

Diagnóstico de pneumocistosis en pacientes infectados con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) a partir de lavados bronquioloalveolares

Dras. Nora Fernández Acosta¹, Raquel Ballesté Alaniz¹,
Beatriz Xavier Garre², Br. Silvia Sabaño³,
Br. Nélica Mousqués Yódice³, Dr. Elbio Gezuele⁴

Resumen

*La pneumocistosis es una enfermedad pulmonar subaguda producida por un hongo oportunista *Pneumocystis carinii* (*P.carinii*).*

*Desde la aparición de los primeros casos del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), la neumonía por *Pneumocystis carinii* es una de las enfermedades respiratorias infecciosas más frecuente en este grupo de pacientes.*

El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia relativa de pneumocistosis en una población de 129 pacientes HIV-SIDA, con enfermedad respiratoria y despistar otras micosis oportunistas pulmonares.

*Las muestras de secreciones pulmonares fueron obtenidas mediante lavado bronquioloalveolar de pacientes con sospecha de pneumocistosis. De las 129 muestras, 86 fueron negativas y 43 positivas para hongos. En 24 se identificó *P.carinii*; en una misma muestra *P.carinii* e *Histoplasma capsulatum*; en tres *H.capsulatum*; en tres *Aspergillus fumigatus*; en dos *Cryptococcus neoformans* y en diez levaduras del género *Candida*. Dentro de las muestras negativas para hongos, en siete se observaron bacilos ácido alcohol resistentes.*

Palabras clave: Neumonía por *Pneumocystis carinii*.

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida – complicaciones

Introducción

La pneumocistosis es una enfermedad pulmonar subaguda causada por un microorganismo oportunista de naturaleza fúngica atípica, *Pneumocystis carinii* (*P.carinii*)⁽¹⁻⁵⁾. Este agente causa neumonía intersticial severa en individuos inmunodeprimidos (especialmente con deterio-

ro de la inmunidad celular), como en los pacientes HIV-SIDA, así como, también, en prematuros, pacientes con inmunodeficiencias congénitas, niños con malnutrición proteico calórica, pacientes con neoplasias hematológicas, trasplantados de médula ósea y en aquellos que reciben tratamientos con fármacos inmunosupresoras⁽⁶⁻⁸⁾.

Desde el punto de vista taxonómico, en los últimos años *P.carinii* ha sido incluido en el reino fungi debido a las características que presenta su genoma; paradójicamente sus formas evolutivas mantienen por el momento la nomenclatura que corresponde a la ubicación taxonómica anterior.

La transmisión por vía aérea se ha podido documentar claramente, pero la fuente de infección, así como la for-

1. Asistente del Departamento de Parasitología.

2. Posgrado de Parasitología Clínica.

3. Ayudante del Departamento de Parasitología.

4. Prof. Agregado del Departamento de Parasitología.

Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina

Correspondencia: Dra. Nora Fernández Acosta. Instituto de Higiene. Departamento de Parasitología. Alfredo Navarro 3051. Montevideo, Uruguay.

Presentado 18/5/99

Aceptado 9/7/99

ma infectante para el hombre, siguen siendo desconocidas⁽⁹⁻¹¹⁾.

Estudios realizados mediante técnicas de biología molecular sugieren que *P. carinii* se halla en el medio ambiente⁽¹²⁾. *P. carinii* ha sido aislado de pulmones de una gran variedad de animales inmunodeprimidos: monos, ratas, ratones, cobayos, conejos, caballos, perros, gatos, ovejas, etcétera. Al parecer existe especificidad de especie, siendo la especie humana *P. carinii var hominis*⁽¹³⁾.

Estudios serológicos poblacionales evidencian que la infección por *P. carinii* se produce a edades tempranas, no existiendo diferencias en cuanto a prevalencia entre las diferentes áreas geográficas⁽¹⁴⁻¹⁶⁾.

Con relación a la patogenia de la pneumocistosis, el primer paso fundamental es la adhesión de las formas tróficas de *P. carinii* a los neumocitos tipo I, la fibronectina establece un puente de unión entre los antígenos de superficie del microorganismo y la célula huésped, estableciéndose prolongaciones digitiformes; además, los receptores de manosa de los macrófagos unen los residuos de manosa de las glicoproteínas de superficie de *P. carinii*. En este proceso se produce un aumento de la permeabilidad de la membrana alvéolo-capilar a través de enzimas de degradación que libera el agente. Una vez adherido al epitelio comienzan a proliferar las formas tróficas, conformando verdaderas masas celulares. *P. carinii* incorpora fosfolípidos, los cuales obtiene del surfactante, lo que conduce a que esta sustancia tensoactiva pierda sus características físico-químicas. Se ha observado también una disminución en la secreción de surfactante por parte de los neumocitos tipo II. Otro evento fisiopatológico importante es que en la reparación del epitelio se observa hiperplasia e hipertrofia de los neumocitos tipo II, los cuales pueden diferenciarse a neumocitos tipo I. Todos estos hechos se hallan en la génesis del colapso alveolar que conduce a la insuficiencia respiratoria observada en la pneumocistosis^(17,18).

Las células T desempeñan un papel importante en la respuesta inmune frente a *P. carinii*.

Los pacientes HIV-SIDA están en riesgo de desarrollar neumonía a *P. carinii* cuando el recuento de linfocitos CD₄ es igual o inferior a 200 células/mm³⁽¹⁹⁾.

La pneumocistosis generalmente es de comienzo insidioso con síntomas inespecíficos como fiebre, tos seca o con escasa expectoración mucosa, repercusión general y luego disnea progresiva.

El examen físico en comparación a la sintomatología es poco revelador; la radiografía de tórax muestra con mayor frecuencia infiltrado intersticial bilateral, intersticio medular e intersticio alveolar; en ocasiones las imágenes son asimétricas o unilaterales y excepcionalmente se observa la presencia de cavidades, neumotórax o nó-

dulos^(20,21). Raramente pueden observarse otros patrones como consolidación focal y difusa de los espacios alveolares, nódulos, neumatoceles así como neumotórax⁽²²⁾.

La insuficiencia respiratoria rápidamente progresiva con radiografía de tórax que muestre un infiltrado intersticial bilateral difuso es considerada por algunos autores como el patrón característico de pneumocistosis⁽²³⁾.

El aumento de LDH con clínica y radiología compatible apoya el diagnóstico, pero no lo confirma⁽²⁴⁾. Para realizar el diagnóstico etiológico es fundamental la obtención de una muestra representativa de secreciones pulmonares. La sensibilidad del esputo inducido se halla entre 50% y 60%, mientras la sensibilidad del lavado bronquioloalveolar es 8%⁽²⁵⁻²⁷⁾.

En este trabajo se realizó un estudio retrospectivo de 129 lavados bronquioloalveolares obtenidos de pacientes HIV-SIDA con enfermedad respiratoria, con el objetivo de determinar la frecuencia relativa de pneumocistosis en la población estudiada y detectar la presencia de otras micosis oportunistas.

Material y método

Se realizó estudio micológico a 129 muestras de lavados bronquioloalveolares de pacientes HIV-SIDA con cuadro clínico-radiológico compatible con el diagnóstico de pneumocistosis pulmonar, internados en distintos centros de asistencia pública de nuestro país en el período comprendido entre 1992 y 1997.

Las secreciones fueron obtenidas mediante fibrobroncoscopia con lavado bronquioloalveolar, la cantidad de muestra que se recibió en el laboratorio fue variable, entre 5 y 8 cm³; luego se centrifugaron en tubos cónicos, estériles, con tapón de rosca, durante diez minutos a 2.500 r.p.m.

Posteriormente el sobrenadante se sembró en gelosa glucosada y peptonada de Sabouraud y en Sabouraud con el agregado de cloramfenicol y actidiona (Micobiotic), incubándose a 28°C durante un mes. Al sedimento se le efectuó examen directo en fresco y con tinta china y coloraciones de Gomori, Gram, Giemsa y Ziehl Neelsen.

El examen directo en fresco además de permitir hacer diagnóstico de algunas micosis sirvió para valorar la representatividad de la muestra. Aquellos lavados que presentaron escasas células provenientes del tracto respiratorio inferior (menos de cinco células por campo de 10x) no fueron incluidos en este estudio.

Se analizó el diagnóstico en relación con la clínica, la radiología y el tratamiento.

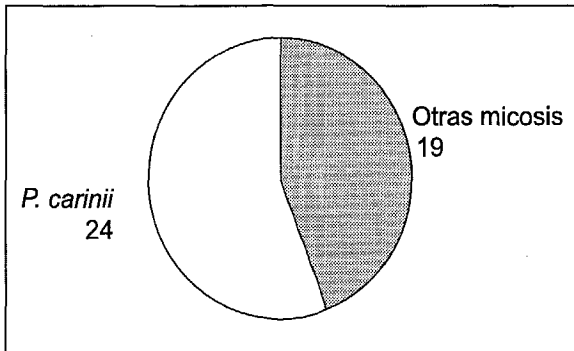
Resultados

De los 129 lavados realizados, 86 fueron negativos para hongos y 43 fueron positivos (tabla 1).

Tabla 1. Lavados bronquioloalveolares estudiados para el diagnóstico de micosis

Total de LBA	LBA negativos	LBA positivos
129	86	43

LBA: lavado bronquioloalveolar

**Figura 1.** Lavados bronquioloalveolares positivos para *P. carinii* 1992-1997 n=43

De las 43 muestras positivas, en 24 se diagnosticó *P. carinii* como único agente (figura 1).

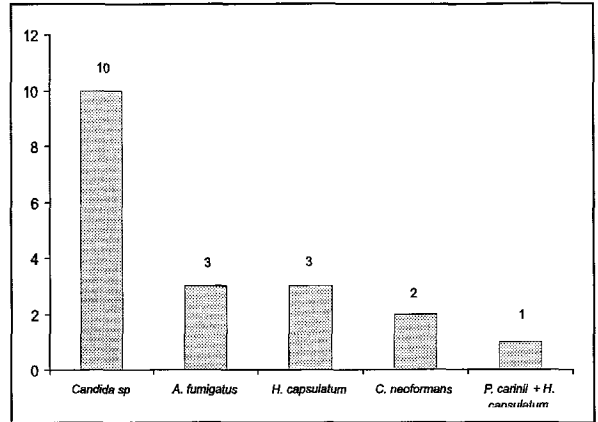
Las técnicas utilizadas para el diagnóstico de pneumocistosis fueron las coloraciones de Giemsa y Gomori en su variante rápida (28).

Con la coloración de Gomori (técnica de impregnación argéntica) los elementos se observan redondeados u ovalados de 4 a 6 micras de diámetro, de color gris a negro intenso, los cuales resaltan sobre fondo verde dado por el colorante de contraste utilizado en este caso (verde luz). Los mismos corresponden a los quistes de la clasificación antigua (figura 1).

Con la coloración de Giemsa se observaron en algunas de las muestras los distintos estadios evolutivos de *P. carinii*: los trofozoitos, caracterizados por su pleomorfismo de 2 a 8 micras de diámetro ameboides, uninucleados, de pared delgada, hallándolos en grupos sobre una sustancia espumosa; las formas prequísticas ovoideas, con un diámetro que oscila entre las 3 y 6 micras, multinucleadas, con dos a seis cuerpos intraquísticos y formas quísticas redondeados u ovalados de 4 a 6 micras de diámetro, con una gruesa pared dentro de los que se observan ocho cuerpos intraquísticos puntiformes de 1 a 2 micras dispuestos en forma radiada en la periferia (figura 2).

En una misma muestra se halló *P. carinii* e *H. capsulatum*; en tres *H. capsulatum*; en tres *Aspergillus fumigatus*; en dos *Cryptococcus neoformans* y en diez levaduras del género *Candida* (figura 2).

En siete de las muestras negativas para hongos se ob-

**Figura 2.** Otras micosis diagnosticadas a partir de lavados bronquioloalveolares 1992-1997 n=19

servó con la coloración de Ziehl Neelsen bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) extracelulares, confirmándose posteriormente en el Laboratorio de la Comisión Honoraria para la Lucha Antituberculosa (CHLA) que correspondían a *Mycobacterium tuberculosis*.

Aquellos pacientes en los que se diagnosticó *P. carinii*, presentaban clínica y radiografía de tórax compatible con pneumocistosis. Dentro de las muestras negativas que fueron estudiadas, 18 correspondieron a pacientes con clínica y radiología compatible con pneumocistosis, con relación a ello se destaca: 11 de ellos habían iniciado tratamiento empírico con trimetoprim-sulfametoxazol, tres no estaban recibiendo tratamiento específico y en cuatro lo desconocemos.

Discusión

En las muestras estudiadas, en 18,6% de ellas se confirmó la presencia de *P. carinii* por examen micológico directo; asimismo estos pacientes presentaban clínica y radiología compatible con pneumocistosis.

Sin lugar a dudas, a pesar de los numerosos avances en el área de diagnóstico de las micosis, el examen micológico directo sigue siendo fundamental en la pneumocistosis, dado que:

1. Este microorganismo no se ha podido cultivar en los medios habituales que se utilizan en micología. Se han obtenido resultados satisfactorios en cultivos celulares, los que se emplean en centros de investigación (29).
2. Con las coloraciones de Giemsa y Gomori podemos obtener un diagnóstico rápido y específico mediante la visualización del agente en aproximadamente 40 minutos, lo que permite instaurar el tratamiento etiológico en el menor tiempo posible, con los beneficios que ello representa.
3. Existen técnicas de inmunofluorescencia directa que

utilizan anticuerpos monoclonales; algunos autores consideran estas pruebas más sensibles y específicas que las coloraciones anteriores⁽³⁰⁾; varias de las muestras fueron testadas por este método, pero los resultados no fueron incluidos en este estudio ya que no fue posible efectuarlo en la totalidad de los lavados bronquioloalveolares.

4. La serología para neumocistosis no ha mostrado buenos resultados ya que la mayoría de la población tiene anticuerpos circulantes anti *P. carinii*, a ello se suma que los pacientes inmunodeprimidos presentan disminución o ausencia de la respuesta humoral⁽²⁴⁾.
5. Se han realizado ensayos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) siendo los resultados poco alentadores y no viables para diagnóstico de rutina⁽²⁴⁾.

En el caso de los pacientes con clínica y radiología compatible con pneumocistosis en los que el examen micológico fue negativo para *P. carinii*, se destaca que 11 de ellos estaban recibiendo tratamiento empírico con trimetoprim-sulfametoxazol. Si bien luego de instaurado el tratamiento específico las formas evolutivas del hongo pueden hallarse durante varios días en las secreciones pulmonares, al igual que en otras enfermedades infecciosas la terapéutica disminuye la sensibilidad de los métodos diagnósticos, por lo que se cree que esto pudo influir en los hallazgos.

En la casuística estudiada sólo se analizan los resultados micológicos, diagnosticándose otras micosis oportunistas como aspergilosis, histoplasmosis y criptococosis. Dado que la coloración de Ziehl Neelsen es utilizada de rutina en el procesamiento de muestras para examen micológico, ésta permitió detectar la presencia de BAAR. Se destaca que esta técnica de fácil y rápida realización tiene gran importancia ya que la tuberculosis es de elevada frecuencia en pacientes HIV-SIDA. Las levaduras del género *Candida* aisladas fueron consideradas como contaminantes por haber desarrollado solo en los cultivos y no haberse observado en el examen micológico directo abundantes levaduras con pseudo-filamentos. Se destaca que el diagnóstico de candidiasis pulmonar es difícil de realizar; hay que asegurarse que la muestra a examinar no se haya contaminado en su pasaje por el tracto respiratorio superior y cavidad orofaríngea. En los pacientes HIV positivos, las manifestaciones clínicas, así como los hallazgos radiológicos, en ocasiones pueden corresponder a más de una enfermedad infecciosa, por lo que adquiere relevancia la búsqueda de los agentes etiológicos más frecuentes en el medio (virales, bacterianos, micóticos y parasitarios), sobre todo en aquellos que no presentan sintomatología respiratoria de tipo intersticial.

Conclusiones

La neumonía por *P. carinii* en nuestro medio al igual que en otros países del mundo ocupa el primer lugar dentro

de las infecciones respiratorias bajas producidas por agentes micóticos en pacientes HIV-SIDA.

El lavado bronquioloalveolar ofrece mayores posibilidades diagnósticas dadas las características clínicas de esta neumonía, en la cual el estudio micológico directo adquiere especial relevancia, pudiéndose obtener resultados en 40 minutos, empleándose como coloraciones de elección el Gomori y el Giemsa.

En el caso de la histoplasmosis, la forma clínica más frecuente en este grupo de pacientes es la histoplasmosis aguda diseminada, la que se diagnostica en la mayoría de los casos por el examen micológico de las lesiones mucocutáneas, y en pocas ocasiones se aísla *Histoplasma capsulatum* a partir de lavado bronquioloalveolar, ya que lo habitual es que se realice para ello el estudio de lesiones cutáneo-mucosas. La aspergilosis pulmonar invasiva presenta baja incidencia en la muestra estudiada.

Summary

Pneumocystosis is a subacute pulmonary disease due to fungus *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*). *Pneumocystis carinii* pneumonia has been one of the most frequent respiratory diseases among patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) since the first cases appeared.

The aims of the present paper are to determine relative frequency of pneumocystosis in a population of 129 patients with AIDS-HIV and respiratory disorders, and to discard other pulmonary mycoses.

Pulmonary secretion was collected through bronchioloalveolar washing among patients suspected of pneumocystosis. Out of 129 samples from patients of the population, 86 cultures were negative and 43 positive. Studies of positive samples revealed evidence of *P. carinii* in 24 cultures, *P. carinii* and *capsulatum histoplasma* in one; *capsulatum histoplasma* in three; *Aspergillus fumigatus* in three, *Cryptococcus neoformans* in two, and *Candida yeat* in ten. Seven negative cultures (total: 86) showed acid-ethanol resistant bacillus.

Résumé

La pneumocystose est une maladie pulmonaire subaigue produite par un champignon opportuniste *P. carinii*.

Depuis l'apparition des premiers cas de SIDA, la pneumonie par *P. carinii* est l'une des maladies respiratoires infectieuses les plus fréquentes chez ces patients.

Le but de ce travail a été de déterminer la fréquence relative de pneumocystose dans une population de 129 patients HIV-SIDA, à pathologie respiratoire et de dépister d'autres mycoses opportunistes pulmonaires.

Les échantillons de sécrétions pulmonaires ont été obtenues au moyen de lavement broncho-alvéolaire de patients soupçonnés de pneumocystose. Parmi les 129 échanti-

llos, 86 ont été négatifs et 43 positifs pour les champignons. Dans 24 on a identifié *P. carinii*, dans un même échantillon *P. carinii* et *Hystoplasma capsulatum*; dans 3 *H. capsulatum*; dans 3 *Aspergillus fumigatus*; dans 2 *Cryptococcus neoformans* et dans 10 levures du genre *Candida*. Parmi les échantillons négatifs pour champignons, 7 ont présenté des bacilles acides alcool résistants.

Bibliografía

- Cushion MT, Harmsen A, Matsumoto Y, Stringer JR, Wakefield AE, Yamada M. Recent advances in the biology of *Pneumocystis carinii*. J Med Vet Mycol 1994; 32 (1):217-28.
- Stringer JR, Edman JC, Cushion MT, Richards FF, Watanabe J. The fungal nature of *Pneumocystis carinii*. J Med Vet Mycol 1992; 30 (1):271-8.
- Wakefield AE, Peters SE, Banerji S, Bridge PD, Hopkin JM. *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. Mol Microbiol 1992; 6:1903-11.
- Ypma-Wong MF, Fonzi WA, Sypherd PS. Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. Infect Immun 1992; 60:4140-5.
- Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood JH, Sagin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. Nature 1988; 334:519-22.
- Selik RM, Starcher T, Curran JW. Opportunistic diseases reported in AIDS patients: frecuencies, associations and trends. AIDS 1987; 1:175-82.
- Chanock S. Evolving risk factors for infectious complications of cancer therapy. Hematol Oncol Clin North Am 1993; 7:771-93.
- Chave JP, David S, Wauters JP, Van Melle G, Francioli P. Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. AIDS 1991; 5: 927-32.
- Cailliez J, Séguy N, Denis CM, Aliouat EM, Mazars L, Polonelli L, et al. *Pneumocystis carinii*: an atypical fungal micro-organism. J Med Vet Mycol 1996; 34:227-39.
- Frenkel JK, Good JT, Shultz JA. Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse and chemotherapy. Lab Invest 1966; 15:1559-77.
- Walzer PD. Experimental models of *Pneumocystis carinii* infection. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia. New York: Marcel Dekker, 1984:31-43.
- Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f.sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* in samples of air spora. J Clin Microbiol 1996; 34: 1754-9.
- Aliouat EM, Mazars E, Dei -Cas E et al. *Pneumocystis carinii* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. J Eukaryot Microbiol 1994; 42: 71S.
- Peglow SL, Smulian AG, Linke MJ, Pogue CL, Nurre J, Crisler JP, et al. Serologic responses to specific *Pneumocystis carinii* antigens in health and disease. J Infect Dis 1990; 161:296-306.
- Chusid MJ, Heyrman KA. An outbreak of *Pneumocystis carinii* pneumonia at a pediatric hospital. Pediatrics 1978; 62:1031-5.
- Enelon LE, Keane CT, Bakir M, Temperley J. A cluster of *Pneumocystis carinii* infections in children. Br Med J 1985; 291:1683.
- Ezekowitz RAB, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MYK, Warner A, Richards FF et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. Nature 1991; 351:155-8.
- Pottratz ST, Paulsrud J, Smith JS, and Martin WJ. *Pneumocystis carinii* attachment to cultured lung cells by pneumocystis gp 120, a fibronectin binding protein. J Clin Invest 1991; 88:403-7.
- Kovacs JA, Hiemenz JW, Macher AM. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. Ann Intern Med 1984; 100:663-71.
- Brenner M, Ognibene FP, Lack EE. Prognostic factors and life expectancy of patients with acquired immunodeficiency syndrome and *Pneumocystis carinii* pneumonia. Am Rev Respir Dis 1987; 136:1199-206.
- Braselli A, Purtscher H, Savio E, Cardozo A, Mansilla M, Lowinger M, et al. Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. In: Braselli A, Purtscher H, Savio E. Enfermedades Infecciosas. 2ª ed. Montevideo: Oficina del Libro, 1996:91-117, vol 1.
- Cohen BA, Pomeranz S, Rabinowitz JG, Rosen MJ, Train JS, Norton KI et al. Pulmonary complications of AIDS: radiologic features. AJR 1984; 143:115-22.
- Hopewell P. Pneumonia: Diagnosis. J Infect Dis 1988; 157 (6):1115-9.
- Tassara R, Weitz JC. Neumocistosis. In: Atias A. Parasitología Médica. 4ªed. Santiago de Chile: Mediterráneo, 1998:280-5.
- Bigby TD, Margolskee D, Curtis JL, Michael PF, Shepard D, Hadley WK et al. The usefulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. Am Rev Respir Dis 1986; 133:589-93.
- Coleman DL, Dodek PM, Luce JM, Golden JA, Gold WM, Murray JF. Diagnostic utility of fiberoptic bronchoscopy in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia and the acquired immune deficiency syndrome. Am Rev Respir Dis 1983; 128:795-9.
- Broaddus C, Dake MD, Stulbarg MS, Blumenfeld W, Hadley WK, Golden JA et al. Bronchoalveolar lavage and transbronchial biopsy for the diagnosis of pulmonary infections in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann Intern Med 1985; 102:747-52.
- Witkind J. Técnica rápida del método de Gomori para la detección de hongos. Rev Urug Patol Clin 1966; 4 (2):145-8.
- Aliovet EM, Dei-Cas E, Billout P, Dujardín L, Canuus D. *Pneumocystis carinii* organisms from in vitro culture are highly infectious to the nude rat. Parasitol Res 1995; 81:82-5.
- Gill VJ, Evans G, Stock F, Parrillo JE, Masur H, Kovacs JA. Detections of *Pneumocystis carinii* by fluorescent- antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. J Clin Microbiol 1987; 25: 1837-40.