23 (63.9)	27 (54.0)	9	0.871
	Variaciones esquema 1	63 (73.3)	31 (86.1)	32 (64.0)	50 (51.1)	23 (63.9)	27 (54.0)	9	0.874
		62 (72.1)	30 (83.3)	32 (64.0)	54 (62.8)	25 (69.4)	29 (58.0)	9	0.871
		68 (79.1)	33 (91.7)	35 (70.0)	53 (61.6)	27 (75.0)	26 (52.0)	9	0.867
2	Convencional	54 (62.8)	25 (69.4)	29 (58.0)	40 (46.5)	18 (50.0)	22 (44.0)	18	0.941
	Optimizado	56 (65.1)	26 (72.2)	30 (60.0)	36 (41.9)	18 (50.0)	18 (36.0)	18	0.954
3	CYB, mt26S-B, SOD, β-TUB	54 (62.8)	26 (72.2)	28 (56.0)	36 (41.9)	18 (50.0)	18 (36.0)	23	0.975
4	CYB, mt26S-B, β-TUB	65 (75.6)	32 (88.9)	34 (68.0)	48 (55.8)	24 (66.7)	24 (48.0)	21	0.939
5	mt26S-B, SOD, β-TUB	58 (67.4)	27 (75.0)	31 (62.0)	39 (45.3)	20 (55.6)	19 (38.0)	13	0.928
6	CYB, mt26S-B	78 (90.7)	34 (94.4)	46 (92.0)	57 (66.3)	25 (69.4)	32 (64.0)	18	0.905

#### **4.2.4. Variantes genéticas de *P. jirovecii*, rasgos clínicos e identificación de posibles agrupaciones de casos**

No se halló ninguna asociación significativa y consistente entre las variantes alélicas de los diferentes loci ni ninguno de los MLG de los diferentes esquemas con ninguna de las variables clínicas o demográficas recogidas en el estudio. La posible asociación entre alelos mixtos de mt26S y terapias biológicas encontrada con el protocolo convencional ( $p=0.004$ ) no se confirmó cuando de se reanalizaron los datos tras aplicar el protocolo optimizado ( $p > 0.05$ ).

La aplicación a la cohorte del esquema 3, que es el que combinaba el mejor poder discriminatorio y el máximo número de MLGs diferentes. Aunque el número de pacientes con asignación de MLG de este esquema fue limitado, se observó gran diversidad, sin detectar ningún MLG predominante en tiempo y espacio. Algunos de los MLG detectados (mlg.. mlg...) solo agruparon pacientes colonizados mientras que otros MLG (...) solo agruparon neumonías, siendo poco semejantes estos MLG entre sí.

Veintisiete de los 36 pacientes agruparon en 11 clusters aparentes. Clínica y epidemiológicamente no se había apreciado la existencia de ningún brote infeccioso por *P. jirovecii* durante el periodo estudiado. Los pacientes de ocho de las agrupaciones de MLG, carecían de relación temporal por lo que se desestimó la posibilidad de que formara parte de un brote. Tres parejas de casos que se presentaron próximas en el tiempo (tabla 13). Los datos epidemiológicos solo apoyaron una posible transmisión cruzada entre los pacientes de la agrupación 1, correspondiente a dos pacientes colonizados por *P. jirovecii* que fueron hospitalizados en la UCI al mismo tiempo, pudiendo haber coincidido también en la misma sala de radiología.

**Tabla 13.** Características principales de los pacientes con potenciales conexiones espacio-temporales que se agruparon en los mismos MLG (*multilocus genotypes*).

Cluster	Número de paciente	Género/	Edad	Patología de base	Fecha de recogida de la muestra	Servicio	MLG (esquema 3)	Estatus respecto a <i>Pneumocystis</i>
1	21	Mujer	49	VIH y VHC	23-01-2015	Unidad de Cuidados Intensivos	mt26S genotipo2 - CYB7 - SOD1 - BTUB1	Colonización
	22	Mujer	20	Trasplante pulmonar	26-01-2015	Unidad de Cuidados Intensivos		Colonización
2	24	Hombre	53	Trasplante pulmonar	29-01-2015	Unidad de Cuidados Intensivos	mt26S genotipo1 - CYB1 - SOD1 - BTUB1	Colonización
	25	Mujer	38	Esclerodermia difusa	30-01-2015	Neumología		Colonización
3	31	Hombre	78	Trasplante hepático	30-03-2016	Medicina interna	mt26S genotipo4 - CYB1 - SOD2 - BTUB1	Neumonía
	32	Hombre	55	Neoplasia pulmonar	04-04-2016	Unidad de Cuidados Intensivos		Neumonía



# DISCUSIÓN



## 5. Discusión

### 5.1. Estudio 1: Optimización del diagnóstico microbiológico de la infección por *Pneumocystis jirovecii*

En el estudio 1 se evaluó la utilidad y rendimiento de dos técnicas de PCR a tiempo real, basadas en la detección de dianas presentes en distinto número de copias por genoma, así como la aplicabilidad de estas dianas tanto a muestras invasivas (LBA) como no invasivas (lavados orales) para el diagnóstico de la neumonía por *P. jirovecii*, en una cohorte de pacientes inmunodeprimidos en la que predominaban los pacientes VIH-negativos (88.6%).

Las dos dianas genéticas elegidas para su evaluación difieren en cuanto a su número de copias: mientras que el gen nuclear DHPS está presente en 1 copia/genoma, mtSSU rRNA presenta de media 37 copias/genoma con escasa variabilidad entre cepas y estados metabólicos, a diferencia de lo que sucede con otros genes mitocondriales (108,112). La selección de dianas con número de copias estable es, probablemente, la causa del rendimiento similar de ambas PCR en los dos tipos de muestras estudiados y facilitó la aplicación de la cuantificación mediante Cts de la carga fúngica en las diferentes situaciones contempladas en el estudio. El uso de Ct como unidad de valor cuantitativo en lugar del número de copias pudo haber contribuido a mejorar la diferenciación entre los distintos grupos estudiados ya que transforma los datos a una escala logarítmica, atenuando su variabilidad y normalizándolos. Esta transformación, por otra parte, puede haber sido la razón de que no se apreciaran diferencias en la reducción de carga en los dos primeros días tras el inicio de la terapia activa frente a *P. jirovecii* como sí han comunicado otros autores cuando efectúan la cuantificación en número de copias (113).

### **5.1.1. Rendimiento diagnóstico de DHPS y mtSSU rRNA aplicadas a muestras de lavado broncoalveolar**

En el caso de las muestras de LBA, los resultados obtenidos fueron comparables con los datos de estudios previos, pese a la diversidad de dianas empleadas por otros grupos en la detección de *P. jirovecii* (103,104,106,113). La escasa superposición de valores de Ct entre pacientes infectados y colonizados permitió establecer puntos de corte que ayudasen a diferenciar estas dos situaciones, quedando fijados en 36.8 y 30.9 para DHPS y mtSSU. Históricamente, ha sido difícil establecer un punto de corte cuantitativo debido al grado variable de superposición en el rango de los valores de carga fúngica de pacientes colonizados e infectados (103), lo que ha dificultado la interpretación de los resultados de PCR (figura 12). La selección cuidadosa de dianas y la validación de la técnica en el laboratorio, sin embargo, aumenta su fiabilidad diagnóstica, abriendo un camino a la generalización de su introducción en los laboratorios de rutina asistencial. En el caso de las dianas estudiadas, la ausencia de diferencias estadísticamente significativas en las AUC calculadas para DHPS y mtSSU muestra que la precisión diagnóstica de ambos genes es comparable para el diagnóstico microbiológico de la neumonía por *P. jirovecii* cuando se aplica a muestras de LBA y, aunque de acuerdo con la experiencia previa de Fauchier y colaboradores (103) y Louis y colaboradores (89), el rendimiento de ambas PCR disminuyó cuando se excluyó del análisis a los pacientes VIH, manteniéndose el AUC en el análisis ROC por encima de 0.9, lo que sustenta su buen rendimiento diagnóstico en las muestras del tracto respiratorio inferior.

### **5.1.2. Rendimiento diagnóstico de DHPS y mtSSU rRNA aplicadas a muestras de lavado oral**

En lo que respecta a la aplicabilidad de las técnicas moleculares a muestras de tracto respiratorio superior y obtenidas de forma no invasiva, existen pocos estudios

dedicados a su evaluación y centrados en pacientes inmunocomprometidos VIH-negativos. Los resultados del estudio 1 apoyan su utilidad y están en la línea de lo reportado en los escasos trabajos publicados hasta la fecha sobre el tema (107,186–190). To y colaboradores (186), obtuvieron valores de rendimiento diagnóstico para neumonía por *Pneumocystis* similares a los del estudio 1 de la presente tesis doctoral aplicando una PCR a tiempo real con diana en mtLSU rRNA a muestras nasofaríngeas obtenidas de pacientes inmunocomprometidos con y sin infección por VIH. Juliano y colaboradores, por su parte, estudiaron el rendimiento para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis* de dos técnicas de PCR dirigidas, respectivamente, contra un gen nuclear de copia sencilla (DHPS) y uno de copia múltiple (MGS) y aplicadas a muestras de lavado oral en una cohorte de pacientes VIH positivos (189). Considerando cada técnica por separado, los autores obtienen rendimientos inferiores (sensibilidad >80%, y especificidad <70%); mientras que la pérdida de especificidad sería justificable por la mayor carga fúngica presente en los pacientes VIH positivos, incluso en situaciones de colonización, lo que hace más difícil categorizar los episodios, la pérdida de sensibilidad podría estar relacionada con factores técnicos no especificados por los autores. El estudio del grupo de Juliano contrasta, además, con el aquí presentado en que sólo mejoran el rendimiento cuando se combina el uso de ambas técnicas (sensibilidad del 100% y especificidad del 74%), mientras que, en el nuestro, los casos de neumonía se identificaron con una precisión >90% independientemente del gen utilizado, lo que permite simplificar el diagnóstico. En nuestro estudio, además, la simplificación se encontró reforzada por la aplicación de criterios de interpretación cualitativos (positivo/negativo) con una precisión del 91.7% para el diagnóstico de casos de neumonía, obviando, por tanto, la necesidad de cuantificar la carga, tal y como sucedía con las muestras de LBA. Asimismo, es destacable que el rendimiento de los lavados orales para el diagnóstico de los casos de neumonía no se vio influido por el estatus de infección por VIH, aunque el número

de pacientes incluidos fue escaso y este punto deberá ser corroborado por una validación en cohortes más extensas.

En lo que respecta a la identificación de casos de colonización en la cohorte estudiada, la aplicación de las técnicas moleculares a muestras de lavado oral fue poco eficaz, no siendo capaz de detectar más que a 3 de los 8 pacientes portadores (37.5%). Contrariamente a lo previamente descrito (98), la utilización de una diana con múltiples copias por genoma no aumentó la sensibilidad de la PCR en los lavados orales en comparación con la diana de copia simple (DHPS), por lo que el mtSSU no aportó ninguna ventaja adicional en la detección de pacientes colonizados. Así pues, la aplicación de las técnicas moleculares estudiadas a muestras de lavado oral permitiría, por su elevado valor predictivo negativo (100%), descartar con total fiabilidad la posibilidad de neumonía, pero no serviría para identificar a pacientes portadores con riesgo potencial para desarrollar neumonía posteriormente.

El estudio 1 presenta algunas limitaciones. Al tratarse de un estudio unicéntrico, se necesitaría una evaluación más extensa para poder extrapolar los resultados a otros centros que atiendan poblaciones variadas en lo que respecta a su riesgo de desarrollar neumonía por *Pneumocystis*. Aunque se incluyó un número limitado de pacientes, sus características basales eran bien conocidas y todos ellos presentaban factores de riesgo que les hacía susceptibles de presentar neumonía por este hongo. Algunos de los pacientes recibieron tratamiento frente a *Pneumocystis* antes de la toma de muestra, pero su duración fue inferior a 48 horas, suponiendo poco impacto en los valores de Ct de las PCR utilizadas.

En resumen, en el presente estudio se comparó el rendimiento de dos técnicas de PCR en tiempo real con dianas presentes en copia sencilla y múltiple y su aplicabilidad a muestras obtenidas de forma invasiva (LBA) y no invasiva (lavado oral) con el fin de evaluar su rendimiento diagnóstico en una población inmunodeprimida predominantemente VIH-negativa. Los resultados sugieren que el uso de una técnica de PCR con diana genética en número estable de copias, es útil en ambos tipos de

muestras para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis*. En el caso de las muestras de lavado oral, la interpretación cualitativa de los resultados ayuda a simplificar el diagnóstico microbiológico de la neumonía en la práctica clínica diaria: la sencillez del método de obtención de la muestra, junto a la elevada sensibilidad y valor predictivo negativo de la técnica para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis*, hacen que pueda utilizarse como un temprano primer paso en el algoritmo diagnóstico. La selección de dianas con número constante de copias facilitó el establecimiento de puntos de corte aplicables únicamente a muestras de LBA y que pueden ser de ayuda a la hora de diferenciar entre casos de colonización y de neumonía en pacientes que presentan con insuficiencia respiratoria aguda y riesgo de neumocistosis. El uso de muestras de lavado oral, aunque permite adelantar el diagnóstico, no evitaría, en cualquier caso, la necesidad de realizar una broncoscopia para la obtención del LBA para el estudio de otras patologías concomitantes, así como para la detección de pacientes colonizados por *P. jirovecii*, lo que podría suponer un riesgo de desarrollar en otro momento un cuadro de neumonía por este hongo.

## **5.2. Estudio 2: Genotipado y epidemiología basada en técnicas moleculares**

La variabilidad genética de *P. jirovecii* es, probablemente, muy amplia. En base a la comparación de genomas completos, se ha estimado la presencia de SNP en 1 de cada 337 pares de bases (26). Aunque la secuenciación de genomas completos es, potencialmente, la herramienta de estudio de variabilidad genética más poderosa conocida actualmente, representa un enfoque escasamente viable para el estudio de grandes colecciones de muestras positivas para *Pneumocystis* con fines epidemiológicos, especialmente si se habla de su aplicación en laboratorios clínicos. Las técnicas MLST mediante secuenciación Sanger, más sencillas, representan una alternativa de tipado molecular útil, más accesible y asequible. La aplicabilidad del

tipado mediante MLST, no obstante, también está sujeta a limitaciones: no existe un esquema MLST consensuado y la falta de un método de propagación *in vitro* de *P. jirovecii* obliga a los investigadores a aplicar estas técnicas directamente sobre las muestras clínicas. Una consecuencia directa de esto último es que la cantidad de formas de *Pneumocystis* presentes en las muestras puede limitar el rendimiento de la técnica de genotipado. Aunque no hay información publicada relacionada con *P. jirovecii*, a medida que la carga fúngica disminuye serían esperables tasas de secuenciación exitosa más bajas, especialmente para las dianas de copia única. En este sentido, lograr un equilibrio adecuado entre la capacidad de obtener la variabilidad genética y el éxito de la amplificación de todos los loci incluidos en un esquema MLST se vuelve de crucial importancia.

En el estudio 2 de la presente tesis doctoral se utilizó una colección de muestras positivas para *P. jirovecii* con un amplio rango de cargas fúngicas para evaluar, en primer lugar, el efecto de la carga fúngica en la tasa de amplificación de 6 loci habitualmente incluidos en esquemas MLST y, posteriormente, comparar el rendimiento para el estudio epidemiológico de dos esquemas convencionales de MLST que combinan el uso de parte de estos loci. Asimismo, se exploró la posibilidad de mejora del rendimiento de los esquemas MLST basada en combinaciones alternativas de dichos loci y se describió tanto la variabilidad genética de *P. jirovecii* en la colección de muestras estudiada como su relación con las características clínicas de los pacientes.

### **5.2.1. Tasas de amplificación y relación con la carga fúngica**

Los resultados obtenidos mostraron heterogeneidad en cuanto a tasa de amplificación y diversidad alélica de los loci, lo que puede influir en el rendimiento de los esquemas MLST que los incluyan.

La tasa de secuenciación exitosa fue menor para los loci nucleares (de copia única) que para los mitocondriales (de copia múltiple), y también fue menor para las muestras procedentes de casos de colonización que para las de casos de neumonía, apoyando

la idea de la influencia de la cantidad de hongo presente en la muestra sobre el rendimiento del tipado mediante técnicas moleculares.

Aunque fue el único locus para el que se utilizó un protocolo de PCR anidada, ITS presentó una tasa de amplificación notablemente baja (37.5%). Estudios previos han mostrado tasas de éxito heterogéneas que oscilan del 0 al 63% en cohortes que incluían un 36-100% de pacientes VIH negativos (160,165,172,191). Las razones que subyacen a la impredecibilidad de amplificación de este locus no están claras. Más que con la cantidad de microorganismo, podrían estar relacionadas con la presencia de secuencias poliA y poliT en los extremos de la región de interés, lo que puede generar errores de transcripción.

A diferencia de ITS, y a pesar de estar presentes en 1 copia/genoma, los fallos de secuenciación en DHPS se produjeron en sólo 17.4% de las muestras, tasa inferior a la reportada por el grupo de Calderón, en los que el fracaso osciló entre el 26,7% en sujetos VIH positivos con neumonía y el 68.6% en pacientes colonizados con patología pulmonar crónica (131). Aunque no se puede afirmar con certeza por la ausencia de datos cuantitativos, la carga fúngica podría haber influido en esta pérdida de rendimiento.

SOD dio lugar a tasas de secuenciación satisfactorias (70.9%), comparables a las descritas por Esteves y colaboradores en pacientes VIH positivos (156) y sustancialmente superiores a las de otros grupos (29,4 a 50 %) que secuenciaron SOD en pacientes VIH negativos (174,192). Asimismo, se obtuvo una tasa de éxito inesperadamente alta para  $\beta$ -TUB (80.2%), que contrastó con el bajo rendimiento (49%) previamente reportado en cohortes de pacientes VIH (156). En la mejora del rendimiento de amplificación, podría haber influido el reajuste de temperaturas y tiempos de alineación y elongación de los protocolo de PCR de amplificación, mejorando su aplicabilidad para muestras de cargas fúngicas bajas.

Los genes del ADN mitocondrial, por su parte, suelen presentar múltiples copias lo que repercutiría, al menos teóricamente, en un mejor rendimiento en la secuenciación.

Consecuentemente, las tasas de éxito de las dianas mitocondriales fueron las más altas (80.2-95.3%) de todos los loci estudiados. En contra de lo observado con los loci nucleares y de acuerdo con los resultados de otros grupos (156,192), la carga fúngica tuvo poca influencia en la obtención de secuencias analizables. La aplicación de un nuevo protocolo de amplificación del mt26S permitió mejorar aún más su rendimiento, pudiendo genotipar un 8,3% más de neumonías y un 20% más de muestras de colonizaciones. Aunque estas diferencias no fueron significativas, enfatizan aún más la importancia de la optimización de los protocolos para mejorar el rendimiento del genotipado de *Pneumocystis*.

### **5.2.2. Estudio de locus individuales: variantes alélicas, capacidad discriminatoria y polimorfismos mixtos**

El número de variantes alélicas y su distribución en la cohorte fue muy variable dependiendo del locus estudiado. Ningún locus individual logró alcanzar un índice H de 0.95, umbral considerado crítico para ser aceptada su capacidad para identificar la diversidad genética de forma fiable, oscilando los resultados del estudio 2 entre 0 para DHPS y 0.817 para ITS. No se observó ninguna ventaja evidente de los loci mitocondriales (rango de índice H 0.535-0.767) sobre los nucleares (rango de índice H 0-0.817), a pesar de que el número de variantes detectadas fue, en general, mayor para los primeros.

Con excepción de ITS, que fue el que presentó mayor variación, el número de variantes para los loci nucleares fue muy bajo y quedó limitado a cambios en un máximo de 3 SNP con respecto a la secuencia patrón. De las 5 variantes descritas de  $\beta$ -TUB, la 1 y la 3 son las dominantes en todos los estudios y esta observación fue replicada en el estudio 2 de esta tesis. No se detectó, en cambio, la presencia de las variantes 4 (159) o 5 (156), descritas como minoritarias, pero sí que fue posible identificar un nuevo polimorfismo que parece derivado de la variante 3, consistente en

la sustitución de una guanidina por una adenina en la posición 87, lo que originaría una mutación no sinónima cuyo significado actualmente se desconoce. La variabilidad de  $\beta$ -TUB, por tanto, podría ser mayor de lo descrito.

En cuanto a SOD, se detectaron las variantes SOD1, SOD2 y SOD3, que son las más frecuentes de las cinco previamente descritas (182,192). Con respecto a lo previamente descrito en España, la variante SOD2, que sólo se había descrito en pacientes con neumonía por *P. jirovecii* (174), fue detectada tanto en casos de colonización como de neumonía y el alelo SOD3, que no había sido reportado anteriormente en nuestro país, fue identificado en el 9.8% de las muestras, aunque curiosamente, en el 83,3% de ellas se encontró mezclada con otra variante. La aparición *de novo* de SOD3 en pacientes españoles y su presencia como variante no dominante y en poblaciones mixtas podría indicar de forma no excluyente alguna de las siguientes posibilidades: (1) que se trate de una introducción que podría haberse producido recientemente, (2) que sea una variante de circulación exclusivamente local o (3) que al estar presente preferentemente en genotipos mixtos pueda haber sido pasada por alto en estudios previos. De nuevo, este hallazgo debería ser explorado en mayor profundidad en estudios de cohorte que abarcasen áreas geográficas más extensas y/o mediante la revisión de colecciones históricas de muestras.

A pesar del reducido número de muestras en las que se obtuvieron secuencias válidas, ITS fue el locus más polimórfico. Se observó un predominio de las variantes Eg (39%) seguido de las Bi (22.2%), de acuerdo con lo previamente publicado (146,149,152,165,193). La distribución de ITS en nuestro país solo se ha documentado en un trabajo cuyos hallazgos están en la misma línea de los nuestros (160). Se identificó un nuevo alelo denominado Jh, pero cabe destacar que los polimorfismos de ITS se atribuyen variaciones los extremos (146), que pueden ser verdaderos o atribuibles a errores técnicos (122). Si a ello añadimos la impredecibilidad de su amplificación, ITS aparece como una diana que, al contrario

que los loci nucleares anteriormente mencionados y pesar a aportar la máxima diversidad, parece poco adecuada para uso con fines de genotipado.

Otro hallazgo remarcable del estudio 2 es la ausencia de polimorfismos DHPS en la cohorte. Estos resultados sugieren que las mutaciones en este gen podrían estar ausentes o, al menos, ser excepcionales en nuestro entorno actualmente y contrastan con datos obtenidos de pacientes españoles en años previos, que indicaban la presencia de mutaciones en los codones 55 y/o 57 en el 22-35.5% de las muestras (131,160). Las mutaciones en DHPS fueron ampliamente descritas desde los primeros estudios publicados en los años 90, con una prevalencia variable directamente relacionada con la presión de sulfamidas en determinadas áreas geográficas (194,195). El predominio absoluto de la DHPS *wild-type* indicaría que pese al uso de cotrimoxazol en los pacientes de riesgo atendidos en nuestro centro, la presión ejercida no es suficiente como para provocar la selección de mutantes y concordaría con la observación clínica de ausencia de fracasos del tratamiento o la profilaxis. La homogeneidad en las secuencias de este locus no fue atribuible a un sesgo de selección: la presencia/ausencia de *P. jirovecii* se confirmó con una técnica diagnóstica dirigida a una región de 78 pb de DHPS que no está incluida en la región sometida a genotipado. Aunque la falta de variabilidad puede sugerir que la inclusión de DHPS en esquemas MLST podría no tener una utilidad universal, su secuenciado retiene un indudable valor en la evaluación de la actividad de las sulfamidas cuando se sospeche un fracaso del tratamiento basado en este tipo de fármacos o en poblaciones sujetas a altos niveles de presión a expensas de estas drogas (161).

Comparado con el nuclear, el ADN mitocondrial está expuesto a ciclos de replicación más intensos y a un mayor estrés oxidativo. Esto, sumado a una maquinaria de reparación menos eficiente, hace esperable una mayor frecuencia de mutaciones puntuales (196) lo que se traduce en un mayor número de variantes alélicas. En el estudio 2 se identificaron hasta cinco genotipos mt26S diferentes, de los que el 1 sería el dominante (presente en el 32.9% de las muestras) de acuerdo con estudios previos

en España y Portugal (131,156,160) pero, a diferencia de lo previamente descrito, circularía en más de la mitad de los casos mezclado con otros genotipos prevalentes y presentes en más de la quinta parte de los pacientes de nuestro medio, como el mt26S3 y el mt26S4. Si se consideran los alelos no mixtos exclusivamente, el más prevalente sería, en cambio mt26S2, como se ha descrito en trabajos publicados sobre pacientes en Cuba, Italia y Polonia (130,155,192). No queda claro a partir de los datos del estudio 2 si los genotipos mt26S que tienden a circular de forma individual indicarían que las cepas portadoras serían más patógenas que las que albergan genotipos también prevalentes pero de tendencia a aparecer como mixtos.

Los datos obtenidos del secuenciado de CYB también concuerdan con lo previamente reportado, con predominio absoluto de CYB1 (70 %) entre los siete detectados en nuestro estudio (156,175,192), lo que podría indicar que CYB1 es la variante predominante universal. Los restantes alelos se detectaron en proporciones similares a las descritas en publicaciones anteriores y como variantes minoritarias (1.3-7.5 %) (156,175,192). Como datos novedosos hay que resaltar el 12.5% de casos en los que CYB1 está presente en mezcla con otros alelos, particularmente CYB6 que pasaría a ser el segundo más frecuente en la población estudiada (10%), y la frecuencia relativamente alta en la que se identificó el alelo CYB8. Este último fue descrito por primera vez en 2013 por Maitte y colaboradores (182) y no había sido reportado en España lo que apuntaría, de nuevo, a un posible dinamismo en las variantes genéticas circulantes en nuestro entorno.

Más allá de lo anteriormente comentado, las limitaciones propias de la técnica Sanger pudieron restringir la detección de mezclas de variantes en loci individuales. Éstas solo se hacen evidentes cuando representan al menos el 20% del ADN objeto de secuenciación, por lo que pasarían inadvertidas cuando se hallasen en menor cantidad. Aun así, los resultados del estudio 2 indicarían la posibilidad de la presencia de más de una cepa de *P. jirovecii* en una proporción relativamente alta de pacientes. Se identificaron mezclas de polimorfismos SOD en el 8,2% de los pacientes sin

asociación con casos de neumonía y colonización. En lo que respecta a las dianas mitocondriales, se observó la presencia de genotipos mixtos hasta en el 22% de las muestras, aunque el dato debe interpretarse con cautela, ya que pueden corresponder tanto a cepas diferentes como a fenómenos de heteroplasmia mitocondrial (196). Contrariamente a las observaciones de Alanio y colaboradores (144) no se encontró ninguna asociación entre la carga fúngica y la presencia de alelos mitocondriales mixtos.

### **5.2.3. Capacidad discriminatoria de diferentes combinaciones de loci**

Al no existir la posibilidad de simplificar el estudio de la diversidad genética en *P. jirovecii* mediante el secuenciado de un solo locus se hizo evidente la necesidad de utilizar una estrategia de tipado, optando por las ventajas prácticas que aporta el MLST y que han sido comentadas anteriormente (182).

Se observaron diferencias sustanciales en el rendimiento de los diferentes esquemas MLST evaluados. El esquema 1 presentó el mejor poder discriminatorio (índice de Hunter 0.983) pese a incluir sólo secuencias DHPS *wild-type* que no aportaron diversidad, pero se vio seriamente lastrado por la baja capacidad de amplificación de ITS. Las limitaciones de uso de este esquema han sido escasamente reflejadas en la literatura, pero problemas referidos a la no amplificación de alguno de los loci similares a los descritos en el estudio 2 han sido descritos por Depypere y colaboradores (172), poniendo en entredicho la aplicabilidad general de este esquema.

El esquema 2, sorprendentemente, sólo alcanzó un índice H superior a 0.95 cuando se utilizó el protocolo de amplificación mt26S optimizado, lo que contrasta con lo previamente descrito por Maitte y colaboradores (182), posteriormente reproducido por Desoubeaux et al (197) y por Vindrios et al (176) en receptores de trasplante de órgano sólido. La no replicabilidad de su capacidad discriminatoria puede ser un indicador de la necesidad de validar la propuesta de esquemas MLST en poblaciones extensas y que reflejen el máximo de variabilidad de situaciones clínicas, de manera

que se compruebe que su rendimiento es similar en todas ellas y permita comparaciones.

De entre todas las posibles combinaciones alternativas de 2, 3 o 4 loci evaluadas la que conforma el esquema 3 fue la única que mejoró los resultados de los esquemas 1 y 2, combinando la capacidad de detectar el máximo número de genotipos, un índice de Hunter óptimo ( $H=0.975$ ) y la aplicabilidad a muestras con cargas fúngicas relativamente bajas. Aunque queda por realizar una validación más extensa, su potencial aplicabilidad a muestras de procedencia diversa ha quedado reflejada en <http://mlst.mycologylab.org/page/PJ%20Primers%20Pasic%202020> como fruto de la colaboración entre el Molecular Mycology Research Laboratory, Sydney Medical School - Westmead Hospital, University of Sydney, Sydney, Australia, el Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile y nuestro propio grupo.

#### **5.2.4. Variantes genéticas de *P. jirovecii*, rasgos clínicos e identificación de posibles agrupaciones de casos**

##### **5.2.4.1. Loci individuales**

No se identificaron asociaciones significativas entre variantes alélicas en loci individuales y rasgos clínicos. La asociación entre SNP y marcadores clínicos defendida por el grupo de Matos (145) ha sido objeto de discusión. Los intentos de replicación en otras poblaciones han generado resultados discrepantes (155,198), probablemente debido al uso de SNP individuales de los primeros frente al abordaje basado en un análisis de variantes alélicas completas similar al realizado en la presente tesis doctoral. Dada la potencial importancia de identificar variantes que actúen como marcadores de gravedad o de riesgo de infección, este aspecto merece ser objeto de estudios más extensos. Asimismo, queda por dilucidar el significado clínico de la presencia de las mezclas alélicas, un punto intrigante y poco explorado.

Debido al limitado número de casos disponible en el estudio 2 no se pudo determinar hasta qué punto la presencia simultánea de múltiples variantes pudo contribuir a un mayor riesgo de infección, mayor gravedad o peor evolución, así como la proporción crítica de cada genotipo involucrado en el proceso patológico.

#### **5.2.4.2. Esquemas MLST**

Las principales aplicaciones de los esquemas MLST son la monitorización de genotipos circulantes y el trazado de brotes nosocomiales de neumocistosis.

Con respecto a la monitorización de MLG circulantes, el diferente rendimiento de los esquemas MLST evaluados tuvo su reflejo tanto en el número de secuenciotipos identificados como en su prevalencia. Así, el esquema 3, el de mayor poder discriminatorio, permitió observar una gran variedad de MLG sin predominio ni persistencia en el tiempo de ninguno de ellos. La aplicación de los esquemas con menor variedad de secuenciotipos hubiese llevado a la falsa conclusión de la alta endemicidad de algunos secuenciotipos. De la misma manera, el uso de esquemas con bajo poder discriminatorio habría conducido a establecer una falsa asociación entre variantes genéticas y ciertos rasgos clínicos. Así, la asociación entre los genotipos [mt26S genotipo1-SOD1-BTUB1], [mt26S genotipo1-SOD2-BTUB1] y [mt26S genotipo2-SOD1-BTUB1] y el uso previo de profilaxis frente a *Pneumocystis* alcanzó significación estadística con el uso del esquema 5, pero no se conservó con el uso los esquemas de mayor poder discriminatorio.

Aunque la ausencia de un esquema consenso hace que resulte extremadamente difícil comparar los resultados obtenidos con lo previamente descrito, los escasos estudios que han utilizado con éxito esquemas de al menos 3 loci, describen la circulación simultánea de múltiples MLG (167,170,171,192). En ellos y en la línea de lo observado en el estudio 2, la elevada diversidad y la ausencia de relación con los rasgos clínicos parece indicar que hasta ahora ninguno de los MLG circulantes sería potencialmente más virulento o presentaría alguna ventaja selectiva sobre los demás. La

monitorización periódica y estandarizada, no obstante, permitiría identificar la emergencia de genotipos dominantes, con mayor riesgo de transmisibilidad o con mayor capacidad infectiva.

Las técnicas de tipado MLST también se han utilizado en el trazado de brotes nosocomiales de neumocistosis (102). Aunque se ha descrito que pueden afectar a pacientes con una alta variedad de condiciones inmunosupresoras de base, se ha apuntado la posibilidad de que sean los receptores de trasplante renal los que presentan mayor riesgo (102,140). De nuevo, la falta de consenso en la técnica de tipado utilizada impide determinar si algún MLG en concreto tiende a estar más relacionado con este tipo de eventos. No obstante, es destacable la implicación del mismo MLG (mt26S4 - CYB2 - SOD1) en dos brotes nosocomiales independientes descritos en Francia (176,197). La aplicación de un esquema MLST altamente discriminatorio permitió documentar la ausencia de grandes eventos de transmisión nosocomial en nuestro centro, ratificando la impresión clínica durante el periodo estudiado. El esquema MLST sirvió de complemento a la vigilancia epidemiológica, y puede ser de ayuda para la monitorización y caracterización de los casos detectados en cortos periodos de tiempo en una misma institución, y para prevenir una potencial propagación clonal (102).

El estudio 2 presenta varias limitaciones: por su diseño retrospectivo probablemente, la información clínica disponible fue parcial, lo que puede haber sesgado la interpretación de algunos resultados. Además, la inclusión de pacientes de un único centro en Barcelona hace que los resultados obtenidos no sean directamente extrapolables a otros contextos.

En resumen, cuando se estudia la diversidad genética de *P. jirovecii* hay que considerar la carga fúngica presente en las muestras ya que puede influir en el rendimiento de las técnicas. Los resultados mejoran con una cuidadosa selección de los loci incluidos y con la optimización de las condiciones de amplificación. El uso de un esquema MLST optimizado contribuyó a identificar una alta variabilidad genética en

muestras obtenidas tanto de casos de colonización como de neumonía, sin que se pudiese encontrar ninguna asociación entre las variantes alélicas o los MLG y las características clínicas. El genotipado, además, fue útil para verificar la ausencia de brotes durante el periodo de estudio.

Los hallazgos del presente estudio contribuyen a enriquecer el limitado conocimiento de la variabilidad genética del *P. jirovecii* en España, proporcionando el conjunto de datos de epidemiología molecular más extenso disponible hasta la fecha en nuestro país. Además es el primer trabajo que estudia la influencia de la carga fúngica en el rendimiento del genotipado y compara diferentes esquemas MLST basados en  $\geq 3$  loci, contribuyendo a la generación de un esquema altamente discriminatorio.

# **CONCLUSIONES**



## 6. Conclusiones

1. En nuestro medio, la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* es más frecuente en población inmunodeprimida VIH negativa que en pacientes VIH positivos. La menor carga fúngica asociada limita el uso de las técnicas basadas en la microscopía.
2. La aplicación de técnicas de PCR a tiempo real en muestras invasivas (lavado broncoalveolar) y no invasivas (lavado oral) se presenta como una alternativa útil para el diagnóstico de la neumonía por *P. jirovecii*.
3. Las dos técnicas de PCR a tiempo real con dianas genéticas con número de copias estable estudiadas (DHPS y mtSSU rRNA) presentaron rendimiento diagnóstico similar, a pesar del diferente número de copias.
4. Para el diagnóstico de la neumonía por *P. jirovecii* la aplicación de técnicas de PCR a tiempo real sobre lavado broncoalveolar requiere de una interpretación cuantitativa, pudiendo aplicar criterios comunes a pacientes VIH positivos y negativos. El uso de técnicas moleculares con dianas que presentan número de copias estable ayuda a delimitar el intervalo de valores de dudosa interpretación.
5. Para el diagnóstico de la neumonía por *P. jirovecii* la aplicación de técnicas de PCR a tiempo real sobre lavado oral no requiere de una interpretación cuantitativa, simplificando el diagnóstico microbiológico. La interpretación cualitativa de sus resultados, es aplicable tanto a pacientes VIH positivos como negativos, alcanzando una precisión diagnóstica del 91.7%.
6. El valor predictivo negativo del 100% alcanzado con la aplicación de las técnicas de PCR a tiempo real estudiadas sobre lavado oral permite descartar con total fiabilidad el diagnóstico de neumonía por *P. jirovecii*.
7. La aplicación de técnicas de PCR a tiempo real sobre lavados orales no permite descartar la colonización por *P. jirovecii*, por lo que no serían útiles como técnica de cribado.



8. Los loci  $\beta$ -TUB, DHPS, SOD, ITS, CYB, y mt26S presentan diferente rendimiento, con tasas de amplificación, diversidad alélica y capacidad discriminatoria no homogéneas, que condiciona su aplicabilidad en estudios epidemiológicos.
9. La carga fúngica presente en la muestra influye en el tasa de amplificación, siendo esta influencia más marcada para los loci nucleares ( $\beta$ -TUB, DHPS, SOD e ITS) que para las dianas mitocondriales (CYB y mt26S).
10. La inclusión de los loci ITS y DHPS en esquemas MLST estaría limitada por su bajo rendimiento, ya que presentaron baja tasa de amplificación y nula diversidad, respectivamente.
11. La ausencia de mutaciones en DHPS indica que las cepas de *P. jirovecii* resistentes a sulfamidas en nuestro medio son inexistentes o, al menos, muy poco prevalentes.
12. La variedad alélica de *Pneumocystis* podría ser superior a la previamente descrita ya que, pese al limitado número de pacientes estudiados, se detectaron alelos nuevos y se describieron variantes alélicas previamente no identificadas en España. No parece existir asociación entre variantes alélicas y rasgos clínicos.
13. El tipado molecular de *P.jirovecii* basado en el estudio de un solo locus no presenta suficiente capacidad discriminatoria para su aplicación en estudios epidemiológicos.
14. La idoneidad de los esquemas MLST previamente descritos (esquema 1 y 2) no es generalizable ya que presentaron un rendimiento insatisfactorio en la cohorte estudiada.
15. Es posible establecer una combinación de loci que mejore la capacidad de amplificación y el poder discriminatorio de esquemas previamente descritos mediante la selección cuidadosa de las dianas y la optimización de los protocolos técnicos de amplificación.



16. La concatenación de los locus  $\beta$ -TUB, SOD, CYB, y mt26S genera un esquema altamente discriminatorio (esquema 3) que permite identificar un elevado grado de diversidad genética de *P. jirovecii* en la población estudiada,
17. Los secuenciotipos descritos con el esquema 3 no se asociaron con ningún rasgo clínico particular en la cohorte estudiada.
18. No se constató transmisión cruzada del hongo entre pacientes durante el periodo de estudio y esta observación se vio apoyada por el uso de un esquema de genotipado altamente discriminatorio (esquema 3).
19. El esquema 3 puede ser una herramienta útil para la monitorización de genotipos circulantes y como complemento en el estudio de casos de neumonía por *P. jirovecii* potencialmente asociados.



# **PERSPECTIVAS DE FUTURO**



## 7. Perspectivas de futuro

La situación epidemiológica actual de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii* pone de manifiesto la necesidad de disponer de una herramienta de diagnóstico microbiológico que sea rápida, sencilla y precisa.

Los avances en el campo de la Biología Molecular de los últimos años han permitido mejorar sustancialmente el diagnóstico de laboratorio de la neumonía de *P. jirovecii*, pero resulta imperante la necesidad de tener una técnica de PCR estandarizada y universal. Esto permitiría generar protocolos unificados de trabajo y favorecería la homogeneidad en el diagnóstico, permitiendo la comparación de resultados y uniformizar el diagnóstico microbiológico de la neumonía de *P. jirovecii*.

Del mismo modo que en el ámbito diagnóstico, se requiere un esquema universal de tipado para poder conocer y comparar la epidemiología de *Pneumocystis* en las diferentes áreas geográficas así como su relación con distintos aspectos clínicos. En un futuro no muy lejano, el estudio de la epidemiología de *Pneumocystis jirovecii* se podrá beneficiar del uso de la tecnología de secuenciación de nueva generación, permitiendo una mayor profundidad de estudio así como el estudio de partes del genoma más extensas.

La ausencia de un método de cultivo *in vitro* eficiente obliga a la detección directa de *Pneumocystis* sobre muestra clínica. Un punto clave para poder avanzar en el diagnóstico y la epidemiología molecular es mejorar las técnicas de laboratorio para que la carga fúngica presente en la muestra no sea una limitación.



# **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



## 8. Referencias bibliográficas

1. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159–218.
2. Carini A. Formas de eschizogonia do trypanosoma lewisi. Bol Soc Med Sao Paulo. 1910;18:204.
3. Delanöe P, Delanöe M. Sur le repports des kystes de Carinii du poumon des rats avec Trypanosoma lewisi. Acad Sci. 1912;155:658–60.
4. Calderón-sandubete EJ, Varela-aguilar JM, Medrano-ortega FJ. Historical Perspective on P.carinii infection. Protist. 2002;153(September):303–10.
5. Ammich O. Uber die nichtsyphilitis intersititielle Pneumoniae des ersten Kindersalters. Virchow Arch Pathol Anat. 1938;302:539.
6. Van der Meer MG, Brug SL. Infection a Pnemocystis chez l’homme et chez les animaux. Ann Soc Belg Med Trop. 1942;22:301–9.
7. Vanek J. Interstitial plasma cell pneumonia in infants. Ann Paediatr. 1953;180:1–21.
8. Rubis E. Variants of pneumocystis pneumonia. J Pathol Bacteriol. 1957;74:353.
9. Frenkel J. Pneumocystis jiroveci n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. Natl Cancer Inst Monogr. 1976;43(Oct):13–30.
10. Frenkel JK. Pneumocystis pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. J Eukaryot Microbiol. 1999;46(5):89S–92S.
11. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (Pneumocystis jiroveci) for Pneumocystis from humans. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):891–6.
12. Stringer JR, Ben Beard C, Miller RF, Cushion MT. A New Name (Pneumocystis jiroveci) for Pneumocystis from Humans (Response to Hughes). Emerg Infect Dis J. 2003;9(2):276.
13. Redhead SA, Cushion MT, Frenkel JK, Stringer JR. Pneumocystis and Trypanosoma cruzi: nomenclature and typifications. J Eukaryot Microbiol. 2006;53(1):2–11.
14. Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, Rawson PG, Schultz MG. Pneumocystis carinii Pneumonia in the United States: Epidemiologic, Diagnostic, and Clinical Features. Ann Intern Med. 1974 Jan 1;80(1):83–93.
15. Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Vande Stouwe RA, Holzman RS, et al. An Outbreak of Community-Acquired Pneumocystis carinii Pneumonia . N Engl J Med. 1981;305(24):1431–8.
16. Fauci AS, Macher AM, Longo DL, Lane HC, Rook AH, Masur H, et al. Acquired immunodeficiency syndrome: epidemiologic, clinical, immunologic, and therapeutic considerations. Ann Intern Med. 1984 Jan;100(1):92–106.
17. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. J Fungi. 2017;3(4).
18. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi D V, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows Pneumocystis carinii to be a member of the Fungi. Nature. 1988;334(6182):519–22.
19. Wakefield AE. Pneumocystis Carinii. Br Med Bull. 2002;61:175–88.

20. Calderón-sandubete EJ, de Armas Rodriguez Y, Capó de Paz V. *Pneumocystis jirovecii* : cien años de historia. *Rev Cuba Med Trop*. 2011;63(2):97–116.
21. Ma L, Cissé OH, Kovacs JA. A molecular window into the biology and epidemiology of *Pneumocystis* spp. *Clin Microbiol Rev*. 2018;31(3):e00009-18.
22. Cushion MT, Arnold J. Proposal for a *Pneumocystis* Genome Project. *J Eukaryot Microbiol*. 1997;44(s6):7s-7s.
23. Slaven BE, Meller J, Porollo A, Sesterhenn T, Smulian AG, Cushion MT. Draft assembly and annotation of the *Pneumocystis carinii* genome. *J Eukaryot Microbiol*. 2006;53(SUPPL. 1):89–91.
24. Cissé OH, Pagni M, Hauser PM. De novo assembly of the *Pneumocystis jirovecii* genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. *MBio*. 2013;4(1):1–4.
25. Ma L, Huang DW, Cuomo CA, Sykes S, Fantoni G, Das B, et al. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three *Pneumocystis* species provide new insights into divergence between human and rodent *Pneumocystis*. *FASEB J*. 2013 May;27(5):1962–72.
26. Ma L, Chen Z, Huang DW, Kutty G, Ishihara M, Wang H, et al. Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. *Nat Commun*. 2016;7(10740).
27. Skalski JH, Kottom TJ, Limper AH. Pathobiology of *Pneumocystis pneumonia* : life cycle , cell wall and cell signal transduction. *FEMS Yeast Res*. 2015;(March):1–12.
28. Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis Pneumonia*. *N Engl J Med*. 2004;350(June):2487–98.
29. Aliouat-Denis C-M, Martinez A, Aliouat EM, Pottier M, Gantois N, Dei-cas E. The *Pneumocystis* life cycle. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio Janeiro*. 2009;104(May):419–26.
30. Thomas CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nat Rev Microbiol*. 2007;5(4):298–308.
31. Almeida JMGC, Cissé OH, Fonseca Á, Pagni M, Hauser PM. Comparative Genomics Suggests Primary Homothallism of. *MBio*. 2015;6(1):1–8.
32. Delhaes L, Aliouat EM, Viscogliosi E, Dei-cas E. *Pneumocystis*: from a doubtful unique entity to a group of highly diversified fungal species 1,2 . *Fed Eur Microbiol Soc*. 2011;11:2–17.
33. Cushion MT. Are members of the fungal genus *pneumocystis* (a) commensals; (b) opportunists; (c) pathogens; or (d) all of the above? *PLoS Pathog*. 2010;6(9):1–4.
34. Wissmann G, Morilla R, Friaiza V, Caldero E. El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. *Enfermedades Infecc y microbiología Clin*. 2010;28(1):38–43.
35. Martinez A, Halliez MCM, Aliouat EM, Chabé M, Standaert-Vitse A, Fréalle E, et al. Growth and airborne transmission of cell-sorted life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *PLoS One*. 2013;8(11):1–8.
36. Cissé OH, Ma L, Jiang C, Snyder M, Kovacs JA. Humans are selectively exposed to *Pneumocystis jirovecii*. *MBio*. 2020;11:e03138-.
37. Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, et al. Immunocompetent Hosts as a Reservoir of *Pneumocystis* Organisms: Histological and RT-PCR Data Demonstrate Active Replication. *Eur J Clin*

- Microbiol Infect Dis. 2004;23(2):89–97.
38. Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet J, Nevez G, Garin YJF, et al. Quantification and Spread of *Pneumocystis jirovecii* in the Surrounding Air of Patients with *Pneumocystis Pneumonia*. *Clin Infect Dis*. 2010;51(3):259–65.
  39. Morilla R, Martínez-Rísquez MT, de la Horra C, Friaza V, Martín-Juan J, Romero B, et al. Airborne acquisition of *Pneumocystis* in bronchoscopy units: a hidden danger to healthcare workers. *Med Mycol*. 2019;57(5):542–7.
  40. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f . sp . *hominis* DNA in Immunocompetent Health Care Workers in Contact with Patients with *P . carinii Pneumonia*. *J Clin Microbiol*. 2001;39(11):3877–82.
  41. Alanio A, Bretagne SS. *Pneumocystis jirovecii* detection in asymptomatic patients: what does its natural history tell us? *F1000Research*. 2017;6(May):739.
  42. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and Its Role in Disease. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(2 (April)):297–317.
  43. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and Clinical Significance of *Pneumocystis* Colonization. *J Infect Dis*. 2008;197(January):10–7.
  44. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa A V., Ponce CA, Cabrera CE, et al. Search for Primary Infection by *Pneumocystis carinii* in a Cohort of Normal, Healthy Infants. *Clin Infect Dis*. 2001;32(6):855–61.
  45. Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, et al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10(11):1029–31.
  46. Vera C, Aguilar YA, Vélez LA, Rueda ZV. High transient colonization by *Pneumocystis jirovecii* between mothers and newborn. *Eur J Pediatr*. 2017;
  47. Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, Ulloa AV, Bustamante R, Juarez G. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. *Emerg Infect Dis*. 2003 May;9(5):605–6.
  48. Pérez MT, Álvarez IÁ, Emilia M, Soage B, Figueroa P. Role of *Pneumocystis jirovecii* in patients with different pulmonary underlying condition using a. *Rev Española Quimioter*. 2018;1–8.
  49. Gutiérrez S, Respaldiza N, Campano E, Martínez-Risquez MT, Calderón EJ, De La Horra C. *Pneumocystis jirovecii* colonization in chronic pulmonary disease. *Parasite*. 2011;18(2):121–6.
  50. Takemoto S, Ebara M, Hasebe S, Yakushijin Y. A study on the colonization of *Pneumocystis jirovecii* among outpatients during cancer chemotherapy and among healthy smokers. *J Infect Chemother*. 2017;23(11):752–6.
  51. Pereira RMM, Müller ALL, Zimerman RAA, Antunes DBB, Zinn VFF, Friaza V, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization among HIV-positive patients in southern Brazil. *Med Mycol*. 2014;52(8):804–9.
  52. Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, Pepperell JCT, Wakefield AE, Miller RF, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax*. 2003;58(7):594–7.
  53. Lee HY, Kang HS, Lee HY, Rhee CK, Lee SY, Kim SC, et al. Clinical significance of positive *Pneumocystis jirovecii* polymerase chain reaction in non-human immunodeficiency virus immunocompromised patients in a real practice. *Korean J Intern Med*. 2016;Dec 13:1–8.
  54. Fily F, Lachkar S, Thiberville L, Favennec L, Caron F. *Pneumocystis jirovecii*

- colonization and infection among non HIV-infected patients. *Med Mal Infect.* 2011;41(10):526–31.
55. Wissmann G, Morilla R, Martín-Garrido I, Friaza V, Respaldiza N, Povedano J, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients treated with infliximab. *Eur J Clin Invest.* 2011;41(3):343–8.
  56. Mekinian A, Durand-Joly I, Hatron P-Y, Moranne O, Denis G, Dei-Cas E, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with systemic autoimmune diseases: prevalence, risk factors of colonization and outcome. *Rheumatology.* 2011;50(3):569–77.
  57. Livingstone CS. *Pneumocystis Pneumonia.* *Semin Respir Crit Care Med.* 2011;32(6):775–82.
  58. Catherinot E, Lanternier F. *Pneumocystis jirovecii Pneumonia.* *Infect Dis Clin N Am.* 2010;24:107–38.
  59. Krajccek BJ, Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis Pneumonia : Current Concepts in Diagnosis , and Treatment.* *Clin Chest Med.* 2009;30(2):265–78.
  60. Salzer HJF, Schäfer G, Hoenigl M, Günther G, Hoffmann C, Kalsdorf B, et al. Clinical, Diagnostic, and Treatment Disparities between HIV-Infected and Non-HIV-Infected Immunocompromised Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Respiration.* 2018;96(1):52–65.
  61. Cillóniz C, Dominedò C, Álvarez-Martínez MJ, Moreno A, García F, Torres A, et al. *Pneumocystis pneumonia* in the twenty-first century: HIV-infected versus HIV-uninfected patients. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019;17(10):787–801.
  62. López-Sánchez C, Falcó V, Burgos J, Navarro J, Martín MT, Curran A, et al. Epidemiology and Long-Term Survival in HIV-Infected Patients With *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in the HAART Era. *Medicine (Baltimore).* 2015;94(12):e681.
  63. Maini R, Henderson KL, Sheridan E a., Lamagni T, Nichols G, Delpech V, et al. Increasing *Pneumocystis pneumonia*, England, UK, 2000-2010. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(3):386–92.
  64. Roux A, Gonzalez F, Roux M, Mehrad M, Menotti J, Zahar JR, et al. Update on pulmonary *Pneumocystis jirovecii* infection in non-HIV patients. *Medecine et Maladies Infectieuses.* 2014.
  65. Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-robert F, Hamane S, Lafabrie A, et al. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients with or without AIDS , France. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(9):1490–7.
  66. Bienvenu AL, Traore K, Plekhanova I, Bouchrik M, Bossard C, Picot S. *Pneumocystis pneumonia* suspected cases in 604 non-HIV and HIV patients. *Int J Infect Dis.* 2016;46:11–7.
  67. Llibre JM, Revollo B, Vanegas S, Ez JLN, Ornelas A, Marin JM, et al. *Pneumocystis jirovecii pneumonia* in HIV-1-infected patients in the late-HAART era in developed countries. *Scand J Infect Dis.* 2013;(February):1–10.
  68. Pereira-Díaz E, Moreno-Verdejo F, de la Horra C, Guerrero JA, Calderón EJ, Medrano FJ. Changing Trends in the Epidemiology and Risk Factors of *Pneumocystis Pneumonia* in Spain. *Front Public Heal.* 2019;7(October):1–7.
  69. Kato H, Samukawa S, Takahashi H, Nakajima H. Diagnosis and treatment of *Pneumocystis jirovecii pneumonia* in HIV-infected or non-HIV-infected patients—difficulties in diagnosis and adverse effects of trimethoprim-sulfamethoxazole. *J Infect Chemother.* 2019;jul 9.

70. Rodríguez-Tudela JL, Alastruey-Izquierdo A, Gago S, Cuenca-Estrella M, León C, Miro JM, et al. Burden of serious fungal infections in Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(2):183–9.
71. Hughes WT, McNabb PC, Makres TD, Feldman S. Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1974;5(3):289–93.
72. Crothers K, Beard CB, Turner J, Groner G, Fox M, Morris A, et al. Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis pneumonia* containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS.* 2005;19:801–5.
73. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee C, et al. *Pneumocystis carinii* Mutations Are Associated with Duration of Sulfa or Sulfone Prophylaxis Exposure in AIDS Patients. *J Infect Dis.* 2000;182:551–7.
74. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, James W S, et al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in immunocompromised patients. *AIDS.* 1998;12:879–878.
75. Avino L, Roecker A. A review of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in the non-HIV-infected population. *Ann Pharmacother.* 2016;1–7.
76. Messiaen PE, Cuyx S, Dejagere T, Van der Hilst JC. The role of CD4-cell count as discriminatory measure to guide chemoprophylaxis against *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in human immunodeficiency virus-negative immunocompromised patients: A systematic review. *Transpl Infect Dis.* 2016;
77. Maertens J, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, et al. ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2397–404.
78. Stern A, Green H, Paul M, Vidal L, Leibovici L. Prophylaxis for *Pneumocystis pneumonia* (PCP) in non-HIV immunocompromised patients (Review). *Cochrane Database Syst Rev.* 2014;(10).
79. Jiang X, Mei X, Feng D, Wang X. Prophylaxis and treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in lymphoma patients subjected to rituximab-contained therapy: A systemic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2015;10(4):1–15.
80. Martin SI, Fishman JA. *Pneumocystis pneumonia* in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2013;13(SUPPL.4):272–9.
81. Yates M, Watts RA, Bajema IM, Cid MC, Crestani B, Hauser T, et al. EULAR/ERA-EDTA recommendations for the management of ANCA-associated vasculitis. *Ann Rheum Dis.* 2016;75(9):1583–94.
82. Mori S, Sugimoto M. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in rheumatoid arthritis patients: Risks and prophylaxis recommendations. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med.* 2015;9:29–40.
83. Cooley L, Dendle C, Wolf J, Teh BW, Chen SC, Boutlis C, et al. Consensus guidelines for diagnosis , prophylaxis and management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological and solid malignancies, 2014. *Intern Med J.* 2014;44:1350–63.
84. González Santiago TM, Wetter DA, Kalaaji AN, Limper AH, Lehman JS. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients treated with systemic immunosuppressive agents for dermatologic conditions: a systematic review with recommendations for prophylaxis. *Int J Dermatol.* 2016;55:823–30.
85. Iribarren JA, Rubio R. Documento de prevención y tratamiento de infecciones

oportunistas y otras coinfecciones en pacientes con infección por VIH. Grupo de estudio del SIDA-SEIMC (GESIDA). In 2015. p. 54. Available from: <http://gesida-seimc.org/wp-content/uploads/2017/02/gesida-guiasclinicas-2015-InfeccionesOportunistasyCoinfeccionesVIH.pdf>

86. Luísa Tomás A, Matos O. Pneumocystis jirovecii Pneumonia: Current Advances in Laboratory Diagnosis. *OBM Genet.* 2018;2(4):1–1.
87. Rath P, Steinmann J. Update on Diagnosis of Pneumocystis Pulmonary Infections. *Curr Fungal Infect Rep.* 2014;8:227–34.
88. Marwan M. A, Slotkin R, Abi-Raad R, Liu Y, Grant MH, Malinis MF. Gomori Methenamine Silver Stain on Bronchoalveolar Lavage Fluid Is Poorly Sensitive for Diagnosis of Pneumocystis jirovecii Pneumonia in HIV-Negative Immunocompromised Patients and May Lead to Missed or Delayed Diagnoses. *Arch Pathol Lab Med.* 2020;Jan(6):1–8.
89. Louis M, Guitard J, Jodar M, Ancelle T, Magne D, Lascols O, et al. Impact of HIV Infection Status on Interpretation of Quantitative PCR for Detection of Pneumocystis jirovecii. *J Clin Microbiol.* 2015;53(12):3870–5.
90. Alanio A, Hauser PM, Lagrou K, Melchers WJG, Helweg-Larsen J, Matos O, et al. ECIL guidelines for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2386–96.
91. Kitada K, Oka S, Kimura S, Shimada K, Serikawa T, Yamada J, et al. Detection of Pneumocystis carinii sequences by polymerase chain reaction: Animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J Clin Microbiol.* 1991;29(9):1985–90.
92. Schluger N, Sepkowitz K, Armstrong D, Bernard E, Rifkin M, Cerami A, et al. Detection of Pneumocystis carinii in serum of AIDS patients with Pneumocystis pneumonia by the polymerase chain reaction. *J Protozool.* 1991;38(6):240S-242S.
93. Doyle L, Vogel S, Procop GW. Pneumocystis PCR: It Is Time to Make PCR the Test of Choice. *Open Forum Infect Dis.* 2017;4(4).
94. Tia T, Putaporntip C, Kosuwin R, Kongpolprom N, Kawkitinarong K, Jongwutiwes S. A highly sensitive novel PCR assay for detection of Pneumocystis jirovecii DNA in bronchoalveolar lavage specimens from immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect.* 2011;18:598–603.
95. Bateman M, Oladele R, Kolls JK. Diagnosing Pneumocystis jirovecii pneumonia: A review of current methods and novel approaches. *Med Mycol.* 2020 May 13;0:1–14.
96. Linssen CFM, Jacobs JA, Beckers P, Templeton KE, Bakkers J, Kuijper EJ, et al. Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of Pneumocystis jirovecii in bronchoalveolar lavage fluid samples. *J Med Microbiol.* 2006;55(9):1229–35.
97. Gits-muselli M, White L, Mengoli C, Chen S, Crowley B, Dingemans G, et al. The Fungal PCR Initiative 's evaluation of in-house and commercial Pneumocystis jirovecii qPCR assays : Toward a standard for a diagnostics assay. *Med Mycol.* 2019;1–10.
98. Sasso M, Chastang-Dumas E, Bastide S, Alonso S, Lechiche C, Bourgeois N, et al. Performances of Four Real-Time PCR Assays for Diagnosis of Pneumocystis jirovecii Pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):625–30.

99. Lu J, Chen C, Bartlett MS, Smith JW, Lee C. Comparison of Six Different PCR Methods for Detection of *Pneumocystis carinii*. *J Clin Microbiol*. 1995;33(10):2785–8.
100. Durand-Joly I, Chabe M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-cas E. Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;45:405–10.
101. Tamburrini E, Mencarini P, Visconti E, Zolfo M, Marinaci S, Zinzi D, et al. IV. Potential impact of *Pneumocystis* genetic diversity on the molecular detection of the parasite in human host. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998;22(1–2):37–49.
102. Dellière S, Gits-muselli M, Bretagne S, Alanio A. Outbreak-Causing Fungi: *Pneumocystis jirovecii*. *Mycopathologia*. 2019;Nov 28.
103. Fauchier T, Hasseine L, Gari-Toussaint M, Casanova V, Marty PM, Pomares C. Detection of *Pneumocystis jirovecii* by Quantitative PCR To Differentiate Colonization and Pneumonia in Immunocompromised HIV-Positive and HIV-Negative Patients. Warnock DW, editor. *J Clin Microbiol*. 2016 Jun;54(6):1487–95.
104. Montesinos I, Brancart F, Schepers K, Jacobs F, Denis O, Delforge M-L. Comparison of 2 real-time PCR assays for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in human immunodeficiency virus (HIV) and non-HIV immunocompromised patients. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;82(2):143–7.
105. Mühlethaler K, Bögli-Stuber K, Wasmer S, Von Garnier C, Dumont P, Rauch A, et al. Quantitative PCR to diagnose *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised non-HIV patients. *Eur Respir J*. 2012;39(4):971–8.
106. Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Microbiol Methods*. 2008;75:258–61.
107. Samuel CM, Whitelaw A, Corcoran C, Morrow B, Hsiao NY, Zampoli M, et al. Improved detection of *Pneumocystis jirovecii* in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected pneumocystis pneumonia using real-time PCR: a prospective study. *BMC Infect Dis*. 2011;11:329.
108. Álvarez-Martínez MJ, Miro JM, Valls ME, Moreno A, Rivas P V, Sole M, et al. Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006;56:153–60.
109. Matsumura Y, Ito Y, Iinuma Y, Yasuma K, Yamamoto M, Matsushima a, et al. Quantitative real-time PCR and the (1→3)-beta-D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(6):591–7.
110. Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, Evans HE, Morris-Jones S, Gant V, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax*. 2008;63(2):154–9.
111. Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf JD. Detection of pneumocystis jirovecii by two staining methods and two quantitative PCR assays. *Infection*. 2009;37(3):261–5.
112. Valero C, Buitrago MJ, Gits-Muselli M, Benazra M, Sturny-Leclercq A, Hamane S, et al. Copy number variation of mitochondrial DNA genes in pneumocystis jirovecii according to the fungal load in BAL specimens. *Front Microbiol*. 2016;7(Sep):1–11.

113. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(10):1531–7.
114. Jarboui MA, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F, Ben Arab N, et al. Molecular diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients. *Mycoses*. 2010;53(4):329–33.
115. Robert-Gangneux F, Belaz S, Revest M, Tattevin P, Jouneau S, Decaux O, et al. Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Immunocompromised Patients by Real-Time PCR: a 4-Year Prospective Study. *J Clin Microbiol*. 2014;52(9):3370–6.
116. Rudramurthy SM, Sharma M, Sharma M, Rawat P, Ghosh A, V L, et al. Reliable differentiation of *Pneumocystis pneumonia* from *Pneumocystis* colonization by quantification of Major Surface Glycoprotein gene using real-time polymerase chain reaction. *Mycoses*. 2018;61(2):96–103.
117. Song Y, Ren Y, Wang X, Li R. Recent advances in the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Med Mycol*. 2016;57(4):E111–6.
118. Esteves F, Calé SS, Badura R, Boer MG De, Maltez F, Calderón EJ, et al. Diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*: evaluation of four serologic biomarkers. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21(4):379.e1-10.
119. Corsi-Vasquez G, Ostrosky-Zeichner L, Pilkington EF, Sax PE. Point-counterpoint: Should Serum  $\beta$ -D-Glucan Testing Be Used for the Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia? *J Clin Microbiol*. 2020;58(1):1–7.
120. Tomás AL, Cardoso F, Esteves F, Matos O. Serological diagnosis of pneumocystosis: production of a synthetic recombinant antigen for immunodetection of *Pneumocystis jirovecii*. *Nat Publ Gr*. 2016;(November):1–8.
121. Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, Yamada W, Nishimura T, Takeuchi T, et al. Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Chest*. 2007;131(4):1173–80.
122. Gits-Muselli M, Bretagne S, Alanio A. Genotyping *Pneumocystis jirovecii*: Impacting Our Understanding of Interhuman Transmission. *OBM Genet*. 2019;3(1):1–1.
123. Matos O, Esteves F. *Pneumocystis jirovecii* multilocus gen sequencing: Findings and Implications. *Future Microbiol*. 2010;5(8):1257–68.
124. Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs J a, Unnasch TR, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(10):1729–35.
125. Hauser PM, Francioli P, Bille J, Telenti A. Typing of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* by Single-Strand Conformation Polymorphism of Four Genomic Regions. *J Clin Microbiol*. 1997;35(12):3086–91.
126. Hauser PM, Blanc DS, Bille J, Francioli P. III . Typing methods to approach *Pneumocystis carinii* genetic heterogeneity. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1998;22:27–35.
127. Hauser PM. The development of a typing method for an uncultivable microorganism: The example of *Pneumocystis jirovecii*. *Infect Genet Evol*. 2004;4(3):199–203.
128. Rabodonirina M, Vaillant L, Taffé P, Nahimana A, Gillibert R-P, Vanhems P, et al. *Pneumocystis jirovecii* Genotype Associated with Increased Death Rate of

- HIV-infected Patients with Pneumonia. *Emerg Infectious Dis.* 2013;19(1):21–9.
129. Helweg-larsen J, Benfield TL, Eugen-olsen J, Lundgren JD, Lundgren B. Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *Lancet.* 1999;354:1347–51.
  130. Monroy-Vaca EX, De Armas Y, Illnait-Zaragozı MT, Torano G, Diaz R, Vega D, et al. Prevalence and genotype distribution of *pneumocystis jirovecii* in cuban infants and toddlers with whooping cough. *J Clin Microbiol.* 2014;52(1):45–51.
  131. Montes-Cano M, de la Horra C, Martın-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, et al. *Pneumocystis jirovecii* Genotypes in the Spanish Population. *Clin Infect Dis.* 2004;39:123–8.
  132. Le Gal S, Damiani C, Perrot M, Rouille A, Virmaux M, Quinio D, et al. Circulation of *Pneumocystis dihydropteroate synthase* mutants in France. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(2):119–24.
  133. Jarboui MA, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F, Ayadi A. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains isolated from immunocompromised patients. *Pathol Biol.* 2011;59(4):222–5.
  134. Sassi M, Ripamonti C, Mueller NJ, Yazaki H, Kutty G, Ma L, et al. Outbreaks of *Pneumocystis* Pneumonia in 2 Renal Transplant Centers Linked to a Single Strain of *Pneumocystis*: Implications for Transmission and Virulence. *Clin Infect Dis.* 2012;54(10):1437–44.
  135. Ripamonti C, Orenstein A, Kutty G, Huang L, Schuhegger R, Sing A, et al. Restriction Fragment Length Polymorphism Typing Demonstrates Substantial Diversity among *Pneumocystis jirovecii* Isolates . *J Infect Dis.* 2009;200(10):1616–22.
  136. Jarboui MALLI, Mseddi F, Sellami H, Sellami A, Makni F, Ayadi ALI. Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* strains based on sequence variation of different DNA region. *Med Mycol.* 2013;51:561–7.
  137. Ma L, Kutty G, Jia Q, Imamichi H, Huang L, Atzori C, et al. Analysis of Variation in Tandem Repeats in the Intron of the Major Surface Glycoprotein Expression Site of the Human Form of *Pneumocystis carinii* . *J Infect Dis.* 2002;186(11):1647–54.
  138. Parobek CM, Jiang LY, Patel JC, Alvarez-Martenez MJ, Miro JM, Worodria W, et al. Multilocus microsatellite genotyping array for investigation of genetic epidemiology of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol.* 2014;52(5):1391–9.
  139. Gits-Muselli M, Peraldi MN, De Castro N, Delcey V, Menotti J, Guigue N, et al. New short tandem repeat-based molecular typing method for *Pneumocystis jirovecii* reveals intrahospital transmission between patients from different wards. *PLoS One.* 2015;10:e0125763.
  140. Alanio A, Gits-Muselli M, Guigue N, Desnos-Ollivier M, Calderon EJ, Di Cave D, et al. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* Across Europe: A Multicentre Observational Study. *EBioMedicine.* 2017;22:155–63.
  141. Gits-muselli M, Campagne P, Desnos-ollivier M, Le P, Bretagne S, Morio F, et al. Comparison of MultiLocus Sequence Typing (MLST) and Microsatellite Length Polymorphism (MLP) for *Pneumocystis jirovecii* genotyping. *Comput Struct Biotechnol J.* 2020;
  142. Esteves F, Gaspar J, De Sousa B, Antunes F, Mansinho K, Matos O. Clinical relevance of multiple single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: Development of a multiplex PCR-single-base-extension

- methodology. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):1810–5.
143. Esteves F, Gaspar J, de Sousa B, Antunes F, Mansinho K, Matos O. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping in pooled DNA samples: A new approach for clinical and epidemiological studies. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(6):E177–84.
  144. Alanio A, Olivi M, Cabaret O, Foulet F, Bellanger AP, Millon L, et al. Correlation between *Pneumocystis jirovecii* mitochondrial genotypes and high and low fungal loads assessed by single nucleotide primer extension assay and quantitative real-time PCR. *J Eukaryot Microbiol.* 2015;62(5):650–6.
  145. Esteves F, Gaspar J, Marques T, Leite R, Antunes F, Mansinho K, et al. Identification of relevant single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: Relationship with clinical data. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(7):878–84.
  146. Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, et al. Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 1998;36(3):734–41.
  147. Gal SLE, Rouille A, Gueguen P, Virmaux M, Berthou C, Guillelm GAËLLE, et al. *Pneumocystis jirovecii* haplotypes at the internal transcribed spacers of the rRNA operon in French HIV-negative patients with diverse clinical presentations of *Pneumocystis* infections. *Med Mycol.* 2013;(November):851–62.
  148. Kai L, He A, Cai WP, Tang XP, Zheng XY, Li ZY, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Chinese HIV-infected patients based on nucleotide sequence variations in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *Med Mycol.* 2013;51(1):108–12.
  149. Sheikholeslami M-F, Sadraei J, Farnia P, Forozandeh Moghadam M, Emadi Kochak H. Typing of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Iranian immunosuppressed patients based on the Internal Transcribed Spacer (ITS) region of the rRNA gene. *Med Mycol.* 2013;51(8):843–50.
  150. Alcántara-Mojica A, Delhaes L, Ramírez-Corona F, Sánchez-Paredes E, Córdova-Martínez É, Morales-Villarreal FR, et al. Detección y genotipificación de *Pneumocystis jirovecii* en muestras de pacientes mexicanos VIH positivos y negativos. *Gac Med Mex.* 2019;155(4):377–85.
  151. Nimri LF, Moura INS, Huang L, Del Rio C, Rimland D, Duchin JS, et al. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* based on variations in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J Clin Microbiol.* 2002;40(4):1146–51.
  152. Beser J, Hagblom P, Fernandez V. Frequent in vitro recombination in internal transcribed spacers 1 and 2 during genotyping of *Pneumocystis jirovecii*. *J Clin Microbiol.* 2007;45(3):881–6.
  153. Curran T, McCaughey C, Coyle P V. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in Northern Ireland. *J Med Microbiol.* 2013;62(PART8):1170–4.
  154. Danesi P, Da Rold G, Rizzoli A, Hauffe HC, Marangon S, Samerpitak K, et al. Barcoding markers for *Pneumocystis* species in wildlife. *Fungal Biol* 120. 2016;191–206.
  155. Dimonte S, Berrilli F, Orazi CD, Alfonso RD, Placco F, Bordi E, et al. Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infect Genet Evol.* 2013;14:68–72.

156. Esteves F, Gaspar J, Tavares A, Moser I, Antunes F, Mansinho K, et al. Population structure of *Pneumocystis jirovecii* isolated from immunodeficiency virus-positive patients. *Infect Genet Evol.* 2010;10(2):192–9.
157. Fata A, Abdollahi B, Rezaeetalab F, Attaran D, Najjari M, Najafzadeh MJ. Molecular diagnosis and genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage samples obtained from patients with pulmonary disorder. *Curr Med Mycol.* 2019;5(3):13–8.
158. Pini P, Orsi CF, La Regina A, Peppoloni S, Berrilli F, Blasi E, et al. *Pneumocystis jirovecii* genotyping: Experience in a tertiary-care hospital in Northern Italy. *New Microbiol.* 2017;40(3):208–11.
159. Volpe G, Sbaiz L, Avanzini C, Caramello P, Savoia D. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* isolated from human immunodeficiency virus-positive patients in Turin, Italy. *J Clin Microbiol.* 2001;39(8):2995–8.
160. Esteves F, Montes-cano MA, de la Horra C, Costa MC, Calderón EJ, Antunes F, et al. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14(4):356–62.
161. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis.* 1997;175(2):482–5.
162. Meneau I, Sanglard D, Bille J, Hauser PM. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms confer resistance to sulfadoxine and sulfanilamide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48:2610–6.
163. Muñoz C, Zuluaga A, Restrepo A, Tobón A, Cano LE, Gonzalez A. Molecular diagnosis and detection of *Pneumocystis jirovecii* DHPS and DHFR genotypes in respiratory specimens from Colombian patients. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;72(3):204–13.
164. Tyagi AK, Mirdha BR, Luthra K, Guleria R, Mohan A, Singh UB, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase ( DHPS ) genotypes in non-HIV-immunocompromised patients : a tertiary care reference health centre study. *Med Mycol.* 2011;46:167–71.
165. Vanspauwen MJ, Knops VEJ, Bruggeman CA, van Mook WNKA, Linssen CFM. Molecular epidemiology of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-positive and -negative immunocompromised patients in the Netherlands. *J Med Microbiol.* 2014;63:1294–302.
166. Siripattanapipong S, Leelayoova S, Mungthin M, Worapong J, Tan-Ariya P. Study of DHPS and DHFR genes of *Pneumocystis jirovecii* in Thai HIV-infected patients. *Med Mycol.* 2008;46(4):389–92.
167. Ricci G, Santos DW, Kovacs JA, Nishikaku AS, de Sandes-Freitas TV, Rodrigues AM, et al. Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* from a cluster of cases of pneumonia in renal transplant patients: Cross-sectional study. *Mycoses.* 2018;61(11):845–52.
168. Gianella S, Haeberli L, Joos B, Ledergerber B, Wüthrich RP, Weber R, et al. Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among renal transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2010;12(1):1–10.
169. Edlind TD, Bartlett MS, Weinberg GA, Prah GN, Smith JW. The  $\beta$ - tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol.* 1992;6(22):3365–73.

170. Miller RF, Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE. Genotypes of *Pneumocystis jirovecii* Isolates Obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(12):3979–81.
171. Le Gal S, Hoarau G, Bertolotti A, Negri S, Le Nan N, Bouchara JP, et al. *Pneumocystis jirovecii* Diversity in Réunion, an Overseas French Island in Indian Ocean. *Front Microbiol.* 2020;11(February):1–9.
172. Depypere M, Saegeman V, Lagrou K. Typing of *Pneumocystis jirovecii* by multilocus sequencing: evidence of outbreak? *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016 Jun 1;35(6):911–6.
173. Mazars E, Ödberg-Ferragut C, Dei-Cas E, Fourmaux M-N, Aliouat EM, Brun-Pascaud M, et al. Polymorphism of the thymidylate synthase gene of *Pneumocystis carinii* from different host species. *J Eukaryot Microbiol.* 1995;42(1):26–32.
174. Morilla R, González-Magaña A, Friaza V, de Armas Y, Medrano FJ, Calderón EJ, et al. Genetic Polymorphisms of Superoxide Dismutase Locus of *Pneumocystis jirovecii* in Spanish Population. *Front Public Heal.* 2019 Oct 15;7(October):1–4.
175. Nevez G, Guillaud-Saumur T, Cros P, Papon N, Vallet S, Quinio D, et al. *Pneumocystis* primary infection in infancy: Additional French data and review of the literature. *Med Mycol.* 2019;1–9.
176. Vindrios W, Argy N, Le Gal S, Lescure FX, Massias L, Le MP, et al. Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* Infection among Heart Transplant Recipients: Molecular Investigation and Management of an Interhuman Transmission. *Clin Infect Dis.* 2017;65(7):1120–6.
177. Singh Y, Mirdha BR, Guleria R, Khalil S, Panda A, Chaudhry R, et al. Molecular detection of DHFR gene polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* isolates from Indian patients. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9(11):1250–6.
178. Esteves F, Tavares A, Costa MC, Gaspar J, Antunes F, Matos O. Genetic characterization of the UCS and Kex1 loci of *Pneumocystis jirovecii*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(2):175–8.
179. Banerji S, Lugli EB, Miller RF, Wakefield AE. Analysis of Genetic Diversity at the *aroA* Locus in Isolates of *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol.* 1995;42(6):675–9.
180. Matos O, Lee CH, Jin S, Li B, Costa MC, Gonçalves L, et al. *Pneumocystis jirovecii* in Portuguese immunocompromised patients: Association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infect Genet Evol.* 2003;3(4):281–5.
181. Valerio A, Tronconi E, Mazza F, Fantoni G, Atzori C, Tartarone F, et al. Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia Clinical Outcome Is Influenced by Dihydropteroate Synthase. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 2007;45(5):521–8.
182. Maitte C, Leterrier M, Le Pape P, Miegerville M, Morio F. Multilocus sequence typing of *Pneumocystis jirovecii* from clinical samples: How many and which loci should be used? *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):2843–9.
183. Pasic L, Irinyi L, Chen S, Sorrell T, Meyer W. Establishment and optimization of a combined MLST scheme for *Pneumocystis jirovecii*. Paper presented at: 20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology. June 30–July 4, 2018. Amsterdam NL. Abstract P223.
184. Sokal M. A statistical method for evaluating systematic relationships. In:

- University of Kansas Science Bulletin (38). 1958. p. 1409–38.
185. Hunter PR. Reproducibility and indices of discriminatory power of microbial typing methods. *J Clin Microbiol.* 1990;28(9):1903–5.
  186. To KKW, Wong SCY, Xu T, Poon RWS, Mok KY, Chan JFW, et al. Use of nasopharyngeal aspirate for diagnosis of pneumocystis pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2013;51(5):1570–4.
  187. Hviid CJ, Lund M, Sørensen A, Eriksen SE, Jespersen B, Dam MY, et al. Detection of pneumocystis jirovecii in oral wash from immunosuppressed patients as a diagnostic tool. *PLoS One.* 2017;12(3):1–14.
  188. Guigue N, Alanio A, Menotti J, De Castro N, Hamane S, Peyrony O, et al. Utility of adding Pneumocystis jirovecii DNA detection in nasopharyngeal aspirates in immunocompromised adult patients with febrile pneumonia. *Med Mycol.* 2014;00:1–7.
  189. Juliano JJ, Barnett E, Parobek CM, Taylor SM, Meshnick SR, Stone S, et al. Use of Oropharyngeal Washes to Diagnose and Genotype Pneumocystis jirovecii. *Open Forum Infect Dis.* 2015 Sep 1;2(3):1–8.
  190. Larsen HH, Huang L, Kovacs JA, Crothers K, Silcott VA, Morris A, et al. A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of Pneumocystis pneumonia in HIV-infected patients. *J Infect Dis.* 2004;189(9):1679–83.
  191. Sun L, Huang M, Wang J, Xue F, Hong C, Guo Z, et al. Genotyping of Pneumocystis jirovecii isolates from human immunodeficiency virus-negative patients in China. *Infect Genet Evol.* 2015;31:209–15.
  192. Sokulska M, Kicia M, Wesółowska M, Piesiak P, Kowal A, Lobo ML, et al. Genotyping of Pneumocystis jirovecii in colonized patients with various pulmonary diseases. *Med Mycol.* 2017;(December):1–7.
  193. Van Hal SJ, Gilgado F, Doyle T, Barratt J, Stark D, Meyer W, et al. Clinical significance and phylogenetic relationship of novel Australian Pneumocystis jirovecii genotypes. *J Clin Microbiol.* 2009;47(6):1818–23.
  194. Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, et al. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the Pneumocystis carinii dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis.* 2000;182(4):1192–8.
  195. Rabodonirina M, Nahimana A, Weber R, Francioli P, Bille J, Hauser PM. Geographical variation in the prevalence of Pneumocystis jirovecii dihydropteroate synthase mutations within western Europe. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53(SUPPL. 1):1–2.
  196. Alanio A, Gits-muselli M, Mercier-delarue S, Dromer F, Bretagne S. Diversity of Pneumocystis jirovecii during Infection Revealed by Ultra-Deep Pyrosequencing. *Front Microbiol.* 2016;7(May):1–11.
  197. Desoubeaux G, Dominique M, Morio F, Thepault R-AA, Franck-Martel C, Tellier A-CC, et al. Epidemiological outbreaks of Pneumocystis jirovecii pneumonia are not limited to kidney transplant recipients: genotyping confirms common source of transmission in a liver transplantation unit. *J Clin Microbiol.* 2016;54(5):1314–20.
  198. Szydłowiec M, Jakuszko K, Szymczak A, Piesiak P, Kowal A, Kopacz Ż, et al. Prevalence and genotyping of Pneumocystis jirovecii in renal transplant recipients—preliminary report. *Parasitol Res.* 2019;118(1):181–9.

199. Goterris L, Fernández M. M, Aguilar-Company J, Falcó V, Ruiz-Camps I, Martín-Gómez MT. Molecular diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia using oral wash samples in immunocompromised patients: usefulness and importance of the DNA target. *J Clin Microbiol.* 2019;57(12):1–7.
200. Pasic L, Goterris L, Guerrero-murillo M, Irinyi L, Kan A. Consensus Multilocus Sequence Typing Scheme for *Pneumocystis jirovecii*. *J Fungi.*

# **ANEXO**



## 9. Anexo: difusión de los resultados relacionados con la presente tesis doctoral

### 9.1. Congresos nacionales e internacionales

1. “Evaluación de la utilidad de una técnica comercial de PCR en tiempo real para la detección de *Pneumocystis jirovecii* en pacientes inmunodeprimidos HIV(-)”.  
L. Goterris, E. M. Rosselló Mayans, I. López González, C. Paz Donoso, M. T. Martín Gómez.  
XVIII Congreso de la Soceidad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2014, Valencia.
2. “Evaluación de la utilidad de una técnica de PCR a tiempo real para el diagnóstico de la neumonía por *Pneumocystis jirovecii*”.  
L. Goterris, L. Miguel, I. Ruiz-Camps, V. Falcó, C. López, A. M. Villatoro, F. Barroso, M. T. Martín.  
XIX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2015, Sevilla.
3. “Molecular diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: is the dilution factor of bronchoalveolar lavage a confounding factor for the interpretation of the real time PCR results?”  
L. Goterris, L. Miguel, G. Codina, I. Ruiz-Camps, A. Antón, A. Villatoro, P. Alcubilla, M. T. Martín.  
7th Congress on Trends in Medical Mycology; 2015, Lisboa.
4. “*Pneumocystis jirovecii* es un hallazgo frecuente en muestras de vía respiratoria baja en pacientes inmunodeprimidos VIH(-).”  
L. Goterris, L. Miguel, I. Ruiz-Camps, M. T. Martín.  
XX Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica; 2016, Barcelona
5. “Molecular diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PJP) using oral wash (OW) samples: usefulness and importance of the PCR target. A pilot experience”.  
L. Goterris, M. A. Mancebo Fernández, J. Aguilar-Company, V. Falcó Ferrer, I. Ruiz-Camps, M. T. Martín.  
8th Congress on Trends in Medical Mycology; 2017, Belgrado.

6. "Comparative performance of two real time PCR for the rapid diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia (PJP) using non-invasive samples".  
M. T. Martín Gómez, J. Aguilar Company, I. Ruiz-Camps, L. Goterris.  
20th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology;  
2018, Amsterdam
  
7. "Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* in a tertiary hospital in Spain".  
L. Goterris Bonet, M. Guerrero Murillo, L. Pasic, A. Anton Pagarolas, J. Aguilar  
Company, I. Ruiz-Camps, M.T. Martin-Gomez.  
9th Congress on Trends in Medical Mycology; 2019, Nice.

## 9.2. Publicaciones en revistas científicas

1. Goterris L, Fernández Mancebo MA, Aguilar-Company J, Falcó V, Ruiz-Camps I, Martín-Gómez MT. Molecular diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia using oral wash samples in immunocompromised patients: usefulness and importance of the DNA target. J Clin Microbiol. 2019;57(12):1–7. (199)



MYCOLOGY



### Molecular Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia by Use of Oral Wash Samples in Immunocompromised Patients: Usefulness and Importance of the DNA Target

● Lidia Goterris,<sup>a,b</sup> Miguel Angel Mancebo Fernández,<sup>a,b</sup> Juan Aguilar-Company,<sup>c,d</sup> Vicenç Falcó,<sup>b,c</sup> Isabel Ruiz-Camps,<sup>b,c</sup>  
● M. Teresa Martín-Gómez<sup>a,b</sup>

2. Pasic L, Goterris L, Guerrero-murillo M, Irinyi L, Kan A, Ponce C A, Vargas S L, Martín-Gómez M T, Meyer W. Consensus Multilocus Sequence Typing Scheme for *Pneumocystis jirovecii*. Journal of Fungi. Accepted. (200)



Review

### Consensus Multilocus Sequence Typing Scheme for *Pneumocystis jirovecii*

Lana Pasic <sup>1,2,3,†</sup>, Lidia Goterris <sup>4,5,†</sup>, Mercedes Guerrero-Murillo <sup>4,5</sup>, Laszlo Irinyi <sup>1,2,3</sup>, Alex Kan <sup>1,2,3</sup>, Carolina A. Ponce <sup>6</sup>, Sergio L. Vargas <sup>6</sup>, M. Teresa Martin-Gomez <sup>4,5</sup> and Wieland Meyer <sup>1,2,3,\*</sup>

