

RECIBIDO:  
5 junio 2022  
APROBADO:  
30 septiembre 2022

# Diagnóstico de neumonía por *Pneumocystis jirovecii* por PCR

## *Diagnosis of Pneumocystis jirovecii Pneumonia by PCR*

Mariano Fielli<sup>1</sup>, Sofía Sánchez Hinestroza<sup>1</sup>, Alejandra González<sup>1</sup>,  
Analía Santos<sup>1</sup>, M. Alejandra Magdaleno<sup>2</sup>, M. Cecilia Irurtia<sup>2</sup>,  
Santiago Rampulla<sup>2</sup>, Paula Capece<sup>3</sup>, Gladys Posse<sup>3</sup>, Vanesa Sanguineri<sup>3</sup>

Mariano Fielli  
[0000-0002-8115-8218](mailto:0000-0002-8115-8218)  
Sofía Sánchez Hinestroza  
[0000-0002-7068-1679](mailto:0000-0002-7068-1679)  
Alejandra González  
[0000-0003-2467-4010](mailto:0000-0003-2467-4010)  
Analía Santos  
[0000-0002-6508-7624](mailto:0000-0002-6508-7624)  
M. Alejandra Magdaleno  
[0000-0002-9320-7793](mailto:0000-0002-9320-7793)  
M. Cecilia Irurtia  
[0000-0001-5782-5888](mailto:0000-0001-5782-5888)  
Santiago Rampulla  
[0000-0002-0689-2252](mailto:0000-0002-0689-2252)  
Paula Capece  
[0000-0002-4951-6249](mailto:0000-0002-4951-6249)  
Gladys Posse  
[0000-0002-9356-3392](mailto:0000-0002-9356-3392)  
Vanesa Sanguineri  
[0000-0002-9260-7170](mailto:0000-0002-9260-7170)

1. Hospital Nacional Alejandro Posadas. Servicio de Neumonología. Buenos Aires. Argentina.
2. Hospital Nacional Alejandro Posadas. Servicio de Bioquímica, Sección Biología Molecular. Buenos Aires. Argentina.
3. Hospital Nacional Alejandro Posadas. Servicio de Bioquímica, Sección Micología Buenos Aires. Argentina.

AUTOR CORRESPONSAL:

Alejandra González, [alestork@yahoo.com.ar](mailto:alestork@yahoo.com.ar)

## Resumen

**Introducción:** la neumonía por *Pneumocystis* es una infección oportunista causada por *Pneumocystis jirovecii* (Pj) en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en pacientes con VIH. **Objetivo:** describir las características clínicas, radiológicas y la evolución de pacientes inmunocomprometidos con diagnóstico de neumonía por Pj mediante PCR en lavado broncoalveolar (LBA). **Métodos:** se realizó un estudio transversal, descriptivo, en el que se incluyeron pacientes con inmunocompromiso, con cuadro clínico y radiológico compatible con neumonía por Pj, diagnosticado sólo mediante PCR en muestra de LBA. **Resultados:** fueron atendidos 141 pacientes entre marzo de 2017 y diciembre de 2019 con sospecha clínica y radiológica de neumonía por Pj a los que se les realizó LBA. En el análisis se incluyeron 22 pacientes en los cuales se confirmó el diagnóstico únicamente mediante PCR en muestra de LBA. Los signos y síntomas más frecuentes fueron tos (100%) y disnea (77%), y el patrón radiológico predominante fue el infiltrado intersticial y vidrio esmerilado bilateral. En 4 pacientes (18.8%) se observó coinfección pulmonar, con aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae*. La duración de la estancia hospitalaria fue de 13 días (DE±11). Requirieron ventilación mecánica 6 pacientes (27%). La mortalidad intrahospitalaria fue de 23%. **Conclusiones:** la utilización de PCR en muestras de LBA podría constituir un método útil para el diagnóstico de neumonía por Pj. Sin embargo, su valor debe ser interpretado en el marco de los antecedentes, cuadro clínico y radiológico.

**Palabras clave:** neumonía, *Pneumocystis jirovecii*, PCR.

## Abstract

**Introduction:** *Pneumocystis pneumonia* is an opportunistic infection caused by *Pneumocystis jirovecii* (Pj) in immunocompromised patients, especially in patients with HIV. **Objective:** to describe the clinical, radiological characteristics and the clinical course of immunocompromised patients diagnosed with Pj pneumonia by means of PCR in bronchoalveolar lavage (BAL). **Methods:** a cross-sectional, descriptive study was carried out that included immunocompromised patients, with a clinical and radiological suspicion of Pj pneumonia, diagnosed only by PCR in a BAL sample. **Results:** 141 patients underwent BAL between March 2017 and December 2019, for clinical and radiological suspicion for Pj pneumonia. Twenty-two patients whose diagnosis was confirmed only by PCR on a BAL sample were included in the analysis. All patients presented with coughs. 17 patients had dyspnea (77%) and the most frequent radiological pattern was interstitial infiltrate and bilateral ground glass. Pulmonary coinfection was observed in 4 patients (18.8%), with isolation of *Mycobacterium tuberculosis* (n = 2) and *Streptococcus pneumoniae* (n = 2). The length of hospital stay was 13 days (SD±11). Six patients (27%) required mechanical ventilation. In-hospital mortality was 23%. **Conclusions:** the use of PCR in BAL samples could be a useful method for the diagnosis of Pj pneumonia. However, its value must be interpreted in the context of the illness history, clinical, and radiological picture.

**Keywords:** pneumonia, *Pneumocystis jirovecii*, PCR.

## Introducción

La neumonía por *Pneumocystis* es una infección oportunista causada por *Pneumocystis jirovecii* (Pj) en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en pacientes con VIH con recuento de linfocitos T CD4+ < 200 células/mm<sup>3</sup>; también en pacientes inmunocomprometidos por otras etiologías como trasplantes de órgano sólido y hematopoyéticos, neoplasias, receptores de quimioterapia y/o glucocorticoides. La ex-

presión clínica de la enfermedad y el pronóstico son diferentes en ambos grupos. En pacientes inmunocomprometidos no infectados por VIH, el diagnóstico es más dificultoso por la presencia de otras variables como infecciones concomitantes, uso de fármacos citotóxicos y compromiso pulmonar por enfermedad de base; se describe una mortalidad cercana a 40%, cifra superior al 10% descrito en pacientes con infección por VIH.<sup>1</sup>

El diagnóstico de Pj se basa en la identificación microscópica en muestras respiratorias, la cual tiene una sensibilidad limitada, especialmente en pacientes VIH negativos que suelen presentar cargas fúngicas menores. La PCR ha aumentado la capacidad de detección. Por otro lado, en ocasiones, genera dificultades respecto a la diferenciación entre colonización y enfermedad. Uno de los potenciales riesgos de la implementación de técnicas de alta sensibilidad y especificidad, como es la PCR, es el sobre diagnóstico en casos de colonización. La verdadera implicancia de una colonización por *P. jirovecii* no está clara. En la interpretación de colonización o infección, parece razonable utilizar técnicas diagnósticas de alta eficiencia para evitar así el retraso del inicio de tratamiento específico en caso de ser necesario.<sup>1</sup>

El objetivo es describir las características clínicas, radiológicas y la evolución de pacientes inmunocomprometidos con diagnóstico de neumonía por Pj realizado únicamente mediante PCR en una muestra de lavado broncoalveolar.

## Materiales y método

Se llevó a cabo un estudio transversal y descriptivo en el que se incluyeron pacientes con inmunocompromiso, atendidos en el Hospital Nacional Alejandro Posadas entre marzo de 2017 y diciembre de 2019. Los pacientes debían presentar un cuadro clínico (disnea, tos e hipoxemia) y radiológico (imágenes en vidrio esmerilado perihiliares, bilaterales, difusas) compatible con infección por Pj y lavado broncoalveolar (LBA) con examen micológico directo negativo (coloración de Giemsa y técnica con calcoflúor) y PCR positiva para *Pneumocystis jirovecii*.

Para la PCR cualitativa, se realizó la extracción del ADN utilizando columnas comerciales (Roche, Mannheim, Alemania) y siguiendo las indicaciones del fabricante. La amplificación se hizo con una PCR punto final (TaqPCRCore Kit. Qiagen, Alemania) usando el protocolo descrito por Latouche et al, mediante el que se amplifica una banda de 347 pb de una secuen-

cia específica correspondiente a la subunidad grande del rRNA mitocondrial del *P. jirovecii*. Los productos se corrieron por electroforesis en geles de agarosa y se visualizaron con transiluminador de luz ultravioleta (UV Transilluminator UVP). El tamaño de las bandas de ADN se estimó comparándolas con un marcador de peso molecular de 100 pb.<sup>2</sup>

El trabajo fue aprobado por el Comité de Bioética, CEIHP, ref :336 LUPOSO/20

## Resultados

En el Hospital Nacional Profesor Alejandro Posadas fueron atendidos 141 pacientes entre marzo de 2017 y diciembre de 2019, con sospecha clínica y radiológica de infección por *Pj*, a los que se les realizó LBA. Fueron excluidos 32 pacientes por presentar examen micológico directo positivo para *Pj* en la muestra de LBA. En 87 pacientes no se logró confirmar el diagnóstico (mediante PCR u otra técnica). Se incluyeron en el análisis 22 pacientes. 20 pacientes presentaron VIH y el promedio de células T CD4+ fue de 55.3/mm<sup>3</sup> (DE±30), 2 pacientes presentaron otra forma de inmunocompromiso: 1 paciente presentaba linfoma y otro lupus eritematoso sistémico (recibía tratamiento con corticosteroides). La tos estuvo presente en todos los pacientes y la disnea en 17 (77%). La edad promedio de los pacientes fue de 36 años (DE±16), con un rango de 16 a 78 años. 18 (82%) pacientes eran hombres. El patrón radiológico predominante fue el infiltrado intersticial bilateral (91%). En la tomografía de tórax, el vidrio esmerilado bilateral asociado a infiltrados alveolares se observó en el 80% y el vidrio esmerilado como única manifestación, en el 20%. La saturación promedio al ingreso fue de 91,5% (DE±5) y la PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> de 342 (DE±115). El tiempo de evolución de los síntomas previo a la consulta fue de 32 días (DE±8,6). La duración de la estancia hospitalaria fue de 13 días (DE±11). Seis pacientes (27%) requirieron ventilación mecánica (VM). De estos, 5 pacientes fallecieron. La mortalidad intrahospitalaria fue de 23%. En 3 de ellos por sepsis asociada a neumonía al respirador, en 2 por evolución terminal de enfermedad de base (miocardiopatía dilatada y leucoencefalopatía). En 4 pacientes (18.8%) se observó coinfección pulmonar, con los siguientes aislamientos: en 2 pacientes se aisló en el LBA *Mycobacterium tuberculosis* y en otros 2, *Streptococcus pneumoniae* en hemocultivos. Todos los pacientes recibieron tratamiento específico para neumonía por *Pj* y para la coinfección, de estar presente.

## Discusión

El diagnóstico de *Pj* se obtiene a través del estudio de secreciones respiratorias. La muestra de elección es el LBA que permite el mayor rescate del microorganismo. La microscopía en fresco muestra exudados espumosos que permiten un diagnóstico de certeza, aunque existen otras técnicas de microscopía como la tinción de Giemsa, tinción de Grocott o inmunofluorescencia directa.<sup>3</sup>

La técnica de PCR tiene mayor sensibilidad y especificidad, pero tiene limitaciones para diferenciar entre colonización e infección. La colonización por *P. jirovecii* se ha definido como la presencia del hongo en muestras del tracto respiratorio de un huésped sin signos o síntomas respiratorios demostrados por métodos convencionales o moleculares. En la revisión de Vera et al., se describe la frecuencia en pacientes inmunocompetentes: 0-65%, embarazo: 15,5%, niños: 0-100%, fibrosis quística: 1-22% y EPOC: 16-55%. En pacientes con VIH, algunos estudios han documentado frecuencias de colonización por *P. jirovecii* entre el 20 y el 69% detectadas por PCR que podría estar influenciado por el recuento de células T CD4+.<sup>5</sup> En los pacientes inmunocomprometidos no VIH, la baja sospecha clínica, lo poco específico de los síntomas y signos, y el menor rendimiento de la IFD explicada por la menor carga infectante, contribuye al retardo en el inicio de tratamiento.<sup>1</sup> En una serie de 448 pacientes no infectados por VIH, con infiltrados pulmonares, la neumonía por *P. jirovecii* fue diagnosticada en 11,8% de estos, de los cuales sólo 74% fueron detectados por técnicas convencionales (IFD o tinción de Giemsa) vs 91% de diagnóstico por PCR.<sup>6</sup>

Un metaanálisis de Lucia et al. describió, para la PCR anidada, una sensibilidad combinada del 98% y una especificidad del 91%.<sup>7</sup> Fauchier et al. describieron el uso de la PCR cuantitativa (qPCR) a través de los valores del umbral de ciclo (CT) el cual permite tener una estimación de la carga fúngica. Cuanto más elevada la carga fúngica, menor el valor de CT. Con base en esto, se propuso un valor de CT por debajo de 27 para descartar la colonización y un valor superior a 30 para el diagnóstico de infección, con una especificidad del 100% y una sensibilidad del 80%.<sup>8</sup> Khan et al., en un estudio de 46 muestras de pacientes VIH y no VIH, encontraron que sólo el 4,3% fueron positivas por IFA, mientras que la PCR simple y la PCR anidada fueron positivas en el 23,9% y el 45,6% de las muestras, respectivamente. Este resultado respalda el uso de PCR en pacientes con sospecha clínica de *Pj* cuando la IFA es negativa.<sup>9</sup> Kaouech et al.

estudiaron 54 pacientes inmunocomprometidos con síntomas clínicos de infección pulmonar. Se diagnosticó Pj en 16 pacientes según técnicas de tinción y/o hallazgos clínicos y radiológicos típicos y/o respuesta al tratamiento. 14 fueron positivos por PCR y solo 5 por examen directo, lo que arrojó una sensibilidad y especificidad de 93,3% y 87,1%, respectivamente para PCR, y de 33,3 y 100% para técnicas de tinción en el examen directo.<sup>10</sup> Robert y col. estudiaron un total de 659 pacientes inmunocomprometidos, de los cuales sólo 43 fueron positivos por microscopía (6.5%). En 497 pacientes tanto el examen microscópico como la qPCR fueron negativos y se excluyó el diagnóstico de Pj. En los 119 pacientes restantes, la microscopía fue negativa y la qPCR fue positiva. La prevalencia de un resultado positivo de qPCR entre pacientes con un examen directo negativo y síntomas pulmonares fue del 19%.<sup>11</sup>

En los pacientes con diagnóstico de VIH, la frecuencia de neumonía aumenta a medida que disminuye el recuento de células T CD4+.<sup>12</sup> La coinfección de *P. jirovecii* con otros agentes microbianos es frecuente. En algunas series se ha reportado hasta un 20% de coinfección identificando algunos microorganismos como CMV, herpes simplex o *C. neoformans*.<sup>3,13</sup> Mootsikapun et al., en su serie de casos, demostraron que el agente causal más frecuente de coinfección, en los pacientes con diagnóstico de VIH, fue *M. tuberculosis* y *Cryptococcus neoformans*. La asociación de infecciones pulmonares fue del 10,5%.<sup>13</sup> Peter et al. identificaron otros patógenos bacterianos en muestras de líquido de LBA en 38 de 512 episodios (7,4%), con la siguiente frecuencia: *Staphylococcus aureus* en 16, *Haemophilus influenzae* en 9, *Streptococcus pneumoniae* en 5, *Pseudomonas aeruginosa* en 4, *Klebsiella pneumoniae* en 2 y *Enterobacter cloacae* en 2.<sup>14</sup> Nuestro estudio demostró que en el 18,8% de las muestras revisadas, *P. jirovecii* se encontraba acompañado de otro patógeno respiratorio (*Mycobacterium tuberculosis* en 2 pacientes y *Streptococcus pneumoniae* en otros 2).

Algunos estudios han descrito factores asociados a mortalidad como la edad, hipoalbuminemia, requerimiento de VM, neumotórax, hipoxemia, anemia, recuento de CD4 bajo.<sup>14,15</sup> Solano et al. describieron 36 pacientes de los cuales 10 (27,8%) fallecieron durante su estancia en UCI (mortalidad del 62,5%) y, de estos, 8 (80%) presentaban diagnóstico de VIH. Como factores asociados a la mortalidad, se encontraron la edad, el requerimiento de VM y la presencia de neumotórax.<sup>15</sup> Walzer et al., en su revisión de 547 es-

tudios de LBA, describen una mortalidad global del 13,5%, coincidiendo en los mismos factores asociados de mortalidad.<sup>14</sup> En nuestro estudio, la mortalidad en pacientes con neumonía por Pj fue de 23%, sin embargo, no se estudiaron los factores asociados.

## Conclusión

En este estudio se describe una cohorte de pacientes con diagnóstico de neumonía por Pj, realizado mediante fibrobroncoscopia y PCR, como único método. La utilización de PCR en muestras de LBA podría constituir un método útil, si estuviera disponible. Sin embargo, su valor debe ser interpretado en el marco de los antecedentes, cuadro clínico y radiológico. También, vale la pena remarcar la importancia de considerar la presencia de coinfecciones por métodos invasivos para un adecuado tratamiento.

**Financiamiento:** los autores declaran que el trabajo no tuvo financiamiento.

**Conflictos de interés:** los autores declaran que no tienen conflictos de intereses relacionados con el tema de esta publicación.

**Contribución de los autores en el manuscrito:** MF, SSH, AG, AS: recolección de datos y escritura del manuscrito. MAM, MCI, SR, PC, GP, VS: escritura y revisión de la escritura.

El Editor en Jefe, Dr. Francisco Arancibia, aprobó este artículo.

## Referencias

1. Cerón I, Rabagliati R, Langhaus J et al. Características clínicas, diagnósticas y pronósticas de pacientes con neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en individuos infectados por virus de inmunodeficiencia humana e individuos inmunocomprometidos por otra etiología: comparative study of cases in HIV-infected patients and immunocompromised non-HIV-infected patients. *Rev Chil Infectol* 2014;31: 417- 424. Doi: doi.org/10.4067/S0716-10182014000400007
2. Latouche S, Poirot J L, Lavrard I, Miltgen M, Nigou M, Roux P. Usefulness of molecular biology for *Pneumocystis carinii* pneumonia epidemiology. *J Eukaryot Microbiol* 1996;43:56S-57S.
3. Cortés-Télles A, Juárez Hernández F, Sagrario Peña Mirabal E. Neumonía por *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con VIH. *Neumol CirTorax* 2011;70: 165-171.
4. Bateman M, Oladele R, Kolls JK. Diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: A review of current methods and novel approaches. *Med Mycol* 2020;58(8):1015-1028. Doi: 10.1093/mmy/myaa024.
5. Vera C, Rueda ZV. Transmission and Colonization of *Pneumocystis jirovecii*. *J Fungi* 2021; 7: 979. https://doi.org/10.3390/jof7110979.
6. Azoulay E, Bergeron A, Chevret S, Bele N, Schlemmer B, Menotti J. Polymerase chain reaction for diagnosing *Pneumocystis pneumonia* in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Chest* 2009; 135 (3): 655-61. Doi: 10.1378/chest.08-1309
7. Martínez Lamas L, Pérez Rodríguez MT, Alvarez Ramos I et al. Papel de *Pneumocystis jirovecii* en pacientes con diferentes patologías pulmonares subyacentes utilizando una PCR anidada. *Rev Esp Quimioter*

- 2018;31: 336-343.
8. 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. *J Clin Microbiol* 2016;54:1487-1495. Doi: 10.1128/JCM.03174-15.
  9. Khan MA, Farrag N, Butcher P. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: immunofluorescence staining, simple PCR or nPCR. *J Infect* 1999;39:77-80. Doi: 10.1016/s0163-4453(99)90106-8.
  10. Kaouech E, Kallel K, Anane S et al. Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii*: étude comparée de la PCR et des techniques de coloration *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: Comparison between conventional PCR and staining techniques]. *Pathol Biol(Paris)* 2009;57:373-377. Doi: doi.org/10.1016/j.patbio.2008.09.013.
  11. Robert-Gangneux F, Belaz S, Revest M et al. Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients by real-time PCR: a 4-year prospective study. *J Clin Microbiol* 2014;52:3370-3376. Doi: 10.1128/JCM.01480-14.
  12. Bava AJ, Cattaneo S, Bellegarde E. Diagnosis of pulmonary pneumocystosis by microscopy on wetmount preparations. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2002; 44:279-82, 2002. Doi: 10.1590/s0036-46652002000500009.
  13. Mootsikapun P, Chetchotisakd P, Intarapoka B. Pulmonary infections in HIV infected patients. *J Med Assoc Thai* 1996 ;79(8):477-85.
  14. Walzer PD, Evans HE, Copas AJ, Edwards SG, Grant AD, Miller RF. Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985-2006. *Clin InfectDis* 2008;15;46:625-33. Doi: 10.1086/526778.
  15. Solano M, Alvarez F, Grau S et al. Neumonía por *Pneumocystis jirovecii*: características clínicas y factores de riesgo asociados a mortalidad en una Unidad de Cuidados Intensivos. *Med Intensiva* 2015;39:13-19. Doi: 10.1016/j.medin.2013.11.006.