

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**VALIDACIÓN DE MÉTODO DE PCR TIEMPO REAL  
PARA CUANTIFICAR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*  
EN MUESTRAS RESPIRATORIAS NO INVASIVAS Y EN TEJIDO PULMONAR**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica  
área de especialización en Bioquímica Clínica y  
Memoria para optar al título profesional de Bioquímico**

**Por:**

**JAIME FELIPE ASTORGA SAAVEDRA**

**Director de Tesis**

**Dr. Sergio Vargas Munita**

**SANTIAGO - CHILE  
2011**

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco por la oportunidad de realizar esta tesis, a Sergio Vargas;  
por su oportuna y valiosa guía docente, a Carolina Ponce y Alfonso Paredes;  
por su muy buena disposición, a Rebeca Bustamante, Patricia Pizarro, Andrea Araya, Nelson Ponce,  
Francisco Pérez, Germán Hermosilla, Carmen Romero, Mercedes Zaldívar y Laura Astorga;  
por su gran esfuerzo y cariño, y por apoyarme todos estos años, agradezco a mi Familia,  
y más que a nadie, agradezco a Jehová Dios por su ayuda indispensable,  
y por mostrarme una pequeña parte de su impresionante sabiduría plasmada en su creación.*

*Mayo de 2011*

## ÍNDICE

Resumen	4
Summary	6
I. Introducción	8
Antecedentes biológicos de <i>Pneumocystis</i>	8
Trascendencia clínica de <i>Pneumocystis</i>	9
Infección y Neumonía por <i>Pneumocystis</i> (PCP)	10
Colonización	10
Infección Primaria	11
Métodos de detección y diagnóstico para <i>Pneumocystis jirovecii</i>	12
Identificación de <i>Pneumocystis jirovecii</i> por microscopía	12
PCR convencional y PCR anidada	12
PCR Tiempo Real	13
II. Hipótesis y Objetivos	17
III. Metodología	18
Del objetivo específico 1	18
Del objetivo específico 2	19
Del objetivo específico 3	20
Del objetivo específico 4	21
IV. Resultados	23
Del objetivo específico 1	23
Del objetivo específico 2	25
Del objetivo específico 3	31
Del objetivo específico 4	38
V. Discusión	41
Referencias	44
Apéndice	48

## RESUMEN

*Pneumocystis jirovecii* es un microorganismo fúngico capaz de infectar el tracto respiratorio de individuos con algún tipo de inmunocompromiso, y causarles neumonía por *Pneumocystis* (PCP). Investigaciones más recientes han comprobado que *P. jirovecii* también se puede hallar en el tracto respiratorio de personas aparentemente inmunocompetentes, sobre todo en lactantes menores de un año de edad, en quienes se denomina “infección primaria”. Aquellos hospederos en quienes se ha detectado el microorganismo en muestras respiratorias, pero que no presentan sintomatología de PCP, se consideran “colonizados” por *Pneumocystis*. A pesar de los avances en la investigación básica, clínica y epidemiológica de *Pneumocystis*, no se ha comprobado si el hongo contribuye a la morbilidad de enfermedades respiratorias que a veces presentan pacientes adultos colonizados o lactantes con infección primaria.

En vista de lo anterior, y considerando el inconveniente que *Pneumocystis* no es un hongo cultivable hasta el momento, ha surgido la necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección y cuantificación de *Pneumocystis* que permitan estudiar más a fondo su relevancia clínica y epidemiológica, sobre todo en los grupos de pacientes inmunocompetentes antes mencionados. A este respecto, durante la última década se ha aplicado la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (q-PCR [*quantitative*]) para la detección de *Pneumocystis*, la cual permite cuantificar carga de microorganismo en muestras biológicas, incluso cargas bajísimas que comúnmente no son detectadas por los métodos convencionales. Pero, además de esto, q-PCR permite comparar carga de *P. jirovecii* entre muestras distintas procedentes del mismo o de distintos pacientes, si se realiza el procedimiento de cuantificación relativa. Esto consiste en normalizar la carga absoluta de microorganismo con la cantidad de DNA humano hallado en la misma muestra, de modo que el cociente resultante es la carga relativa.

Teniendo estos antecedentes, se montó y estandarizó el método de q-PCR para cuantificar *P. jirovecii* en pacientes colonizados, tanto adultos como lactantes de diversas edades, mediante el análisis de muestras invasivas (tejido pulmonar) y no invasivas (aspirado nasofaríngeo, gargarismo e hisopado nasofaríngeo). Se escogió como gen blanco a *MSG*, un gen multicopia que codifica para la principal glicoproteína de superficie de *Pneumocystis*.

La cuantificación relativa de *P. jirovecii* mostró que hay cargas significativamente distintas del microorganismo entre ciertos grupos etarios de lactantes colonizados fallecidos por Síndrome de Muerte Súbita (SMS). En otros grupos de pacientes colonizados (adultos y lactantes sanos) no se observaron diferencias significativas de carga relativa de *P. jirovecii* entre distintas edades. Se evidenció en la mayoría de los grupos de pacientes que la cuantificación relativa presenta un patrón de cargas distinto para cada rango de edad, respecto al patrón obtenido de la cuantificación absoluta. Además, se investigó cuánto afecta la naturaleza de las muestras en la precisión de los resultados. En el caso de las muestras que no son homogéneas, como secreciones respiratorias, se obtuvieron cantidades muy variables de DNA humano, independientemente del tamaño de la muestra, lo cual produjo resultados con mayor variabilidad respecto a los obtenidos para muestras más homogéneas, como tejido pulmonar.

En conclusión, este trabajo demuestra la importancia de utilizar resultados expresados como cuantificación relativa, que a diferencia de la absoluta, permite comparar carga de *Pneumocystis* entre distintas muestras, tras haber eliminado ciertos factores que inducen a obtener conclusiones distorsionadas. Además se evidenció la necesidad de escoger el tipo de muestra más apropiado para obtener resultados más confiables y precisos, al menos para el área de investigación.

Esta investigación contribuye a validar una valiosa herramienta de detección que permite comparar carga de *Pneumocystis* entre distintas muestras. Su alta sensibilidad hace posible su aplicación incluso en muestras de pacientes colonizados por *Pneumocystis*, cuyas cargas de microorganismo generalmente son demasiado bajas e indetectables por otros métodos. El contar con esta nueva herramienta en nuestro país, nos permitirá investigar más a fondo la trascendencia clínica de *P. jirovecii* en la salud de pacientes colonizados y lactantes con infección primaria, con o sin enfermedades respiratorias. Así, este trabajo de tesis aporta un respaldo científico a la nueva aplicación de comparar muestras, utilizando el método más avanzado de diagnóstico molecular de *Pneumocystis*.

## SUMMARY

*Pneumocystis jirovecii* is a fungal microorganism that infects the respiratory tract of immunocompromised patients and it may cause *Pneumocystis pneumonia* (PCP). Recent research has demonstrated that *P. jirovecii* can also be found in the respiratory tract of apparently immunocompetent patients, especially in infants younger than one year of age; in this case it is called “primary infection”. Those hosts that show this microorganism in their respiratory samples, but who have no PCP symptoms, are known as “*Pneumocystis* colonized”. Despite of the recent advances in basic, clinical and epidemiologic investigation of *Pneumocystis*, there is no demonstration whether this fungus affects morbidity of respiratory diseases, which are sometimes present in colonized adult patients or infants with primary infection.

In view of this, and considering the inconvenience that, to date, *Pneumocystis* cannot be cultured, it is necessary to develop new methods to detect and to quantify *Pneumocystis* in order to study its clinical and epidemiological relevance more deeply, especially in the immunocompetent patients mentioned before. On that score, during the last decade, the technology of Real Time Polymerase Chain Reaction (q-PCR [quantitative]) has been applied for the detection of *Pneumocystis*. This technology allows to quantify load of microorganism in biological samples, even in very low loads which cannot be commonly detected by conventional methods. In addition to this, q-PCR allows the comparison of *P. jirovecii* loads among different samples taken from the same or different patients, if relative quantification is calculated. In procedure, the absolute load of microorganisms is normalized with the amount of human DNA found in the same sample, so the result is the relative load.

With this information, we established and standardized a q-PCR method in order to quantify *P. jirovecii* in colonized patients, both adults and infants at several ages, through the analysis of invasive (pulmonary tissue) and non invasive samples (nasopharyngeal aspirate, oral wash and nasopharyngeal swab). *MSG* was chosen as target gene, this is a multicopy gene which codes for the Major Surface Glycoprotein of *Pneumocystis*.

The relative quantification of *P. jirovecii* showed significantly different loads of microorganism between several age groups of colonized infants who had died of Sudden Infant Death Syndrome (SIDS). Within others colonized patient groups —healthy adults and infants— no significant differences were observed in relative load of *P. jirovecii* between different ages. In most patient groups, it was apparent that relative quantification shows a different load tendency for each age range, compared with the tendency obtained from absolute quantification. In addition, we investigated the influence of sample composition on the precision of the results. In case of non homogeneous samples, such as respiratory samples, variable quantities of DNA were obtained, independent of the sample size. This produced more variability of results, with regard to those obtained from homogeneous samples, such as pulmonary tissue.

In conclusion, this work demonstrates the relevance of using results expressed as relative quantification, which, unlike absolute quantification, allows the comparison of *Pneumocystis* load between different samples, by

eliminating some factors which drive to wrong conclusions. Furthermore, the need of choosing the best sample type in order to obtain results more reliable and precise, at least for research purpose, was demonstrated.

This research work contributes to the validation of a useful detection tool, which allows comparing *Pneumocystis* load between different samples. Its high sensitivity makes it possible to use this technology even in *Pneumocystis* colonized patients, in which loads of microorganism are generally too low to be detected by other methods. To have this novel tool in our country, will allow us to investigate in depth the clinical relevance of *P. jirovecii* in health of colonized patients and infants with primary infection —with or without respiratory diseases. Therefore, this thesis work provides a scientific support to the novel application of comparing samples, using the most advanced, molecular diagnostic method for *Pneumocystis*.

# I. INTRODUCCIÓN

*Pneumocystis* es un microorganismo del reino fungi capaz de infectar el tracto respiratorio de humanos y de muchos otros mamíferos <sup>[49, 20]</sup>. La Neumonía producida por *Pneumocystis* (PCP) es la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), pero también se presenta frecuentemente en pacientes con neoplasias o transplantados a quienes se les ha prescrito tratamientos inmunosupresores <sup>[48, 66]</sup>. Sin embargo, en años recientes se ha descubierto que *Pneumocystis* también puede “colonizar” el tracto respiratorio de personas sin inmunocompromiso aparente, incluyendo a muchísimos lactantes menores de un año de edad, en quienes se denomina “infección primaria” por *Pneumocystis* <sup>[29, 54, 56, 58]</sup>. Las implicancias clínicas de la colonización e infección primaria aún están siendo estudiadas, pero como *Pneumocystis* no es un hongo cultivable hasta el momento <sup>[12, 31]</sup>, es esencial contar con un método de detección cuantitativo, sensible y confiable, que permita comparar carga de *Pneumocystis* en distintas muestras clínicas obtenidas del tracto respiratorio de estos pacientes.

## ANTECEDENTES BIOLÓGICOS DE PNEUMOCYSTIS

En 1909, *Pneumocystis* fue observado por primera vez por Carlos Chagas en muestras de pulmón de cuyes; pero no fue hasta 1912 cuando el matrimonio Delanoë denominó al microorganismo —entonces hallado en pulmones de ratas— con el nombre de *Pneumocystis carinii*, en honor a Antonio Carini, quien les había mandado las muestras para estudio <sup>[43, 49]</sup>. Inicialmente se clasificó a *Pneumocystis* como un protozoo, pero en 1988 se le reconoció filogenéticamente como parte del reino fungi, al haber secuenciado su subunidad pequeña de RNA ribosomal y hallar que este microorganismo se relaciona más estrechamente con los hongos <sup>[6, 49]</sup>.

No se ha descubierto con certeza un nicho ecológico de *Pneumocystis*, sino solamente dentro del tracto respiratorio de varias especies de hospederos mamíferos, como rata, ratón y humano. Además, es especie-específico, es decir, existe una determinada forma o variante de *Pneumocystis* capaz de infectar a solo una especie de mamífero. De modo que la forma que infecta a humanos se denomina *Pneumocystis jirovecii*, mientras que la que infecta a ratas permaneció con el nombre *Pneumocystis carinii* <sup>[20, 46, 49]</sup>. Las diferentes formas difieren en su genética, y no está claro por qué este organismo tiene requerimientos de hospedero tan estrictos <sup>[49]</sup>.

Aunque *Pneumocystis* no se ha logrado cultivar exitosamente, gracias a las técnicas de tinción y observación por microscopía se han identificado dos formas básicas de su ciclo de vida, llamadas quiste y trofozoíto. El quiste es la forma de reproducción sexual del hongo, que da origen a ocho trofozoítos haploides. La reproducción de *Pneumocystis* también puede ser asexual, por un proceso de fisión binaria de un trofozoíto <sup>[28, 43, 49]</sup>.

La manera actual más común de investigar a *Pneumocystis* es aislar los organismos desde ratas infectadas experimentalmente, de modo que la forma más estudiada es *P. carinii*. De hecho, ya se ha secuenciado el genoma de *P. carinii*, de un tamaño de 7,7 Mb en 15 cromosomas lineales. Además se han caracterizado unos 30 genes estructurales y funcionales, tanto de *P. carinii* como de *P. jirovecii*, entre ellos, el gen *DHFR* que codifica la enzima



dihidrofolato reductasa, el gen *DHPS* (dihidropteroato sintasa), *HSP70* (*heat shock protein 70*) y *TS* (timidilato sintasa) [7, 8, 15, 26, 44, 49 (Supl. Inf.)].

Uno de los genes de *Pneumocystis* que también ha sido estudiado ampliamente es el gen multicopia que codifica para la principal glicoproteína de superficie del hongo: MSG o GpA (*Major Surface Glycoprotein* o Glicoproteína A) [17, 49]. Se ha vinculado la glicoproteína MSG con la función de adhesión del hongo a los neumocitos tipo I, mediante un puente de fibronectina, y con una función de evasión del sistema inmune del hospedero [24]. Se estima que en el genoma de *Pneumocystis* hay entre 50 y 100 copias del gen *MSG*, de unas 3000 kb cada una, las cuales no son exactamente iguales en su secuencia nucleotídica. Este gen consta de una amplia región variable y una región altamente conservada de menor tamaño. Esta última está ubicada en el principio de la región codificante y su secuencia es común en todas las copias de *MSG* (*Figura 1, en Metodología*). La región variable genera una diversidad muy amplia de *MSG*; de hecho se ha observado que en una muestra de *P. jirovecii* tomada de un ser humano, se pueden hallar muchas secuencias de *MSG* distintas. Además, las familias de *MSG* también varían entre distintas especies de *Pneumocystis* (*P. jirovecii*, *P. carinii*, *P. muris*), lo cual se podría relacionar con su comportamiento especie-específico tan estricto [19].

De todo el repertorio de *MSG* existente en el genoma de *Pneumocystis*, es solo una copia la que se expresa en cada organismo, dando lugar a una determinada isoforma de proteína que se transporta a la superficie celular para ser expuesta. Lo que determina cuál copia del gen *MSG* se expresa en cada organismo es una secuencia conservada de copia única llamada *Upstream Conserved Sequence (UCS)*, capaz de recombinar con cualquier secuencia de *MSG* y permitir su transcripción. Así, la copia de *MSG* que se expresa queda localizada inmediatamente río abajo de la secuencia *UCS* [49, 60]. Este mecanismo de regulación de la expresión de *MSG* es lo que le da la capacidad de variación antigénica a *Pneumocystis* [18, 45, 47, 60]. En vista de estos antecedentes, probablemente *MSG* cumple un rol importante en la infectividad de *Pneumocystis*, pudiendo ser éste un factor que contribuye notablemente a su extendida colonización, como se comentará más adelante. Por otro lado, no se ha hallado que esta familia de genes esté presente también en otros microorganismos patógenos; por esto, se podría decir que *MSG* es un “arma de invasión” exclusiva de *Pneumocystis*.

## TRASCENDENCIA CLÍNICA DE PNEUMOCYSTIS

Durante la década de 1960 se conoció a *Pneumocystis* como un patógeno pulmonar oportunista que infectaba a niños con inmunodeficiencia primaria y a pacientes con tratamientos inmunosupresores contra el cáncer o para tolerar transplantes de órganos [43]. Con la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) en la década de 1980, los casos de infección por *Pneumocystis* aumentaron, y llegó a convertirse en la enfermedad característica de la etapa SIDA en los pacientes VIH positivos [43, 49]. Por otro lado, aunque la neumonía por *Pneumocystis* (PCP) aparentemente la padecen solo pacientes con inmunocompromiso, no se sabe con certeza si este patógeno incide en cierto grado en la morbilidad de otros cuadros clínicos respiratorios de pacientes aparentemente

inmunocompetentes colonizados por *P. jirovecii*, es decir, pacientes con una baja carga del microorganismo en su tracto respiratorio y carentes de la sintomatología de PCP.

- **INFECCIÓN Y NEUMONÍA POR *PNEUMOCYSTIS* (PCP)**

Actualmente es más aceptada la hipótesis de que la aparición de PCP en un hospedero sucede por transmisión aérea del hongo de persona a persona, más bien que la reactivación de una infección anterior que se mantuvo en estado asintomático latente<sup>[32, 53, 63]</sup>. Cuando *P. jirovecii* invade a su hospedero, al llegar a los alvéolos se adhiere a los neumocitos tipo I, generando una respuesta inflamatoria mediada por linfocitos T CD4+<sup>[48, 65]</sup>. Los síntomas más comunes de PCP en pacientes inmunocomprometidos son hipoxemia, fiebre baja, tos improductiva, disnea (que puede evolucionar a neumotórax), taquipnea y taquicardia. La radiografía de tórax en PCP generalmente presenta infiltrados intersticiales perihiliares bilaterales<sup>[48, 66]</sup>. Sin embargo, como la sintomatología es inespecífica, se hace difícil llegar al diagnóstico de PCP basándose sólo en el examen físico. Por ello, para confirmar un cuadro de PCP se necesita verificar la presencia de *P. jirovecii* en muestras de secreción respiratoria del paciente mediante métodos de tinción y visualización por microscopía, y adicionalmente es posible complementar el diagnóstico detectando su DNA mediante técnicas de biología molecular<sup>[48]</sup>.

- **COLONIZACIÓN**

La colonización por *Pneumocystis* —también denominada infección subclínica o portación— consiste en la detección del microorganismo o su DNA en un paciente que no presenta signos ni síntomas de neumonía por *Pneumocystis*<sup>[33]</sup>. Comparados con pacientes PCP, los individuos colonizados presentan una baja carga de microorganismo en su tracto respiratorio; aun así, tienen el riesgo de desarrollar PCP y también pueden transmitir el microorganismo a otras personas. Esto último, junto con otros antecedentes epidemiológicos, apoya la hipótesis de que los mismos individuos sanos pueden ser un reservorio de *Pneumocystis*<sup>[29, 33]</sup>.

Mientras que la patología de PCP aparentemente ocurre sólo en pacientes inmunocomprometidos, la colonización por *Pneumocystis* ocurre en una amplia gama de personas inmunocompetentes, con o sin alguna enfermedad respiratoria. Se ha detectado, por métodos de biología molecular, la presencia del microorganismo en muestras de secreciones respiratorias y de tejido pulmonar de autopsia de pacientes de todas las edades. Entre los individuos adultos aparentemente inmunocompetentes, se ha hallado colonización en pacientes con desórdenes pulmonares primarios o crónicos, como bronquitis, fibrosis quística, EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) y cáncer pulmonar de células pequeñas. Pero también se ha detectado la presencia de *Pneumocystis* en personas sin patologías pulmonares: embarazadas, trabajadores de la salud con o sin contacto con pacientes con PCP y en personas sanas de la comunidad<sup>[27, 29, 33, 55, 57]</sup>.

Por otra parte, los estudios epidemiológicos en lactantes aparentemente inmunocompetentes muestran que la colonización por *Pneumocystis jirovecii* se presenta en proporciones bastante altas<sup>[33]</sup>. En algunas de estas investigaciones se han analizado muestras de secreciones respiratorias de lactantes con síntomas de infecciones respiratorias leves o bronquiolitis, hallándose hasta un 32% de pacientes colonizados<sup>[23, 35, 56]</sup>. Es de interés que cerca

de un 10% de los lactantes colonizados presentaban episodios de apnea <sup>[56]</sup>, y más aún, se ha encontrado un considerable porcentaje de colonización en pulmones de lactantes fallecidos por síndrome de muerte súbita, comparado con el porcentaje de colonización en lactantes fallecidos por otras causas <sup>[33, 54]</sup>.

Además de estos estudios epidemiológicos, se sabe muy poco de las consecuencias clínicas que pudiesen resultar de la colonización por *Pneumocystis*. Por ejemplo, además de que la colonización podría conducir a PCP o a la transmisión del microorganismo a otras personas, esta condición clínica igualmente podría estimular la inflamación pulmonar con su consiguiente daño al tejido. Aunque no ha sido estudiada a fondo la respuesta inmune en pacientes colonizados, se sabe que en aquellos individuos colonizados y con enfermedad broncopulmonar crónica, hay un aumento de linfocitos T CD4+ y de ciertas citoquinas proinflamatorias <sup>[33, 52]</sup>.

Todos estos antecedentes ponen de relieve que la colonización por *Pneumocystis jirovecii* es más común de lo que la comunidad pueda suponer. Asimismo, si la incidencia de adquisición del hongo en lactantes y niños es sorprendentemente alta <sup>[37, 56]</sup>, ¿cuánto significado adicional tendrá la colonización por *Pneumocystis* en la salud pública?

- **INFECCIÓN PRIMARIA**

Cuando *Pneumocystis jirovecii* infecta por primera vez el tracto respiratorio de un lactante, se habla de infección primaria, ya sea en pacientes inmunocompetentes o inmunocomprometidos. En la década de 1970 se investigó mediante serología la infección primaria por *P. jirovecii*, y se encontró una alta incidencia de anticuerpos anti-*Pneumocystis* en lactantes y niños inmunocompetentes sanos menores de cuatro años <sup>[37]</sup>. Más recientemente, se ha encontrado infección primaria —detectando DNA de *P. jirovecii* en muestras de secreción respiratoria— en más de un 30% de lactantes inmunocompetentes menores de un año, que presentan al menos un episodio de infección respiratoria leve <sup>[56]</sup>. Además, los mayores porcentajes de positividad de *P. jirovecii* en los lactantes se sitúan en el rango de edad de 2 a 4 meses <sup>[23, 58]</sup>. Después, el mismo sistema inmune del paciente elimina el microorganismo del tracto respiratorio y se observa la seroconversión, es decir, se logra detectar anticuerpos anti-*Pneumocystis jirovecii* algunos meses después del primer contacto con el hongo <sup>[50, 56]</sup>.

Como es sabido, en niños inmunocomprometidos *P. jirovecii* generalmente causa PCP, que puede llegar a ser mortal <sup>[56, 64]</sup>. Pero aún no está bien establecido si la infección primaria por *P. jirovecii*, por sí sola, causa alguna sintomatología respiratoria en el lactante inmunocompetente. En varios estudios, aquéllos con infección primaria presentan un cuadro clínico característico de una infección del tracto respiratorio superior (como resfrío, nasofaringitis o amigdalitis) o del tracto respiratorio inferior (como bronquitis, bronquiolitis o asma infeccioso) <sup>[23, 35, 56]</sup>; sin embargo, no se ha esclarecido si la sintomatología de cada paciente se debe a la presencia de *P. jirovecii* o a otro microorganismo causante de patologías respiratorias <sup>[35]</sup>.

Ante tales antecedentes, ha sido necesario montar métodos de detección, cuantificación y diagnóstico de *P. jirovecii* que eventualmente permitirían estudiar más a fondo la trascendencia de este microorganismo en la salud de pacientes inmunocompetentes.

## MÉTODOS DE DETECCIÓN Y DIAGNÓSTICO PARA PNEUMOCYSTIS JIROVECI

Hasta el inicio de la década de 1990, los métodos utilizados para diagnosticar neumonía por *Pneumocystis* en pacientes inmunocomprometidos consistían en tinciones especiales para visualizar quistes o trofozoítos por microscopía. Esto confirmaba un cuadro de PCP, tras haber identificado la sintomatología más común de dicha patología mediante el examen físico y una radiografía de tórax. Generalmente, las muestras tomadas de estos pacientes eran invasivas, como lavado broncoalveolar o incluso biopsia pulmonar, o muestras menos invasivas, como esputo inducido<sup>[14]</sup>. Hoy en día se continúa practicando el examen físico y las radiografías de tórax en pacientes con episodios respiratorios sugerentes de neumonía, y cuando hay sospecha de un cuadro de PCP, la tinción y visualización microscópica de *P. jirovecii* en muestras respiratorias es el método *gold-standard* para confirmar el diagnóstico<sup>[66, 48]</sup>. Sin embargo se han desarrollado técnicas para extraer muestras no invasivas de los pacientes —como lavado oral y aspirado nasofaríngeo— y métodos de biología molecular para la detección y cuantificación del microorganismo<sup>[61, 62]</sup>.

- IDENTIFICACIÓN DE *PNEUMOCYSTIS JIROVECI* POR MICROSCOPÍA

Se han desarrollado diversas técnicas de tinción de las formas trófica y quística de *P. jirovecii*, para su visualización por microscopía óptica y, por ende, la confirmación del diagnóstico de PCP en pacientes inmunocomprometidos. Las tinciones de Wright-Giemsa, Papanicolaou modificado y Gram-Weigert distinguen los trofozoítos, mientras que los quistes pueden ser teñidos por las técnicas de Gomori-Grocott (o tinción de metenamina y plata), azul de toluidina, violeta cresil o calcofluor blanco<sup>[48]</sup>. Además, la detección de *P. jirovecii* por inmunofluorescencia o por inmunocitoquímica ha resultado especialmente útil porque distingue tanto quistes como trofozoítos en la muestra, y tiene mayor sensibilidad y especificidad que las tinciones tradicionales<sup>[9]</sup>.

No obstante, se ha visto que la sensibilidad y especificidad de estas técnicas no alcanzan el nivel de un método diagnóstico ideal, sobre todo algunas tinciones, que alcanzan solo hasta un 90% de sensibilidad<sup>[38]</sup>. Esto último puede llevar al error de obtener falsos negativos, sobre todo al analizar muestras de pacientes que tienen una baja carga del microorganismo<sup>[9]</sup>. En cambio, los actuales métodos moleculares de detección y cuantificación de DNA de *P. jirovecii* cuentan con una sensibilidad y especificidad muy alta<sup>[5]</sup>; aún así, no son el método *gold-standard*, ya que la visualización de los microorganismos por microscopía otorga una certeza diagnóstica difícil de superar. Además, los métodos de detección de *Pneumocystis* basados en biología molecular no están estandarizados a nivel internacional<sup>[31]</sup>.

- PCR CONVENCIONAL Y PCR ANIDADA

En 1990, Wakefield y colaboradores aplicaron la herramienta molecular de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para detectar *Pneumocystis* en muestras respiratorias de humano y de rata<sup>[61, 62]</sup>. Tomando como referencia el diagnóstico clínico de PCP y la tinción de plata en muestras de pacientes inmunocomprometidos, la

técnica de PCR resultó ser altamente sensible y específica <sup>[61]</sup>. Desde entonces, se ha avanzado en el montaje de técnicas basadas en PCR para su aplicación en investigación y en clínica.

Entre las ventajas que ofrece el uso de PCR para la investigación y la clínica, está el monitoreo de tratamientos contra PCP, el hallazgo de distintas secuencias génicas que podrían tener correlación con la gravedad de la enfermedad, la posibilidad de detectar DNA de *P. jirovecii* en muestras no invasivas, la tipificación del microorganismo en estudios epidemiológicos, la identificación de mutaciones en genes terapéuticos potencialmente responsables de la resistencia a fármacos y la detección de DNA de *P. jirovecii* en muestras de pacientes con resultados de microscopía negativos <sup>[5]</sup>.

En cuanto a estos últimos pacientes, se ha visto que presentan una baja carga de *Pneumocystis* en el tracto respiratorio, lo cual explica que no se logre detectar el microorganismo por microscopía, pero sí mediante un método más sensible como lo es n-PCR (PCR anidada o *nested*). Estos pacientes no presentan sintomatología de PCP, por eso se les considera “colonizados” por *P. jirovecii*, y la mayoría de ellos no desarrolla la enfermedad dentro de un período de seguimiento de varios meses <sup>[5, 34, 39]</sup>.

Varios estudios comparan los métodos de microscopía y de PCR, en cuanto a su utilidad para diagnosticar PCP. Ambas técnicas tienen una sensibilidad altísima (100% para ciertos tipos de muestras), pero en cuanto a la especificidad y el valor predictivo positivo, no hay ventajas significativas de la técnica de n-PCR sobre las tinciones, ya que arroja falsos positivos cuando se analizan muestras provenientes de pacientes inmunocompetentes y algunos inmunocomprometidos <sup>[41]</sup>. Pero en estos casos de individuos sin PCP, los falsos positivos que resultan al usar n-PCR están confirmando que existe colonización de *P. jirovecii* en el tracto respiratorio de la persona <sup>[41]</sup>, y que su carga es tan baja que no es detectada por PCR convencional ni por microscopía. Por lo tanto, no debe subestimarse la utilidad de las técnicas moleculares para los estudios epidemiológicos y clínicos sobre colonización e infección primaria. De hecho, se podría decir que gracias a estas técnicas —especialmente n-PCR— se ha descubierto la colonización por *Pneumocystis*, al permitir detectar cargas muy bajas del hongo en pacientes sanos, que con tinciones son muy difíciles de visualizar <sup>[63]</sup>.

- **PCR TIEMPO REAL**

Los métodos cuantitativos de detección de *Pneumocystis* han sido desarrollados desde esta década, mientras que anteriormente había solo métodos cualitativos o semicuantitativos, como el método descrito por Baughman y cols. en 1990, que consistía en contar por microscopía los *clusters* de *Pneumocystis* y se comparaban con el número de células nucleadas presentes en la muestra <sup>[3]</sup>.

Actualmente, en el extranjero se han montado técnicas para la detección de *Pneumocystis jirovecii* aplicando el método cuantitativo de PCR Tiempo Real (q-PCR de *quantitative Polymerase Chain Reaction*). Sus ventajas son evidentes al compararlo con otras técnicas de detección. Lo principal, justamente, es que permite la cuantificación de este microorganismo en muestras clínicas. Da a conocer el número de copias de un determinado gen blanco de *P.*

*jirovecii* por cierta cantidad de volumen de reacción. Los genes que comúnmente han sido utilizados como blanco de detección en montajes de q-PCR son *MSG*, *r5.8S*, *DHPS*, *DHFR*, *HSP70* y *cdc2* [1, 2, 4, 13, 16, 21, 22, 23, 25].

La cuantificación de *P. jirovecii* mediante q-PCR permitiría eventualmente estandarizar un punto de corte entre los pacientes infectados y los colonizados, de acuerdo con la carga del microorganismo hallada en las muestras respiratorias de los pacientes de ambos grupos [1]. Otras ventajas de esta técnica son que la amplificación y detección ocurren en un mismo sistema cerrado, lo cual impide la contaminación de las muestras; el método es más rápido, como se emiten las señales fluorescentes al mismo tiempo de la amplificación del DNA, los resultados de las muestras se pueden obtener en unas dos horas, en vez de las 12 horas aproximadas que tarda todo el proceso de detección por n-PCR. Además, se ha visto que la técnica de q-PCR tiene una sensibilidad muy similar a la de n-PCR al detectar el gen *DHPS* de *P. jirovecii*, siendo capaz de detectar cargas bajísimas en muestras respiratorias de pacientes colonizados [1].

### ***Bases Teóricas de la técnica de PCR Tiempo Real***

El principio de q-PCR que le hace ser un método de detección cuantitativo, se basa en el seguimiento ciclo por ciclo de la reacción de amplificación del DNA blanco. Mediante el uso de moléculas reporteras capaces de emitir fluorescencia en cada ciclo de amplificación, se puede detectar a tiempo real la cantidad de producto amplificado que se va formando. De modo que a medida que aumentan los ciclos de PCR, aumenta también la intensidad de fluorescencia emitida. Gracias a esto, es posible trazar una curva de fluorescencia a lo largo del progreso de la reacción de PCR (número de ciclos de PCR), e identificar distintas fases en esta curva: fase de iniciación, fase exponencial y fase *plateau*. De esto se puede identificar el punto en que comienza la fase exponencial, en otras palabras, el momento en que la eficacia de amplificación se vuelve máxima y constante. Este punto se denomina ciclo umbral (*Ct*, *threshold cycle*, o *Cp*, *crossing point*), ya que es el ciclo en que la intensidad de la fluorescencia emitida sobrepasa un umbral de detección, mayor al ruido de fondo (*background* de fluorescencia). El ciclo umbral sirve para determinar la cantidad de DNA blanco que había inicialmente en la muestra, ya que es inversamente proporcional al logaritmo de la concentración de DNA blanco presente en la muestra antes de la amplificación [51].

Los sistemas de detección para q-PCR emplean moléculas capaces de emitir fluorescencia y que tienen afinidad específica por el DNA. Éstos pueden ser un agente intercalante o sondas fluorogénicas. El primero es el sistema más simple: **SYBR Green**, que se intercala entre los nucleótidos del DNA de doble hebra y emite fluorescencia al ser excitado por luz ultravioleta. De modo que en cada ciclo de amplificación —al final de cada etapa de elongación—, se detecta la fluorescencia emitida por este agente, la cual será directamente proporcional a la cantidad de DNA sintetizado. La desventaja de este sistema es que las moléculas de SYBR Green son inespecíficas, en el sentido de que se intercalan en cualquier producto de DNA de doble hebra, incluidos los dímeros de partidores. No obstante, es posible realizar una curva de desnaturalización de producto amplificado al final de la etapa de amplificación, a fin de determinar la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ , *melting temperature*) del producto, y así asegurar la especificidad de la amplificación [51].

Las sondas fluorogénicas son oligonucleótidos que contienen uno o dos fluoróforos acoplados a su estructura. La secuencia nucleotídica de las sondas —o parte de ella— alinea de manera específica con el DNA blanco, y en cada ciclo de amplificación se emite fluorescencia, lo cual permite el seguimiento de la reacción en tiempo real. Las **sondas de hidrólisis o sondas Taqman** consisten en un oligonucleótido que contiene dos fluoróforos: uno dador o reportero en el extremo 5' y uno apagador (*quencher*) en el extremo 3', de modo que al estar a poca distancia el uno del otro, se produce un efecto de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET), por el cual la fluorescencia del reportero es absorbida por el *quencher*. La sonda alinea específicamente con una de las hebras de DNA blanco durante la etapa de alineamiento de partidores, y cuando la enzima DNA Polimerasa elonga ambas hebras, su actividad 5'-3' exonucleasa libera y escinde la sonda y se separan ambos fluoróforos, permitiendo así la emisión de fluorescencia que es detectada por el equipo de q-PCR. Las **sondas FRET en tándem o sondas LightCycler**, son dos sondas con un fluoróforo cada una —uno dador y otro aceptor—, que alinean muy cerca una de otra en una de las hebras de DNA blanco. Durante la etapa de desnaturación, el fluoróforo dador emite una fluorescencia débil; pero cuando ambas sondas alinean con el DNA en la etapa de alineamiento, se produce transferencia de energía (FRET) y ahora el aceptor emite fluorescencia detectable por el equipo, hasta que la enzima DNA Polimerasa desplaza ambas sondas al elongar la hebra de DNA. Las **sondas Beacon** tienen forma de horquilla o tallo-bucle, cuyo bucle tiene una secuencia complementaria con el DNA blanco y los brazos del tallo son complementarios entre sí. Además el tallo tiene un fluoróforo reportero y uno *quencher* en los extremos de sus brazos, de modo que no hay emisión de fluorescencia al estar cerca uno del otro. Solamente durante la etapa de alineamiento hay emisión de fluorescencia, ya que la horquilla se abre para que el bucle pueda alinear con el DNA blanco, alejando así a los fluoróforos <sup>[51]</sup>.

Básicamente hay dos estrategias de cuantificación: absoluta y relativa. La cuantificación absoluta necesita de una curva de calibración hecha con un estándar homólogo con el DNA blanco, y se expresa como copias por  $\mu\text{L}$  o como unidades de concentración. La cuantificación relativa requiere de la normalización de la cantidad de DNA blanco medido respecto a un gen de referencia (gen constitutivo) o respecto a un calibrador (una muestra de referencia), y se expresa como una razón DNA blanco/DNA referencia. De todas formas, para ambos tipos de cuantificación se necesitan curvas de calibración, que se construyen midiendo por q-PCR una serie de diluciones del estándar, y luego se establece una recta que describe la variación de los Ct en función de la concentración de DNA blanco contenido en las muestras de estándar. Generalmente el estándar consiste en una solución titulada de plasmidio que contiene insertada la secuencia del gen de interés, sobre la cual deben alinear los mismos partidores que se utilizarán para amplificar el gen blanco a partir de las muestras. En el caso de la cuantificación relativa, debe haber dos curvas de calibración, una para el gen blanco y otra para el gen de referencia. El resultado medido para el gen blanco es dividido por el resultado del gen de referencia, obteniendo así la razón DNA blanco/DNA referencia <sup>[4, 51]</sup>.

La utilidad de la cuantificación absoluta suele ser limitada, ya que se aplica particularmente para cuantificar patógenos en muestras biológicas, como los virus causantes del sida o de la hepatitis B o C. En cambio, la cuantificación relativa suele ser más práctica, ya que permite comparar mediciones de ácidos nucleicos en distintas

muestras (por ejemplo, cuantificar cDNA para comparar niveles de expresión de un gen en distintos tipos celulares). Además, permite normalizar las diferencias relacionadas con la calidad y la cantidad de DNA extraído de las muestras y la eventual detección de inhibidores de PCR <sup>[4, 51]</sup>.

### ***Aplicación de PCR Tiempo Real en diagnóstico de Pneumocystis***

La mayoría de los montajes de q-PCR hechos para detectar *Pneumocystis* son, en cierto sentido, incompletos en cuanto a su utilidad para cuantificar; esto es porque la mayoría cuantifican de forma absoluta. Al ser así, no se apoyan en un parámetro exacto que permita eliminar el error que se debe a la variabilidad de la cantidad de muestra analizada: miden la carga de *Pneumocystis* en términos absolutos, sin tomar en consideración si se analizó mayor o menor cantidad de muestra respiratoria <sup>[1, 2, 13, 16, 21, 22, 25]</sup>. En cambio otros montajes de q-PCR realizan cuantificación relativa. Éstos han normalizado el número de copias de DNA de *P. jirovecii* (DNA blanco) con la cantidad de DNA humano hallado en la muestra (DNA referencia). En estos casos, se detecta y cuantifica por q-PCR un gen constitutivo humano, como el de  $\beta$ -actina, de albúmina o de  $\beta$ -globina (cuya presencia en células del epitelio bronquial y en células alveolares está confirmada) <sup>[36, 42]</sup>. El valor relativo que resulta de esta normalización refleja de mejor manera la cantidad de microorganismo detectada en muestras que pueden ser comparadas entre sí, por ejemplo, muestras de distinta procedencia (lavado broncoalveolar, aspirado nasofaríngeo, lavado oral, esputo inducido o tejido pulmonar), muestras de distintos individuos o de un mismo paciente en seguimiento de su tratamiento contra *Pneumocystis* <sup>[4, 11, 23, 30]</sup>.

Larsen y cols. publicaron un estudio en el que se cuantificaba el gen *MSG* de *P. jirovecii* en muestras de aspirado nasofaríngeo de lactantes con infección primaria y sintomatología propia de una infección del tracto respiratorio superior o inferior. Encontraron que los lactantes hospitalizados por un cuadro de infección del tracto respiratorio superior tenían una carga de alrededor de dos veces mayor de *P. jirovecii* que los lactantes con infección del tracto respiratorio inferior. Ante esto, ellos sugieren que la infección primaria por *P. jirovecii* es una infección auto-limitada del tracto respiratorio superior <sup>[23]</sup>. Sin embargo, no estudiaron la carga de *P. jirovecii* en tejido pulmonar, para luego compararla con las muestras de aspirado nasofaríngeo y haber sugerido una relación más fehaciente entre *Pneumocystis* y la infección del tracto respiratorio superior o inferior. De hecho ningún estudio en humanos ha cuantificado la carga de *P. jirovecii* en muestras de tejido pulmonar, de modo que se pueda establecer si muestras tomadas del tracto respiratorio superior sirven para evidenciar de manera confiable la carga presente en los pulmones de cada paciente.

El contar con un método cuantitativo sensible, rápido, específico y que permita comparar la carga de *P. jirovecii* en distintas muestras del tracto respiratorio de pacientes infectados o colonizados será un gran avance en el estudio básico, clínico y epidemiológico de *Pneumocystis*.



## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### *HIPÓTESIS*

“La cuantificación relativa de *Pneumocystis jirovecii* mediante PCR Tiempo Real permite comparar la carga de este microorganismo entre muestras respiratorias invasivas y no invasivas”.

### *OBJETIVO GENERAL*

Estandarizar un método cuantitativo que permita comparar carga de *Pneumocystis jirovecii* entre muestras no invasivas y muestras de tejido pulmonar de pacientes colonizados.

### *OBJETIVOS ESPECÍFICOS*

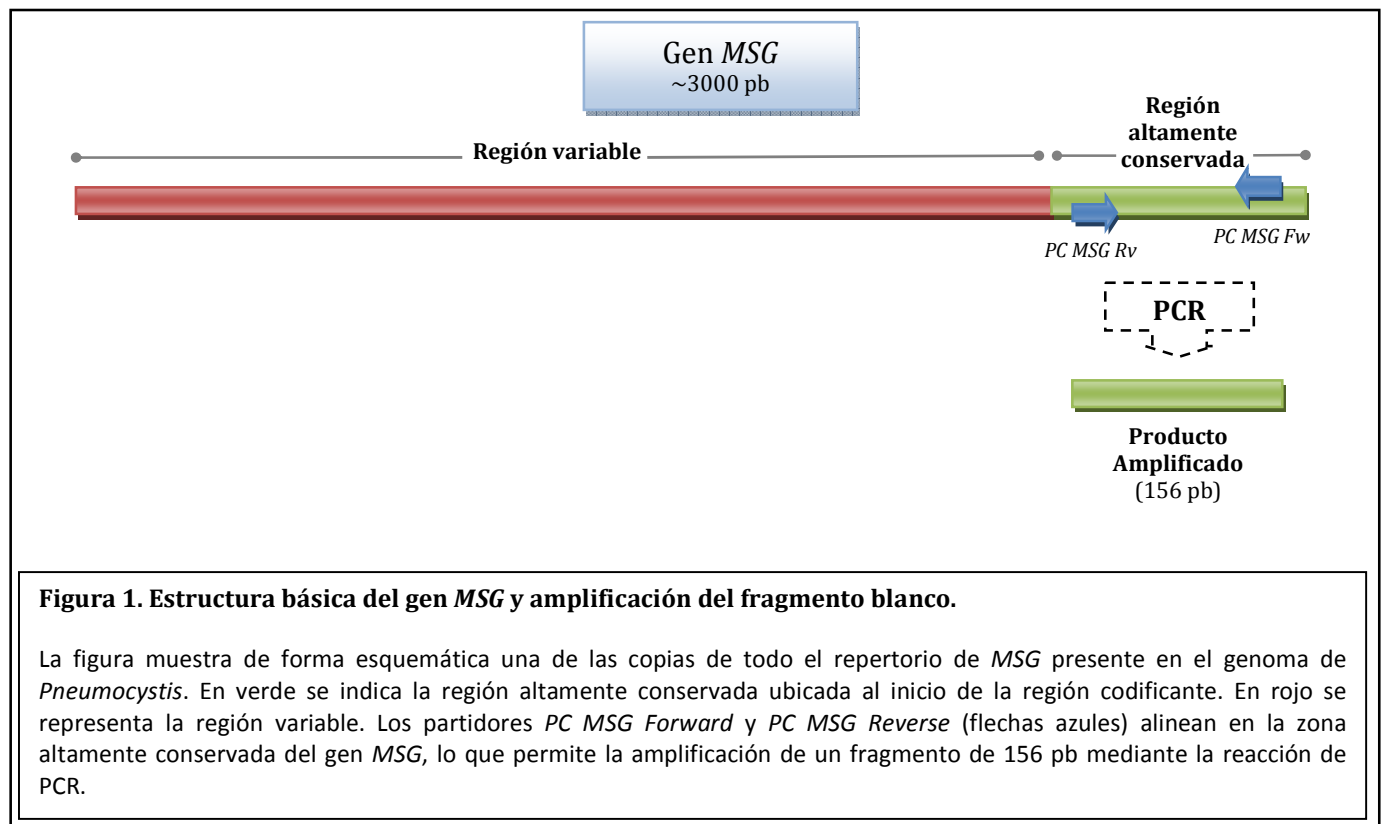
1. Aislar y clonar el gen *MSG* de *Pneumocystis jirovecii* para ser utilizado como gen blanco en el método de PCR Tiempo Real.
2. Estandarizar el método de PCR Tiempo Real para detectar DNA de *Pneumocystis jirovecii* en muestras con alta y baja carga de microorganismo, obtenidas del tracto respiratorio humano.
3. Cuantificar y normalizar la carga de *Pneumocystis jirovecii* relativa a la cantidad de DNA humano en muestras no invasivas y de tejido pulmonar de pacientes colonizados.
4. Comparar carga de *Pneumocystis jirovecii* entre muestras respiratorias no invasivas y muestras de tejido pulmonar, en base a los resultados obtenidos en el objetivo específico 3.

### III. METODOLOGÍA

*DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1. Aislar y clonar el gen MSG de Pneumocystis jirovecii para ser utilizado como gen blanco en el método de PCR Tiempo Real.*

A partir de muestras de pulmón de pacientes con diagnóstico de neumonía por *Pneumocystis* (PCP) disponibles en nuestro laboratorio, se procedió a extraer el DNA total a fin de aislar el gen que codifica para la glicoproteína de superficie MSG (*Major Surface Glycoprotein*) de *P. jirovecii*. Para ello, se homogeneizó el tejido pulmonar, se depuró y se purificó el DNA total con el uso del kit comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN). Se escogió a *MSG* como gen blanco, considerando que podría favorecer la sensibilidad del método, al ser un gen multicopia <sup>[19]</sup>.

El aislamiento del gen blanco se realizó mediante PCR, utilizando los partidores *PC MSG Forward* (5'-CAA AAA TAA CAY TSA CAT CAA CRA GG-3') y *PC MSG Reverse* (5'-AAA TCA TGA ACG AAA TAA CCA TTG C-3') <sup>[21, 25]</sup>, y la enzima *Pfu* DNA Polimerasa, para amplificar parte de la región altamente conservada del gen *MSG* de *P. jirovecii*, un fragmento de 156 pb (*Figura 1*). El producto amplificado que se obtuvo se visualizó en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio y luego se extrajo la banda para purificar el DNA mediante un kit comercial (*SV Gel and PCR Clean Up System*, Promega), siguiendo el protocolo del fabricante. En seguida se determinó la concentración del DNA purificado por espectrofotometría UV.



El fragmento de DNA se sometió a una reacción de adenilación en sus extremos 3', usando la enzima Taq DNA Polimerasa y dATP, a fin de compatibilizar el fragmento con los extremos timidilados del vector de clonamiento *pGEM-T Easy* (Promega). Luego se llevó a cabo la ligación del fragmento al vector mediante una reacción con la enzima T4 DNA ligasa. Tanto la adenilación como la ligación se efectuaron siguiendo los protocolos del fabricante del vector *pGEM-T Easy*. A continuación se prepararon células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  mediante incubación con CaCl<sub>2</sub>. La transformación de las bacterias competentes se realizó por *shock* térmico a 42 °C por 50 segundos. Luego de su recuperación con medio de cultivo SOC a 37 °C durante 105 minutos, las células fueron cultivadas en agar LB / Ampicilina / IPTG / X-Gal, durante toda la noche a 37 °C. Al día siguiente se seleccionaron algunas de las colonias transformantes de color blanco, y luego se verificó que éstas tuviesen el vector con el fragmento de *MSG* correctamente insertado. Para ello primero se hizo una extracción de ácidos nucleicos totales por lisis celular con sacarosa y una mezcla de fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (24:24:1), a fin de corroborar la presencia del plasmidio en las bacterias; luego se realizó PCR de colonias para asegurarse de obtener una amplificación eficaz.

Finalmente, a partir de las colonias seleccionadas, se llevó a cabo la purificación del plasmidio con un *kit* comercial de extracción de DNA plasmidial bacteriano (Promega). A modo de control, se realizó una digestión del plasmidio incubándolo con la enzima de restricción *Nde I*, durante 3,5 horas a 37 °C. Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio y se visualizó el DNA en transiluminador UV. También se confirmó por PCR convencional que el plasmidio fuese útil como DNA blanco para la amplificación usando los partidores antes descritos. El amplicón obtenido se secuenció para corroborar su identidad. Por otra parte, se determinó la concentración del plasmidio puro mediante espectrofotometría UV. De aquí en adelante, llamamos a este plasmidio "pMSG".

### *DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2. Estandarizar el método de PCR Tiempo Real para detectar DNA de Pneumocystis jirovecii en muestras con alta y baja carga de microorganismo, obtenidas del tracto respiratorio humano.*

Se prepararon diluciones seriadas del plasmidio pMSG ( $1 \times 10^9$  —  $1 \times 10^3$  copias/ $\mu$ L) y se amplificó el fragmento de *MSG* inserto en el plasmidio por PCR convencional con la enzima *Taq* DNA Polimerasa, de acuerdo al protocolo del laboratorio. Luego se visualizaron las bandas de producto amplificado obtenido de las distintas diluciones de plasmidio en un gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio, en transiluminador UV. Luego se analizaron estas mismas diluciones por PCR Tiempo Real (q-PCR) en un equipo LightCycler 2.0 (Roche), usando un programa estándar descrito por el fabricante. Para realizar las pruebas de estandarización del programa y la mezcla de reacción se escogió el rango de diluciones de  $1 \times 10^6$  —  $1 \times 10^1$  copias de pMSG/ $\mu$ L.

Se realizaron numerosas pruebas para estandarizar el programa de PCR a Tiempo Real, usando diluciones del plasmidio pMSG como estándar, controles positivos obtenidos de pulmones con PCP y algunas muestras provenientes de pacientes colonizados, que tienen baja carga de *Pneumocystis*. Se analizaron las curvas de

desnaturación de los productos amplificados de cada prueba, y se obtuvieron los puntos de desnaturalización  $T_m$  (*melting points*) a fin de descartar la detección de productos inespecíficos o dímeros de partidores. Se visualizó el tamaño de los amplicones en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Además se verificó cuál es la menor dilución de plasmidio pMSG detectable por el método de q-PCR, lo que determinó la sensibilidad de éste <sup>[4, 12, 19]</sup>. Además se secuenciaron algunos de los productos amplificados obtenidos a partir de los estándares y de los controles positivos, para la identificación de éstos.

Finalmente, usando el método de q-PCR ya estandarizado, se analizó por triplicado las diluciones de pMSG de  $1 \times 10^6$  —  $1 \times 10^1$  copias/ $\mu$ L. A partir de los datos obtenidos de fluorescencia v/s número de ciclos ( $C_t$ ), se elaboró una curva de calibración ( $C_t$  v/s logaritmo de la concentración del plasmidio pMSG). Esta curva es utilizada para la cuantificación de *P. jirovecii* en cada muestra a analizar posteriormente <sup>[2, 4, 13, 21, 23]</sup>. Se usaron los partidores *PC MSG Forward* y *PC MSG Reverse*. El método de detección de los amplicones es el uso del agente intercalante de DNA *SYBR Green* (SensiMix Lite, Bioscan), que emite señales fluorescentes.

### *DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 3. Cuantificar y normalizar la carga de Pneumocystis jirovecii relativa a la cantidad de DNA humano en muestras no invasivas y de tejido pulmonar de pacientes colonizados.*

Se recolectaron muestras pareadas de pacientes que fueron sometidos a cirugía torácica (toracotomía), luego de haber recibido su consentimiento informado. Antes de la cirugía, a cada paciente se le tomó una muestra de gargarismo (GARG) con suero fisiológico y una muestra de hisopado nasofaríngeo (HNF). Ambas muestras no invasivas se centrifugaron y se juntaron en un solo tubo para la purificación del DNA. Del trozo de tejido pulmonar extraído por la cirugía, se separó una fracción para este estudio. Además, se seleccionaron muestras clínicas conservadas en nuestro laboratorio que se habían obtenido del Instituto Médico Legal. Éstas consistieron en muestras de tejido pulmonar (TP) de autopsias de lactantes fallecidos por Síndrome de Muerte Súbita (SMS) y de adultos sanos fallecidos por violencias. Además se seleccionaron muestras no invasivas de Aspirado Nasofaríngeo (ANF) que habían sido obtenidas de una cohorte de lactantes sanos.

El procesamiento de las muestras no invasivas (GARG+HNF y ANF) consistió en incubar con proteinasa K (QIAGEN) un volumen de muestra suspendida en amortiguador fosfato salino (PBS) pH 7,2 a 56 °C durante 10 min. Después se extrajo y purificó el DNA total de cada muestra mediante el uso del *kit* comercial de purificación *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En cuanto a las muestras de tejido pulmonar (TP), se homogenizaron porciones de éste en frascos *Duran-Schott* con amortiguador fosfato salino PBS estéril, por agitación magnética en frío, siguiendo el protocolo estandarizado en nuestro laboratorio. Luego de la depuración del homogeneizado por filtración y centrifugación, se llevó a cabo la purificación de DNA total del homogeneizado pulmonar con el uso del *kit* comercial *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN), siguiendo el mismo protocolo utilizado para las muestras no invasivas.

Se seleccionaron sólo muestras positivas para *Pneumocystis jirovecii* según el método de PCR anidada (n-PCR), usando partidores específicos para amplificar el gen *mtLSU rRNA* (*mitochondrial Large Subunit ribosomal RNA*),

que se encuentra en cinco copias en el genoma de *P. jirovecii* [61]. La primera ronda de PCR contempla el uso de los partidores primarios PAZ 102-H y PAZ 102-E, que amplifican un fragmento de 367 pb del gen *mtLSU rRNA*. El programa de PCR para esta primera fase consta de 40 ciclos, que incluyen las etapas de desnaturación, 1,5 minutos a 94 °C; alineamiento, 1,5 minutos a 55 °C, y elongación, 2 minutos a 72 °C; luego de los 40 ciclos, una etapa de enfriamiento a 4°C. Para la segunda ronda de amplificación se utilizan los partidores secundarios PAZ 102-X y PAZ 102-Y, que amplifican un fragmento de 267 pb, a partir del amplicón obtenido en la primera ronda. El programa de PCR consta, primero, de 10 ciclos con las siguientes etapas: desnaturación, 1,5 minutos a 94 °C; alineamiento, 1,5 minutos a 56 °C, y elongación, 2 minutos a 72 °C. A continuación, 30 ciclos con las siguientes etapas: 1,5 minutos a 94 °C; 1,5 minutos a 64 °C, y 2 minutos a 72 °C. Etapa final a 4 °C. En ambas rondas de amplificación se utilizó la enzima Taq DNA Polimerasa (Promega) a una concentración final de 0,025 u/μL. Este protocolo estaba ya estandarizado en nuestro laboratorio [56, 58].

Se procedió a cuantificar la carga absoluta de *P. jirovecii* en cada muestra por triplicado, sometiéndolas al método de q-PCR estandarizado, de modo que en base a la curva de calibración elaborada, se obtuvo el número de copias del gen *MSG* por μL de reacción. Después se cuantificó en las mismas muestras, y por duplicado, el gen de β-Globina humana con el uso del kit comercial *Control Kit DNA* (Roche), aplicando la mezcla de reacción y el programa indicado por el fabricante. Con esto se pudo normalizar la cantidad de DNA de *P. jirovecii* con la cantidad de DNA humano hallado en cada muestra, de modo que se obtuvo la cuantificación relativa de *P. jirovecii*, medida en copias de *MSG* por nanogramo de DNA de β-Globina humana (cMSG/ngDNAh) [4, 23].

Para corroborar la identidad de los amplicones obtenidos de los pacientes colonizados, se secuenciaron cinco productos obtenidos de distintas muestras. Se seleccionaron amplicones que fueran representativos de cada grupo de muestra, que tuviesen abundante amplificación y cuyos *peaks* de desnaturación fuesen bien pronunciados.

#### *DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 4. Comparar carga de Pneumocystis jirovecii entre muestras respiratorias no invasivas y muestras de tejido pulmonar, en base a los resultados obtenidos en el objetivo específico 3.*

Se evaluaron los datos obtenidos de la cuantificación relativa de *Pneumocystis jirovecii* por q-PCR, comparando las cargas entre los distintos tipos de muestra. Se determinó si los datos de cada grupo de muestras tenían una distribución normal o no (datos paramétricos o no paramétricos, respectivamente) mediante *D'Agostino and Pearson omnibus normality test* (para n≥8) o *Kolmogorov Smirnov normality test* (para n<8). Se aplicó el test *1 way ANOVA*, para comparar datos paramétricos entre tres o más grupos, a fin de verificar la presencia de diferencias significativas entre los cuatro grupos de datos correspondientes a tejido pulmonar de lactantes. Luego, aplicando el post-test *Bonferroni's Multiple Comparison test*, se señaló entre qué grupos etarios existían tales diferencias. Para los datos paramétricos correspondientes a solo dos grupos etarios (tejido pulmonar de adulto) se aplicó *Unpaired t-test* a fin de establecer si hubo diferencia significativa entre ambos grupos. Para comparar datos no paramétricos, se aplicó *Kruskal-Wallis test* con el objetivo de comprobar la presencia de diferencias significativas entre los grupos (ANF de

lactantes) y entonces se utilizó el post-test de *Dunn's Multiple Comparison test* para establecer entre qué grupos existían tales diferencias.

Posteriormente se analizó qué tipos de muestra contribuyen a obtener datos más precisos. Para ello se comparó el grado de dispersión (desviación estándar de los promedios de las cargas) entre muestras no invasivas y muestras de tejido pulmonar.

### *BASES ÉTICAS*

Este trabajo se enmarca dentro de los Proyectos Fondecyt 1060750 y 1100225, aprobados por el Comité de Ética para investigación en seres humanos del Servicio Metropolitano Norte y por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La recolección de muestras clínicas de pacientes vivos fue hecha con el consentimiento informado de cada uno de ellos (Ver *Apéndice*).

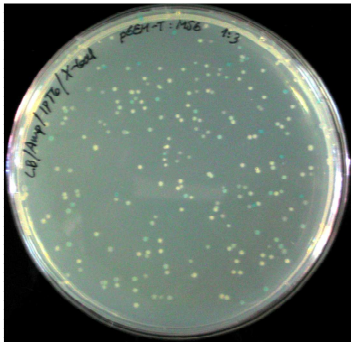
## IV. RESULTADOS

*DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 1. Aislar y clonar el gen MSG de Pneumocystis jirovecii para ser utilizado como gen blanco en el método de PCR Tiempo Real.*

Primero se procedió a aislar el gen blanco *MSG* de *P. jirovecii* mediante PCR convencional con la enzima *Pfu* DNA Polimerasa (0,1 u/μL), usando los partidores *PC MSG Forward* y *PC MSG Reverse*. Se originó un producto amplificado de aproximadamente 150 pb, según la visualización en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio.

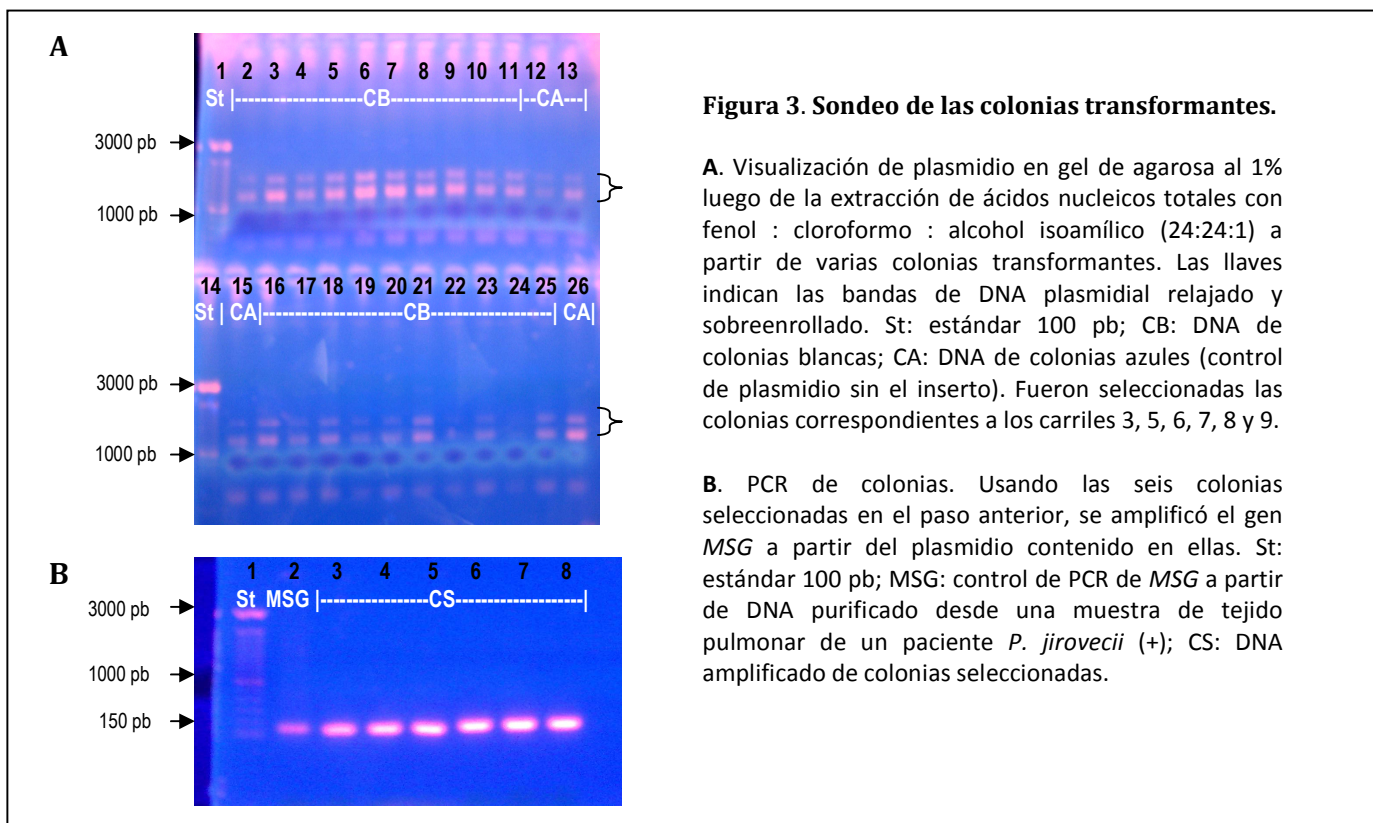
Se logró la ligación del fragmento de *MSG* adenilado en el vector *pGEM-T Easy* mediante una reacción con la enzima T4 DNA Ligasa (0,39 u/μL), con una proporción inserto : vector de 3:1.

A continuación se realizó la transformación bacteriana por *shock* térmico. Crecieron colonias blancas y azules de *E. coli* DH5α transformantes en placas de agar LB / Ampicilina / IPTG / X-Gal (*Figura 2*). Se seleccionaron algunas de las colonias de color blanco que contienen el vector con el inserto de *MSG*, mediante un sondeo de dos etapas: extracción de ácidos nucleicos totales con fenol : cloroformo : alcohol isoamílico (24:24:1) para identificar las colonias con sólo 1 inserto en cada vector (*Figura 3A*), y PCR de colonias, para seleccionar aquéllas cuya amplificación fuese más eficaz (*Figura 3B*). A partir de las colonias seleccionadas se obtuvo el plasmidio pMSG, tras haberlo extraído y purificado con un *kit* comercial (Promega).



**Figura 2. Cultivo de cepas *E. coli* DH5α transformantes.**

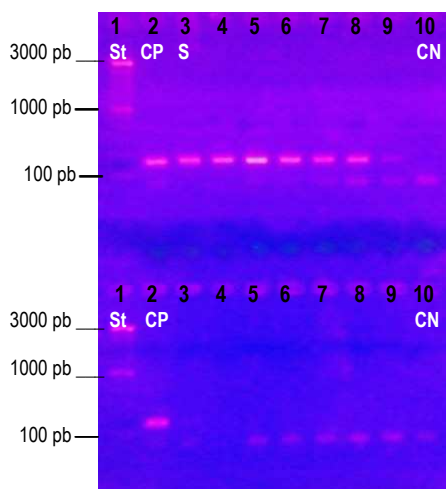
Placa de agar LB / Amp / IPTG/ X-Gal con crecimiento de colonias blancas y azules de *Escherichia coli* DH5α transformantes.



Se midió la concentración del plasmidio pMSG por espectrofotometría UV, la cual resultó ser de 160,7 ng/μL (83,4 nM o  $5 \times 10^{10}$  copias de plasmidio/μL). Luego se hicieron diluciones seriadas de pMSG, desde una concentración de  $1 \times 10^9$  hasta  $1 \times 10^{-3}$  copias/μL. Entonces se sometió a PCR simple todas las diluciones. Con esto se corroboró la utilidad de los plasmidios para la amplificación y se observaron las diferencias de intensidad de las bandas de cada producto amplificado en un gel de agarosa (Figura 4). Las bandas de producto amplificado fueron visibles desde la dilución de  $1 \times 10^9$  hasta la de  $1 \times 10^3$  copias/μL. No se pudo observar producto amplificado en el caso de las concentraciones más bajas de pMSG (diluciones  $1 \times 10^2$  –  $1 \times 10^{-3}$  copias/μL).

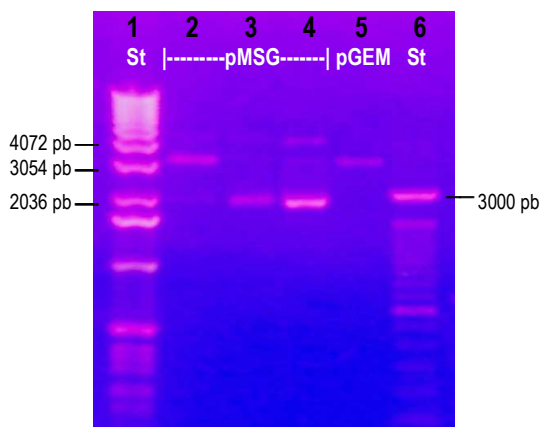
Se confirmó el tamaño del plasmidio pMSG linealizado en un gel de agarosa al 1%, tras digerirlo con la enzima de restricción *Nde I* (Figura 5). El tamaño esperado del plasmidio recombinante era de 3171 pb. Y efectivamente, tras la electroforesis, se visualizó una banda de entre 3054 y 4072 pb. Además, su tamaño fue muy similar al del vector *pGEM-T Easy* (3015 pb) utilizado para insertar el fragmento de *MSG*.





**Figura 4. PCR de diluciones de pMSG.**

Gel de agarosa al 2% que muestra las bandas de cada producto amplificado de las diluciones de plasmidio pMSG. St: estándar de peso molecular de 100 pb. CP: control positivo (amplificado de *MSG* a partir de DNA de paciente con PCP). S: amplificado de *MSG* a partir del *stock* de plasmidio pMSG ( $5 \times 10^{10}$  copias/ $\mu$ L). CN: control negativo (PCR del vector *pGEM-T Easy*). Arriba: carril 4 al 9, diluciones  $1 \times 10^9$  hasta  $1 \times 10^4$  copias/ $\mu$ L, respectivamente. Abajo: carril 3 al 9, diluciones  $1 \times 10^3$  hasta  $1 \times 10^{-3}$  copias/ $\mu$ L, respectivamente.



**Figura 5. Digestión del plasmidio pMSG.**

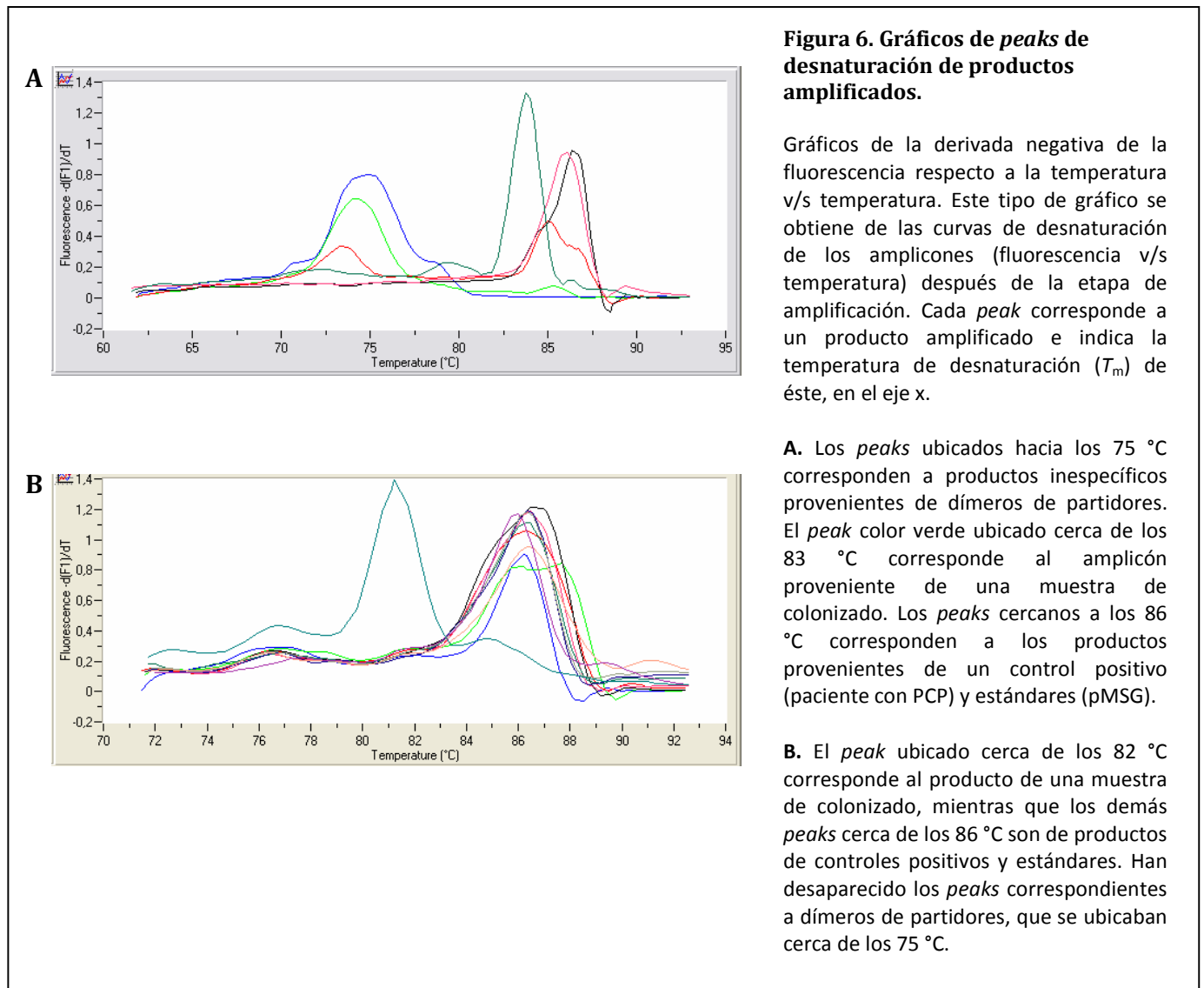
Electroforesis del plasmidio pMSG linearizado, en gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. St del carril 1: estándar de peso molecular de 1 Kb. St del carril 6: estándar de peso molecular de 100 pb. Carril 2: pMSG linearizado por la enzima *Nde I* (banda entre 3054 y 4072 pb). Carril 3: pMSG circular, control negativo de digestión (sometido a incubación, pero sin *Nde I*). Carril 4: pMSG circular, directamente cargado desde el *stock*. Carril 5: vector *pGEM-T Easy* lineal, control para comparación de tamaño (peso molecular un tanto menor que pMSG).

**DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 2. Estandarizar el método de PCR Tiempo Real para detectar DNA de *Pneumocystis jirovecii* en muestras con alta y baja carga de microorganismo, obtenidas del tracto respiratorio humano.**

Durante el proceso de estandarización se obtuvo la amplificación más óptima de DNA, en cuanto a sensibilidad y especificidad, después de 13 pruebas con composiciones distintas de la mezcla de reacción y 20 pruebas en que se ajustó el programa de q-PCR. En todas ellas se utilizó DNA templado proveniente de pacientes con PCP (controles positivos) y de pacientes colonizados, y algunas diluciones del plasmidio pMSG se usaron como estándar.

Primero se probaron concentraciones crecientes de magnesio y, paralelamente, concentraciones crecientes de enzima Taq DNA Polimerasa. Los resultados mostraron buena amplificación, pero los *peaks* de desnaturalización —obtenidos a partir de las curvas de desnaturalización o *melting*— se ubicaban sin un orden específico, evidenciando amplificación inespecífica. Se observó en cada prueba, un *peak* de desnaturalización ubicado a una  $T_m$  de 75 °C, diferente

a los *peaks* de los estándares y controles positivos (CP), ubicados hacia los 86 °C (Figura 6A). Este producto fue detectado sobre todo para los estándares de menor concentración, de  $1 \times 10^1$  a  $1 \times 10^3$  copias de pMSG/ $\mu$ L. Para intentar favorecer la especificidad de la amplificación, se aumentó la temperatura de alineamiento desde los 53 hasta los 57 °C, manteniendo una concentración alta de magnesio (5 mM). Pero no se pudo eliminar la amplificación inespecífica. Se dedujo que este producto inespecífico correspondía a dímeros de partidores. Por consiguiente, se redujo la concentración de magnesio a 4 mM y se aumentó la temperatura en que comenzaba la etapa de desnaturalización de producto amplificado (70 °C), a fin de que no se formaran ni se detectaran los dímeros de partidores. Como resultado, estos dímeros de partidores fueron eliminados y se observaron solamente los *peaks* de desnaturalización de los estándares y CP, y de las muestras de DNA provenientes de individuos colonizados que se incluyeron a modo de prueba (Figura 6B).



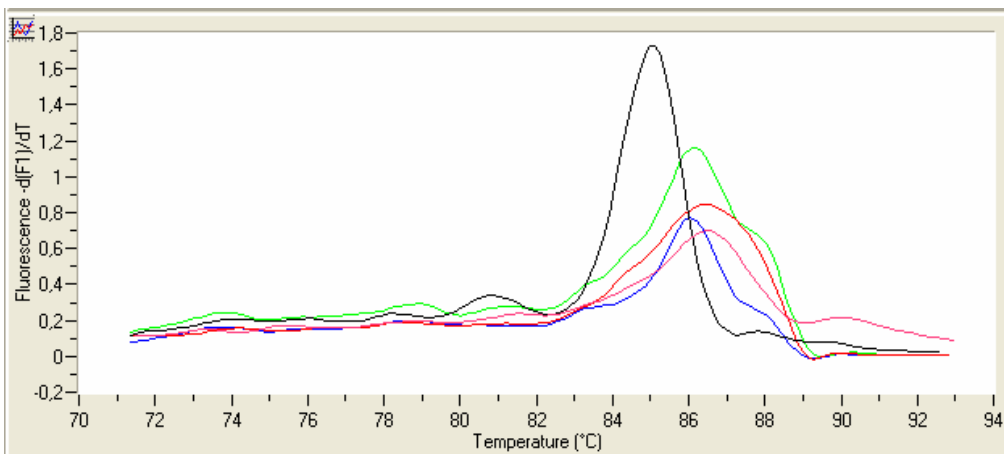
En estos casos, la  $T_m$  de los CP y estándares fue distinta que la  $T_m$  de las muestras de colonizados: 86 y 82 °C, respectivamente. Aparentemente, esta diferencia de  $T_m$  se debió a una deficiente amplificación del DNA de las muestras de individuos colonizados, por lo que se aumentó el número de ciclos y luego se duplicó la concentración de DNA analizado. Esto causó un desordenamiento de los *peaks* de desnaturación, y por otro lado, no se logró detectar el estándar de menor concentración ( $1 \times 10^1$  copias de pMSG/ $\mu$ L).

En base a los gráficos de *peaks* de desnaturación y a la visualización de productos en geles de agarosa, se concluyó que los amplicones obtenidos a partir de DNA de individuos colonizados eran fragmentos más cortos que los productos obtenidos de CP y estándares. Por esto se incluyó una etapa de elongación adicional (7 minutos a 72 °C) justo al finalizar los ciclos de amplificación, a fin de favorecer la elongación de productos aparentemente incompletos. A pesar de esto, no se eliminó la diferencia de  $T_m$  entre colonizados y controles.

Se sospechó de los partidores como causa de la falta de especificidad, de modo que se hicieron pruebas utilizando partidores nuevos más puros, pero no hubo mejores resultados. Por otro lado, se hizo evidente la necesidad de renovar continuamente las diluciones de estándar pMSG, ya que en algunas pruebas casi no hubo amplificación de éstos, tras haber sido congeladas y descongeladas varias veces cada alícuota de plasmidio.

Luego se trabajó con las concentraciones de DNA de las muestras. Se aumentó la concentración de DNA de colonizados, para asemejar la carga de DNA de *Pneumocystis* a la de las muestras de CP, y así intentar obtener productos con la misma  $T_m$  que los CP y estándares. No obstante, al concentrar 10 veces el DNA de un individuo colonizado, no hubo amplificación, ya que el exceso de DNA inhibió el proceso de PCR. Por otro lado, se diluyó el DNA de muestras de CP para asemejarlo a las muestras provenientes de colonizados, que contienen baja carga de DNA de *Pneumocystis*. A diferencia de lo que se esperaba, la  $T_m$  del producto ( $\sim 86$  °C) no disminuyó hacia la  $T_m$  característica de las muestras de colonizados ( $\sim 82$  °C). No obstante, mejoró la amplificación. De modo que se ensayó con varias diluciones de DNA de CP y se escogió la que amplificaba mejor: la dilución de 1:10.

También se probaron diluciones sucesivas de DNA de muestras de colonizados (1:5, 1:25, 1:125 y 1:625). Los mejores resultados se obtuvieron al usar la dilución 1:25, incluso mejoró notablemente el orden de los *peaks* de desnaturación, evidenciando una amplificación más específica. Al trabajar con esta concentración de DNA para muestras y CP, y con un programa de 50 ciclos de amplificación, la  $T_m$  de las muestras de colonizado se acercó bastante a la  $T_m$  de los CP y estándares, siendo éstas de 84 y 86 °C, respectivamente. Después se redujo el número de ciclos hasta 45, y como resultado, mejoró aun más la similitud de ambas  $T_m$ . La  $T_m$  de colonizado fue de 85 °C, mientras que la  $T_m$  de CP y estándares fue de 86 °C (*Figura 7*. Compárese con la *Figura 6B*).



**Figura 7. Gráfico de peaks de desnaturación de productos amplificados.**

Luego de varios ajustes en el programa de q-PCR y en las concentraciones de las muestras de DNA, se logró un acercamiento de las  $T_m$  de colonizado (85 °C) y de controles positivos y estándares (86 °C).

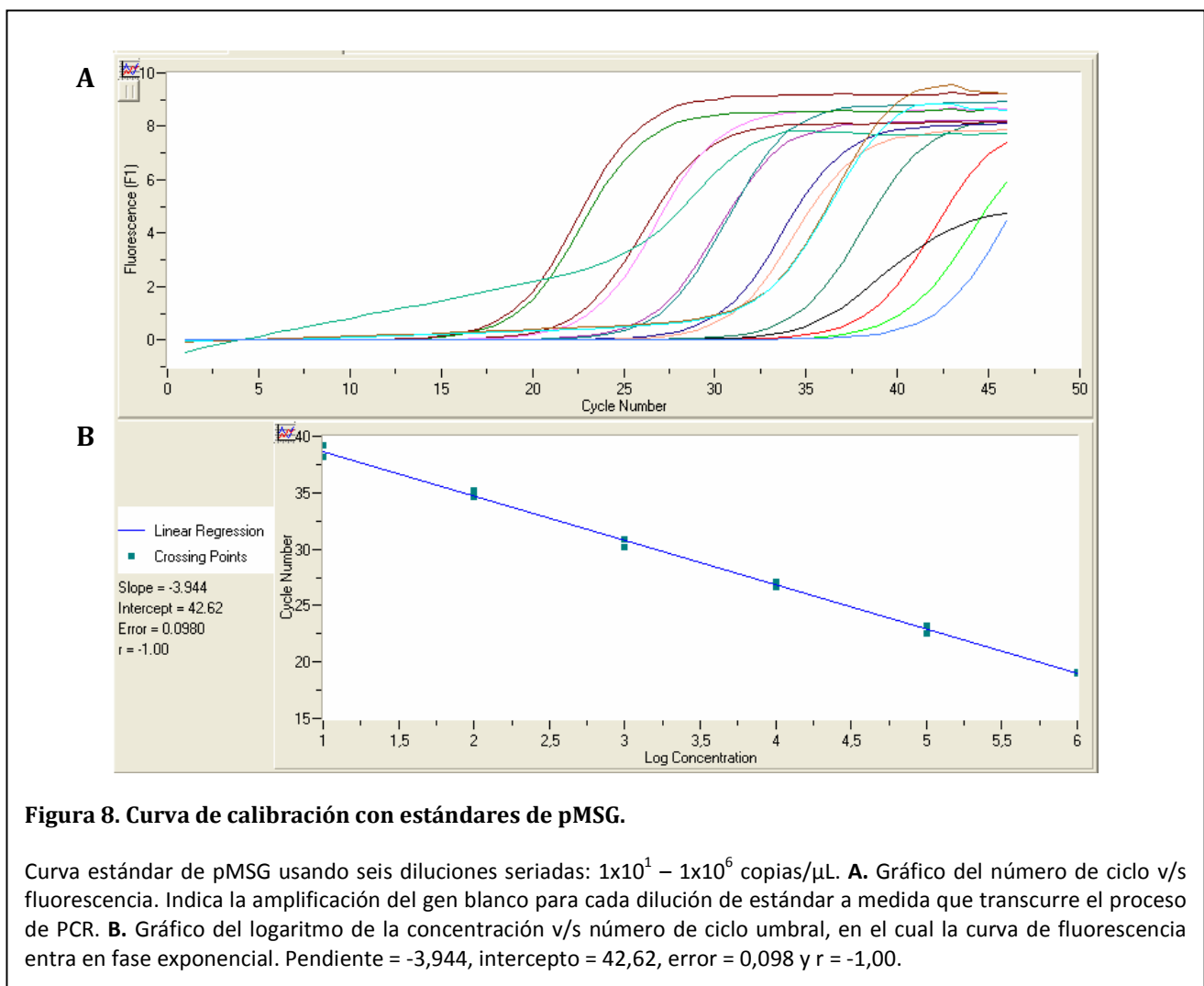
Finalmente, la composición estandarizada de la mezcla de reacción consta de 1,5  $\mu\text{L}$  de enzima Taq DNA Polimerasa (Quantace, Bioscan) por cada 20  $\mu\text{L}$  de reacción, magnesio a una concentración final de 4 mM y partidores a 200 nM. Cada muestra de DNA y los CP se usaron a una dilución de 1:25, lógicamente exceptuando los estándares de pMSG, que fueron usados a diluciones seriadas fijas ( $1 \times 10^1$  —  $1 \times 10^6$  copias de pMSG/ $\mu\text{L}$ ).

Se intentó mejorar la especificidad de amplificación y la sensibilidad aumentando en 1 unidad la temperatura de alineamiento y el número de ciclos. Con esto mejoró la sensibilidad, pero no la especificidad. Por consiguiente, la temperatura de alineamiento que ofreció un mejor resultado hasta entonces fue de 53 °C, usando un programa de amplificación de 46 ciclos.

A continuación se trató de mejorar la especificidad implementando un programa de *Touch-Down* PCR. Este programa consiste en usar distintas temperaturas de alineamiento en cada ciclo de amplificación: en los primeros ciclos la temperatura de alineamiento es alta (entre 57 y 60 °C), pero a partir del ciclo 10 o 15, esta temperatura va disminuyendo 1 °C por cada ciclo, hasta llegar a ser un tanto menor que la  $T_m$  de los partidores (50 °C), de modo que favorezca la amplificación. Tras varios ajustes en las temperaturas y en los ciclos del programa, se consiguió una mejoría leve en la especificidad de amplificación: la diferencia entre las  $T_m$  de colonizados y CP y estándares disminuyó a menos de 1 °C. Ante esto, se procedió a elaborar una curva de calibración. Sin embargo, tras usar este programa de *Touch-Down* PCR, se perdió mucha sensibilidad: no fue posible detectar los estándares de menor concentración,  $1 \times 10^1$  ni  $1 \times 10^2$  copias de pMSG/ $\mu\text{L}$ . Por lo tanto, se volvió a trabajar con el programa de q-PCR anterior, que utilizaba una temperatura de alineamiento fija (no *Touch-Down*).

El programa de q-PCR que produjo mejores resultados es el siguiente: Activación de la enzima y desnaturación: 95 °C por 10 min. Amplificación de 46 ciclos de: 95 °C por 10 seg. (desnaturación), 53 °C por 10 seg. (alineamiento) y 72 °C por 20 seg. (elongación). Etapa de elongación a 72 °C por 7 min. Desnaturación del producto amplificado: aumento de la temperatura hasta 95 °C, disminución hasta 70 °C por 10 seg. y aumento progresivo hasta 95 °C a una velocidad de 0,1 °C/seg. Enfriamiento final: 40 °C por 20 seg.

Se procedió a elaborar la curva de calibración, usando los estándares de pMSG, desde la dilución de  $1 \times 10^1$  hasta la dilución de  $1 \times 10^6$  copias/ $\mu\text{L}$ . Cada estándar se cuantificó por triplicado. Al obtener los resultados, se eliminó el dato más alejado del promedio para cada dilución a fin de mejorar la linealidad de la curva y disminuir el error. La curva de calibración resultante es una recta con pendiente -3,994, intercepto 42,62 (número de ciclo), un error de 0,098 y un r de -1,00 (Figura 8). Además, mediante el análisis de las curvas de desnaturalización, se revisó que no hubiese amplificación inespecífica o dímeros de partidores. Las temperaturas de desnaturalización ( $T_m$ ) de los productos amplificados coincidían con la del control positivo, cercanas a los  $85,5^\circ\text{C}$  (Figura 9).

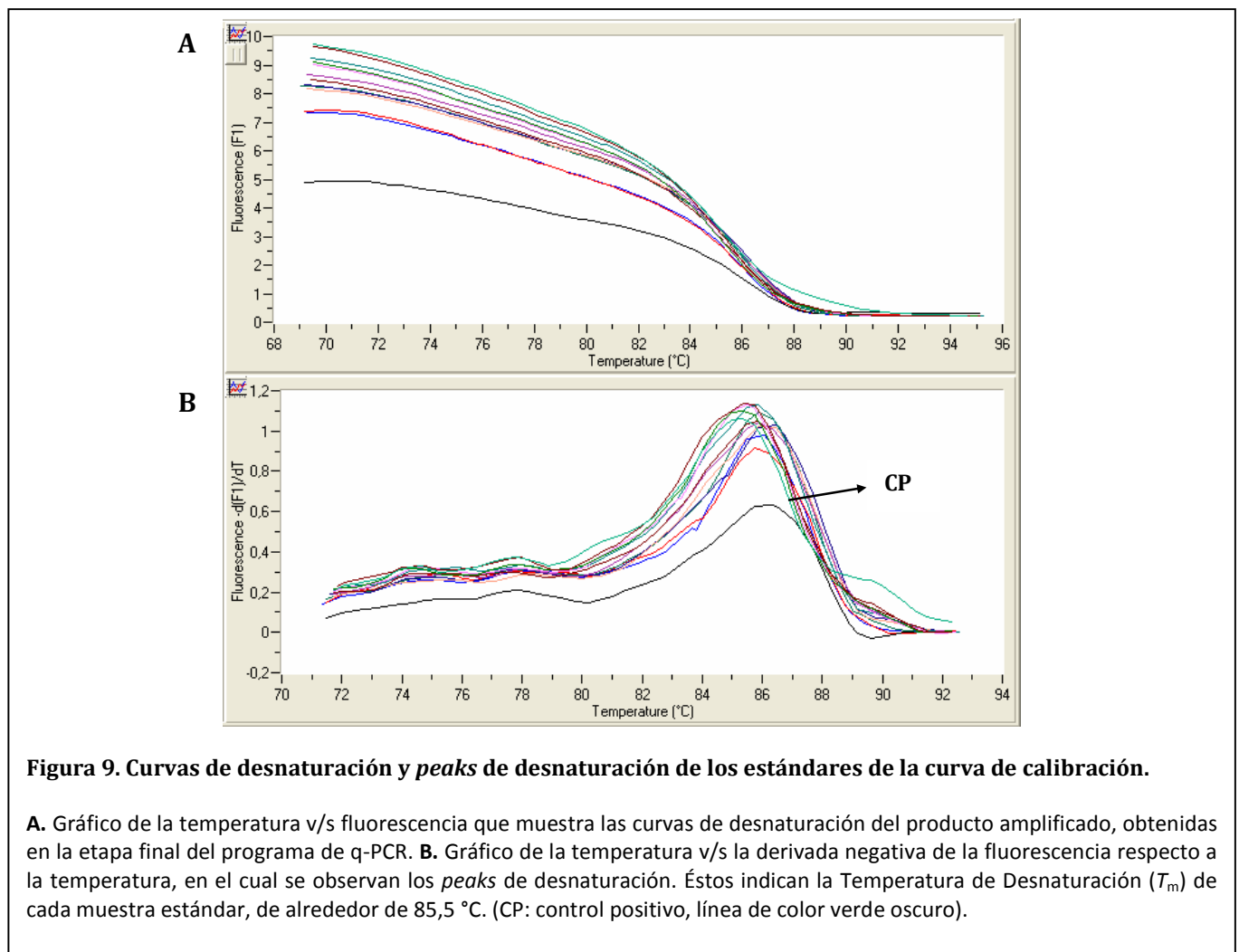


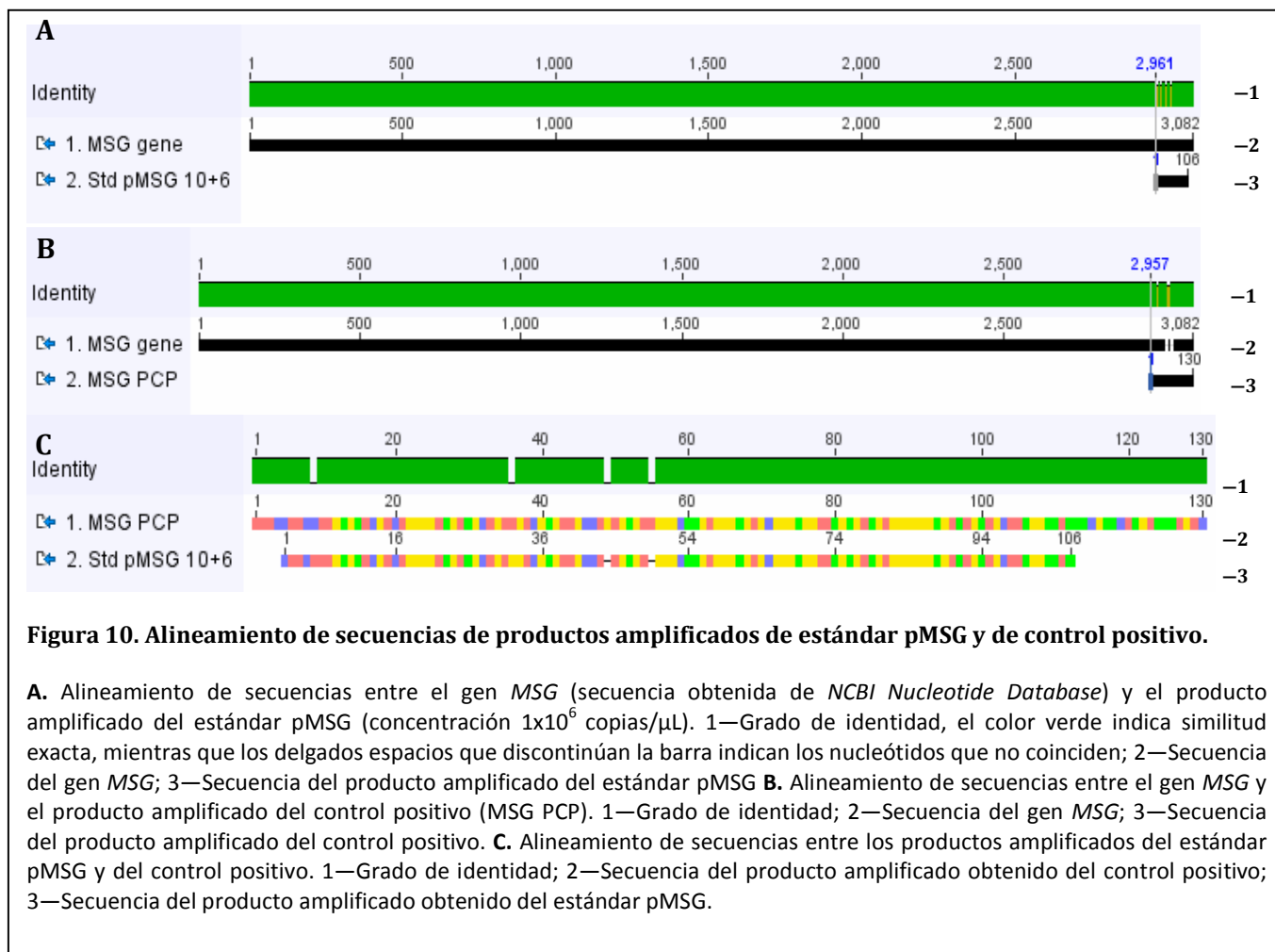
Se secuenciaron algunos productos amplificados para corroborar su identidad (provenientes de las diluciones  $1 \times 10^1$ ,  $1 \times 10^3$  y  $1 \times 10^6$  copias/ $\mu\text{L}$  y del CP). Se analizó la similitud de las secuencias nucleotídicas de los productos con la secuencia del gen completo de *MSG* obtenido en *NCBI Nucleotide Database* (Figura 10). En el caso del estándar pMSG ( $1 \times 10^6$  copias/ $\mu\text{L}$ ) se obtuvo un producto amplificado de 106 pb, según el análisis de secuenciación. Al ser alineado este fragmento con la secuencia del gen completo de *MSG* (3082 pb), se encontró una similitud del 96,2% entre

ambas secuencias. El fragmento alinea en el extremo 3' del gen *MSG*, desde el par n° 2961 hasta el par n° 3067. El fragmento obtenido del control positivo (muestra de tejido pulmonar de paciente con PCP) fue de 130 pb, según el análisis de secuenciación. Éste también alinea con el gen *MSG* en su extremo 3', desde el par n° 2957 hasta el par n° 3082. Se halló en este caso una similitud de secuencias del 97,7%.

En vista de que los amplicones obtenidos del control positivo y del estándar tuvieron un tamaño distinto entre sí, se alinearon sus secuencias a fin de observar qué parte del amplicón más pequeño faltaba (*Figura 10C*). Entre ambos tuvieron una identidad de secuencias de un 96,3%, lo que confirma que se obtuvo el mismo producto; no obstante, el amplicón del estándar, comparado con el amplicón del CP, carece de 2 pb en la zona central, 4 pb en un extremo y 18 pb en el otro extremo. Esto probablemente se debe a una falla en el proceso de secuenciación, ya que comúnmente es difícil secuenciar productos tan cortos.

Ante estas pruebas, se pudo corroborar que el método de PCR Tiempo Real estandarizado amplifica las secuencias correctas de DNA correspondientes al fragmento constante del gen *MSG* de *P. jirovecii* en las muestras de control positivo y estándar.





*DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 3. Cuantificar y normalizar la carga de Pneumocystis jirovecii relativa a la cantidad de DNA humano en muestras no invasivas y de tejido pulmonar de pacientes colonizados.*

Se logró recolectar muestras de tres pacientes que fueron sometidos a cirugía torácica (toracotomía). Las muestras de estos pacientes fueron estudiadas como “muestras pareadas”: muestra no invasiva (GARG+HNF) y muestra invasiva (TP), a fin de comparar la carga de *P. jirovecii* presente en ellas.

Las muestras de tejido pulmonar (TP) de autopsias que fueron analizadas provinieron de lactantes fallecidos por Síndrome de Muerte Súbita (SMS) de 0 a 11 meses de edad, y de adultos sanos fallecidos por violencias de 20 a 60 años de edad. Se seleccionaron 43 muestras de TP provenientes de lactantes y 18 muestras de TP de adultos. Todas estas muestras estaban ya identificadas como positivas para *P. jirovecii*, mediante el método de PCR anidada (n-PCR), pero negativas mediante PCR simple, es decir, eran de individuos colonizados<sup>[31, 49]</sup>.

Las muestras no invasivas de Aspirado Nasofaríngeo (ANF) analizadas, fueron de lactantes sanos de 1 a 9 meses de edad. Se seleccionaron 27 muestras de ANF provenientes de 22 lactantes. Todas eran positivas para *P. jirovecii* mediante n-PCR y negativas mediante PCR simple (individuos colonizados).

**Tabla 1. Clasificación de las muestras analizadas por q-PCR.**

Paciente	Tipo de Muestra	Rango de Edad	n (muestras + según n-PCR)
Adultos sometidos a cirugía torácica	Pareadas: GARG+HNF y TP		3 (pares)
Lactantes fallecidos por SMS	TP	<2 meses	10
		2 – 4 meses	13
		4 – 6 meses	11
		>6 meses	9
Lactantes sanos	ANF	<2 meses	7
		2 – 4 meses	4
		4 – 6 meses	8
		>6 meses	8
Adultos sanos fallecidos por violencias	TP	20 – 40 años	9
		40 – 60 años	9
<b>TOTAL de muestras analizadas por q-PCR</b>			<b>94</b>

GARG: gargarismo; HNF: hisopado nasofaríngeo; TP: tejido pulmonar; ANF: aspirado nasofaríngeo. Las muestras invasivas (TP) y no invasivas (ANF) provenientes de lactantes, fueron clasificadas en los mismos rangos de edad, a fin de comparar las cargas de *Pneumocystis* una vez realizada la cuantificación relativa mediante q-PCR. Todos los pacientes eran aparentemente inmunocompetentes. Todas las muestras utilizadas son positivas para *P. jirovecii* según n-PCR.

Todas las muestras seleccionadas eran positivas para *P. jirovecii* según el método de n-PCR, y fueron clasificadas de acuerdo a los siguientes criterios: grupo de paciente de quien se obtuvo y el tipo de muestra, y rango de edad del paciente (Tabla 1). En el caso de los lactantes sanos, hubo tres de ellos de quienes se tomó más de una muestra de ANF, pero a distinta edad, en exámenes de seguimiento. En vista de esto, se consideraron las muestras por separado, independientemente si provenían de un mismo paciente, con tal que cada una correspondiera a edades diferentes del lactante.

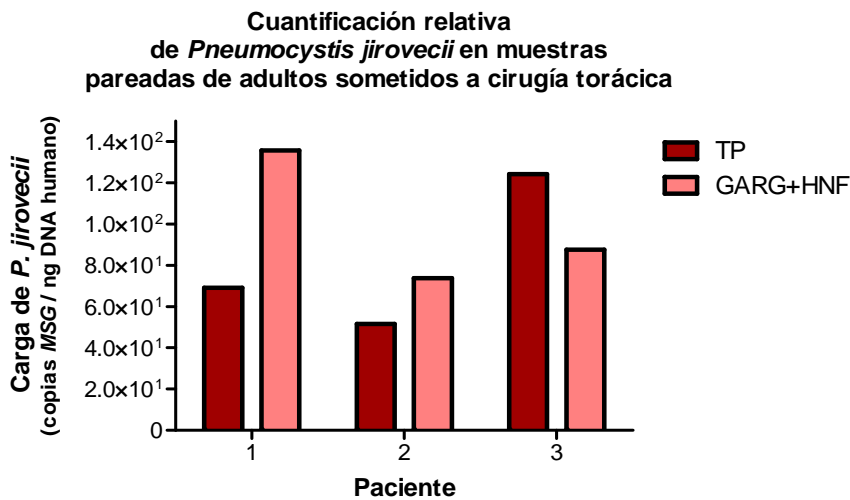
Se procedió a cuantificar por triplicado la carga de *P. jirovecii* en las muestras de pacientes colonizados, sometiéndolas a q-PCR, de modo que en base a la curva de calibración del método, se obtuvo el número de copias de *MSG* por  $\mu\text{L}$  de reacción. Después de la cuantificación de *MSG* de *P. jirovecii* en cada muestra, se cuantificó por duplicado mediante q-PCR el gen de  $\beta$ -Globina humana. Entonces, para cada muestra, se normalizó la cantidad promedio de DNA de *P. jirovecii* con la cantidad promedio de DNA humano. Por lo tanto, se expresó la carga de *P. jirovecii* en copias de *MSG* por ng de DNA humano ( $cMSG/ng\ DNA_h$ ).

Las muestras pareadas de adultos sometidos a cirugía torácica fueron analizadas por q-PCR. Las muestras de gargarismo (GARG) e hisopado nasofaríngeo (HNF) de cada paciente fueron unidas como una sola muestra del tracto respiratorio superior y consideradas como “muestras no invasivas”, mientras que las muestras de tejido pulmonar



fueron “muestras invasivas”. Del DNA extraído de ambos tipos de muestra de cada paciente, se cuantificaron las copias de *MSG* de *P. jirovecii* y, posteriormente, del gen de  $\beta$ -Globina humana para normalizar los resultados.

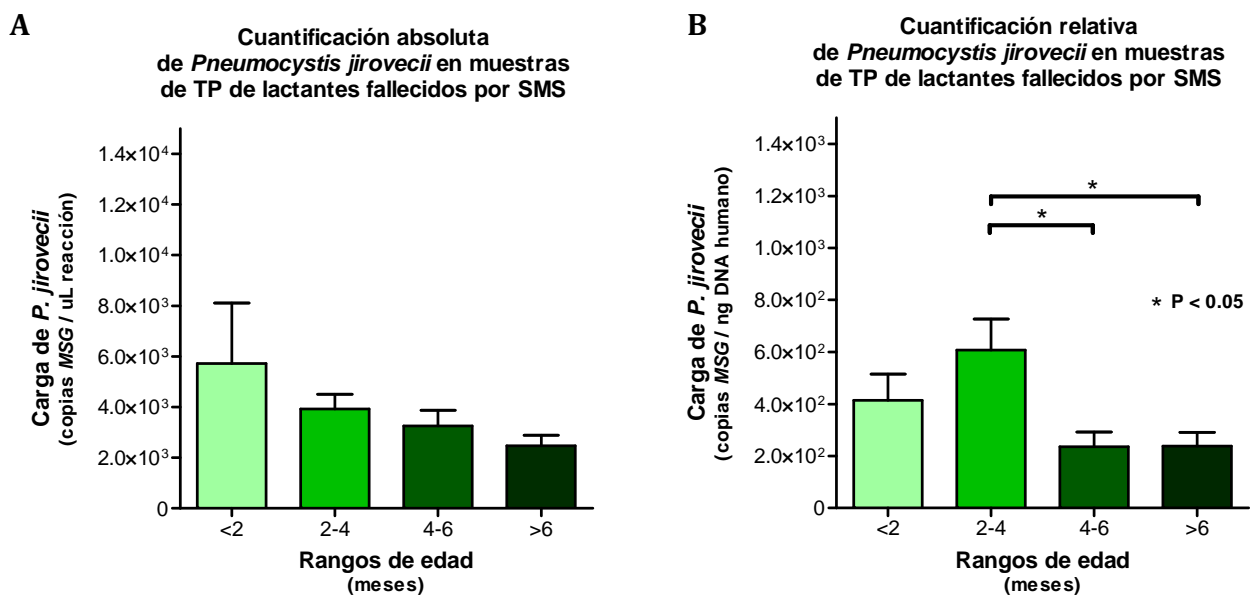
Como lo muestra la *Figura 11*, en dos de los pacientes la cuantificación relativa de *MSG* en las muestras de secreción respiratoria fue levemente mayor que en las muestras de tejido pulmonar; mientras que en el tercer paciente, la carga de *P. jirovecii* cuantificada en los pulmones fue mayor.



**Figura 11. Cuantificación relativa (normalizada) de *MSG* de *P. jirovecii* en muestras pareadas de adultos inmunocompetentes.**

Las muestras pareadas de tres pacientes sometidos a cirugía torácica fueron analizadas por q-PCR. En los pacientes 1 y 2 la muestra de tejido pulmonar (TP) tuvo menor carga relativa de *P. jirovecii* que la muestra de secreción nasofaríngea (gargarismo, GARG + hisopado nasofaríngeo, HNF). En el paciente 3 hubo mayor carga relativa en la muestra de tejido pulmonar.

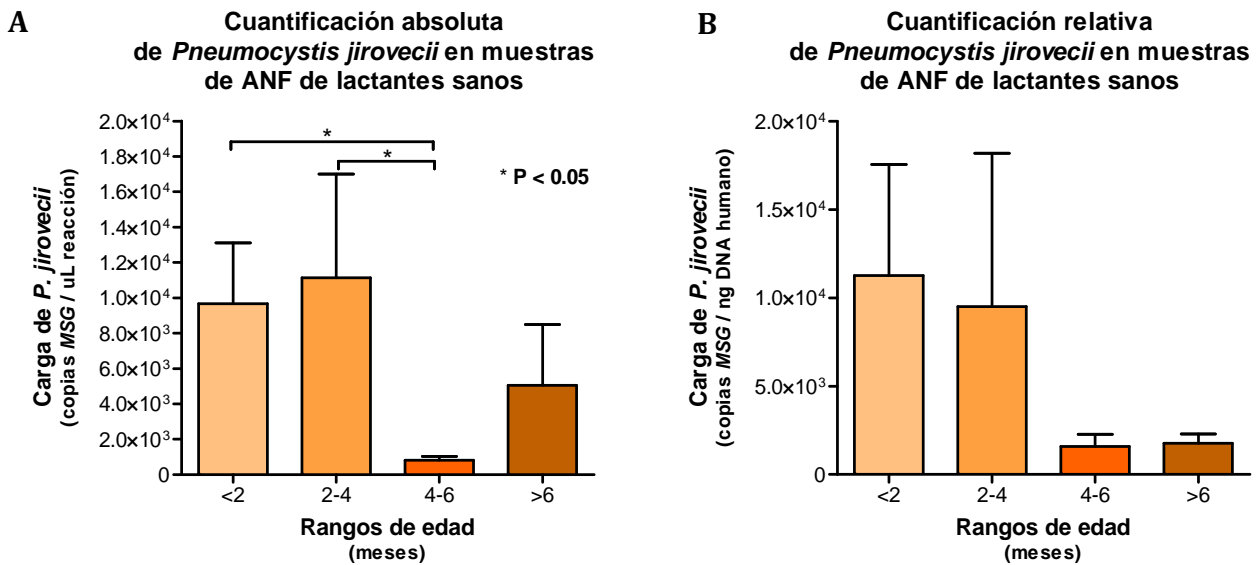
En el caso de las muestras de tejido pulmonar de lactantes fallecidos por SMS, las mayores cargas de *P. jirovecii* se encontraron en las muestras provenientes de los lactantes de entre 2 y 4 meses de edad, alcanzando un promedio cercano a 600 [cMSG/ng DNAh]. En contraste, los promedios de cargas en los demás grupos etarios rondan las 400 [cMSG/ng DNAh], en el caso de los lactantes menores de 2 meses, y las 200 [cMSG / ng DNAh] en el caso de los mayores de 4 meses (*Figura 12*). La diferencia de carga entre los lactantes de 2 a 4 meses y los dos grupos mayores de 4 meses es significativa ( $P < 0,05$ , según *1 way ANOVA* y *Bonferroni's Multiple Comparison test*). Se excluyeron dos datos —uno en el grupo de 2 a 4 meses y uno en el grupo de 4 a 6 meses— ya que se ubicaban fuera del rango establecido por la media  $\pm$  2 desviaciones estándar; en otras palabras, los datos excluidos eran demasiado altos respecto a la carga promedio de su respectivo grupo. Esto se consideró necesario teniendo en cuenta el objetivo de comparar promedios de carga entre lactantes de distintas edades, por lo tanto —al menos en este caso— se requieren datos representativos en cada grupo de pacientes. La cuantificación absoluta de *Pneumocystis* —es decir, previo a la normalización— no presenta el mismo patrón de cargas entre los distintos grupos etarios. En vez de encontrar la mayor carga en el grupo de lactantes de 2 a 4 meses, los datos muestran una carga decreciente a medida que aumenta la edad de los pacientes (*Figura 12A*).



**Figura 12. Cuantificación de *P. jirovecii* en tejido pulmonar de lactantes fallecidos por SMS.**

Ambos gráficos comparan los distintos patrones de carga que resultan antes (A) y después (B) de la normalización de datos. **A.** Cuantificación absoluta —previa a la normalización— considera solamente las copias de *MSG* por  $\mu\text{L}$  de reacción. Datos no paramétricos según *D'Agostino & Pearson omnibus normality test*. No hay diferencias significativas entre ningún par de grupos, según *Kruskal-Wallis test*. **B.** Cuantificación relativa o normalizada es el cociente entre las copias de *MSG* y los ng de DNA de  $\beta$ -Globina. Los lactantes de 2 a 4 meses tienen una carga significativamente mayor que los lactantes mayores de 4 meses de edad ( $P < 0,05$ ), según *1 way ANOVA* y *Bonferroni's Multiple Comparison test*. Ambos gráficos corresponden a promedios y errores estándar (media+SEM). Rangos de edad: menores de 2 meses ( $n=10$ ), de 2 a 4 meses ( $n=12$ ), de 4 a 6 meses ( $n=10$ ) y mayores de 6 meses ( $n=9$ ).

Se llevó a cabo la cuantificación relativa de *MSG* en las muestras de ANF de lactantes sanos, pero no se encontró una diferencia significativa de carga relativa de *P. jirovecii* entre los cuatro grupos etarios (*Figura 13*). Se excluyó un dato en el grupo de lactantes mayores de 6 meses, debido a que quedaba fuera del rango más representativo delimitado por la media  $\pm$  2 desviaciones estándar. El grado de dispersión de los datos en todos los grupos fue más notorio en este tipo de muestra que en las muestras de TP de lactantes, como se mostrará más adelante. Las cargas sin normalizar muestran un patrón semejante a las cargas ya normalizadas (*Figura 13A*).

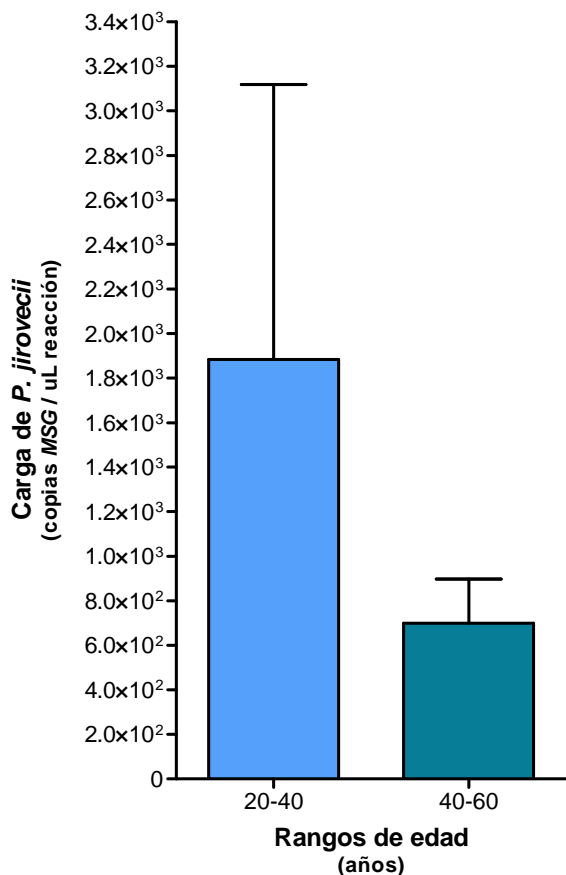


**Figura 13. Cuantificación de *P. jirovecii* en aspirado nasofaríngeo de lactantes sanos.**

Gráficos de comparación de patrones de carga antes (A) y después (B) de normalizar los datos. **A.** Cuantificación absoluta, considera solamente las copias de *MSG* por  $\mu\text{L}$  de reacción. Datos no paramétricos según *Kolmogorov Smirnov normality test*, excepto para el grupo >6 meses. Hay diferencia significativa ( $P < 0,05$ ) entre el grupo de lactantes menores de 2 meses y de 2 a 4 meses con el grupo de lactantes de 4 a 6 meses, según *Kruskal-Wallis* y *Dunn's Multiple Comparison test*. **B.** Cuantificación relativa o normalizada es el cociente entre las copias de *MSG* y los ng de DNA de  $\beta$ -Globina. Datos no paramétricos según *Kolmogorov Smirnov normality test*, excepto para el grupo >6 meses. No hay diferencias significativas entre ningún par de grupos etarios de lactantes, según *Kruskal-Wallis* y *Dunn's Multiple Comparison test*. Se observa un amplio error estándar para la mayoría de los promedios de carga. El patrón de promedios es similar entre ambos gráficos. Rangos de edad: menores de 2 meses ( $n=7$ ), de 2 a 4 meses ( $n=4$ ), de 4 a 6 meses ( $n=8$ ) y mayores de 6 meses ( $n=7$ ). Barras corresponden a la media+SEM.

Se analizó el DNA de 18 muestras de TP de adultos sanos fallecidos por violencias, mediante el método de q-PCR, para cuantificar tanto las copias de *MSG* de *P. jirovecii* como la cantidad de DNA de  $\beta$ -Globina humana, para normalizar. Tras la cuantificación relativa, se observó que hay un promedio mayor de carga de *P. jirovecii* en los adultos de entre 20 y 40 años de edad, aunque no es una diferencia significativa respecto al grupo de más edad (Figura 14). En este caso, la cuantificación absoluta de *P. jirovecii* mostró la misma tendencia que la cuantificación normalizada (Figura 14A).

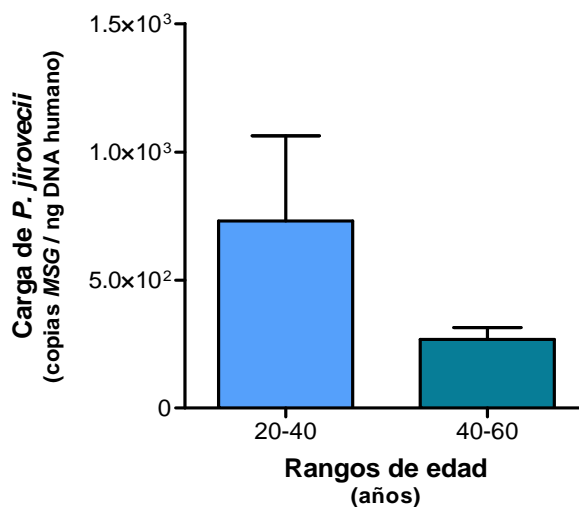
**A** **Cuantificación absoluta de *Pneumocystis jirovecii* en muestras de TP de adultos fallecidos por violencias**



**Figura 14. Cuantificación de *P. jirovecii* en tejido pulmonar de adultos sanos fallecidos por violencias.**

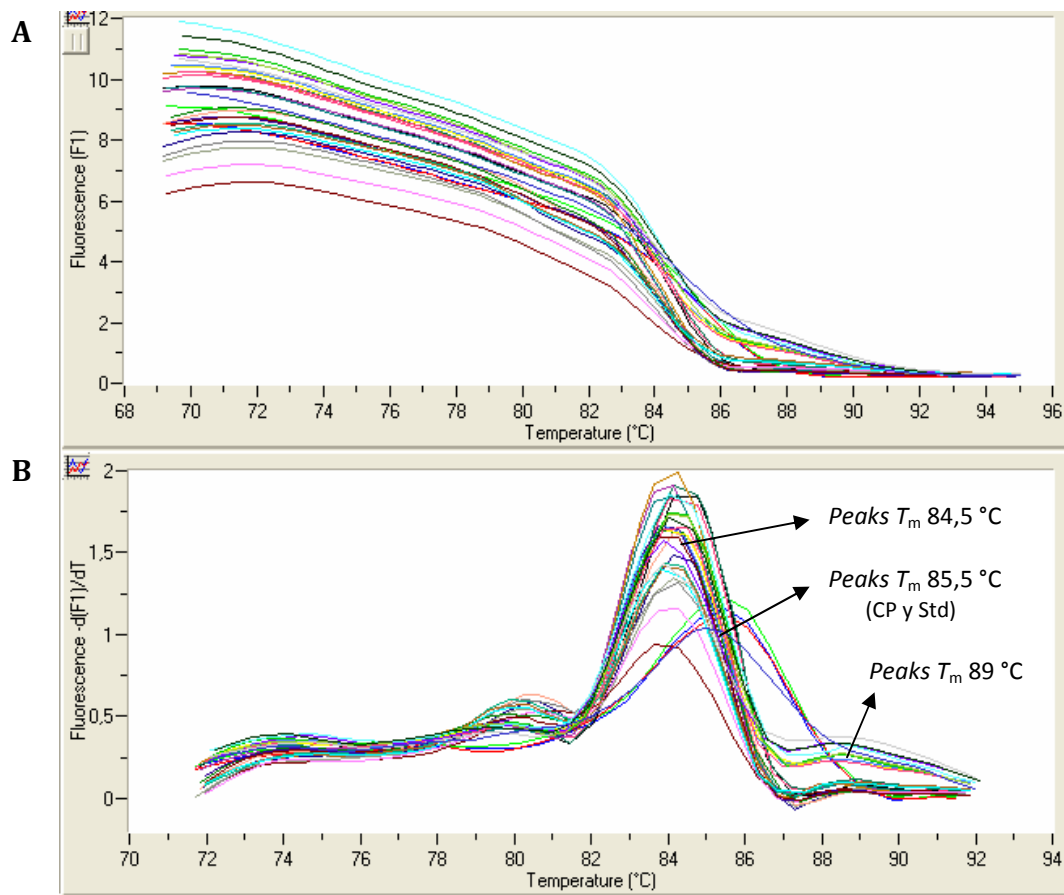
Datos paramétricos, según *D'Agostino & Pearson omnibus normality test*. Según *Unpaired t test*, las diferencias de cargas promedio entre ambos grupos no fueron significativas ( $P > 0,05$ ). **A.** Cuantificación absoluta de *MSG* por  $\mu\text{L}$  de reacción. **B.** Cuantificación relativa (normalizada). Rangos de edad: 20 a 40 años ( $n=9$ ), 40 a 60 años ( $n=9$ ). Barras corresponden a la media+SEM.

**B** **Cuantificación relativa de *Pneumocystis jirovecii* en muestras de TP de adultos fallecidos por violencias**



Para cada serie de muestras sometidas a q-PCR, se realizó un análisis de *melting* —de acuerdo con el programa ingresado al equipo—, con el objetivo de conocer la temperatura de desnaturalización ( $T_m$ ) de los productos amplificados. La  $T_m$  de los CP y de los estándares siempre fue de aproximadamente 85,5 °C, mientras que los *peaks* de desnaturalización de las muestras de colonizados indicaban una  $T_m$  de 1 grado menos (alrededor de 84,5 °C), y un segundo *peak* que indicaba una  $T_m$  de unos 89 °C (Figura 15).

Se hizo necesario investigar cuál era la naturaleza de estos amplicones, de modo que primero se visualizaron los productos en geles de agarosa al 2% con bromuro de etidio. Se observaron dos bandas, una tenue de un tamaño de alrededor de 350-400 pb y una más intensa menor a 100 pb. Luego se purificó el DNA de ambas bandas para secuenciar los productos amplificados. El fragmento mayor tuvo un tamaño de casi 350 pb, y el menor, de alrededor de 60 pb. Entonces se procedió a identificar ambas secuencias, alineándolas con la secuencia del gen *MSG* de *P. jirovecii*, obtenida de *NCBI Nucleotide Database*. Este análisis mostró que ambas secuencias alinean en la zona variable del gen, pero en distintos lugares. El fragmento de unos 350 pb alinea desde el par 2002 del gen *MSG* en dirección 3', con una similitud de secuencias del 66,8%, mientras que el fragmento de unos 60 pb alinea desde el par 822 en dirección 5', con una similitud de secuencias del 69,6% (Figura 16).

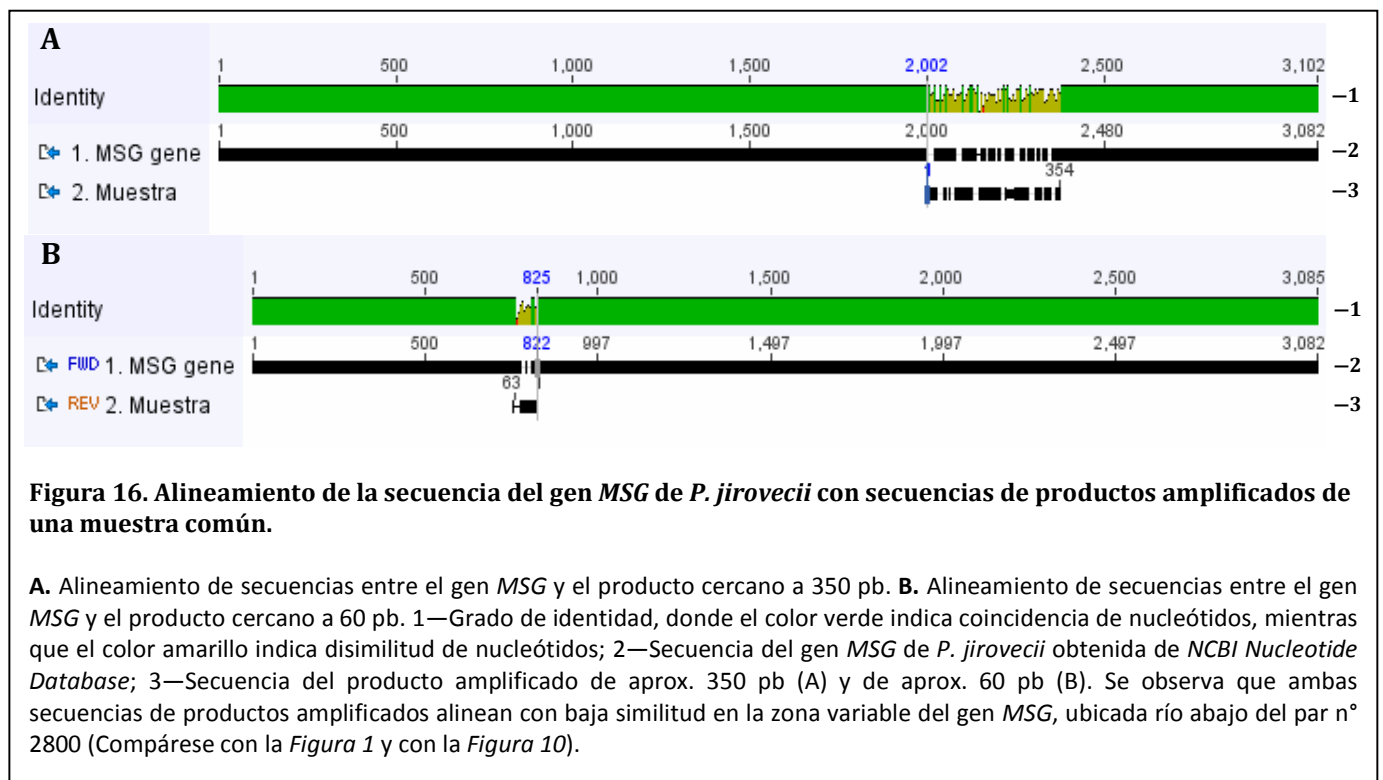


**Figura 15. Análisis de desnaturalización (*melting*) de productos amplificados provenientes de muestras de individuos colonizados.**

**A.** Gráfico de fluorescencia v/s temperatura, muestra las curvas de desnaturalización de los productos amplificados obtenidos tras la etapa de PCR. **B.** Gráfico de la derivada negativa de la fluorescencia respecto a la temperatura v/s temperatura, muestra los *peaks* de desnaturalización que indican la  $T_m$  de cada producto. La primera y la tercera serie de *peaks*, ubicadas hacia los 84,5 °C y los 89 °C, respectivamente, corresponden a los productos obtenidos a partir del DNA de muestras de individuos colonizados. La segunda serie de *peaks*, ubicada hacia los 85,5 °C, corresponde a los productos amplificados a partir del DNA de los controles positivos (CP) y los estándares pMSG (Std).

Debido a que los porcentajes de similitud de secuencias obtenidos en la secuenciación no fueron lo suficientemente altos, se realizó otro análisis para verificar la homología de secuencias entre los productos amplificados y una serie de genomas de distintos organismos. Para esto se utilizó la herramienta *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* de *NCBI*. Se realizó un análisis de *Nucleotide BLAST* con las secuencias del producto amplificado de 354 pb, el de 63 pb, el del control positivo y el del estándar, para hallar similitud con algún gen de cualquier organismo. En el caso de los amplicones del control positivo y del estándar, tuvieron una identidad muy alta con el gen *MSG* de *Pneumocystis jirovecii* (cerca de un 98%). Y en el caso de los amplicones provenientes de pacientes colonizados —los fragmentos de 354 y 63 pb—, hubo un 72% de identidad con el gen *MSG* de *P. jirovecii*. No hubo similitud de secuencias con ningún otro microorganismo, por lo que se descartó la posibilidad de que se estuviera detectando algún patógeno del tracto respiratorio distinto a *Pneumocystis* (Datos no mostrados).

Sin embargo, también se halló alta identidad de los amplicones con un gen humano (*Homo sapiens* BAC clone RP11-224B10). De modo que para comprobar definitivamente que nuestros amplicones corresponden efectivamente a *MSG* de *P. jirovecii*, y descartar que correspondan a un gen humano, se analizaron por q-PCR algunas muestras de pacientes negativos para *P. jirovecii*, según n-PCR (controles sin *Pneumocystis*), incluyendo controles positivos (pacientes PCP), pacientes colonizados y controles blanco (agua). Los resultados fueron negativos para los controles sin *Pneumocystis*, con lo cual se confirmó que los productos amplificados corresponden a *MSG* de *P. jirovecii* y no de un gen humano (Datos no mostrados).

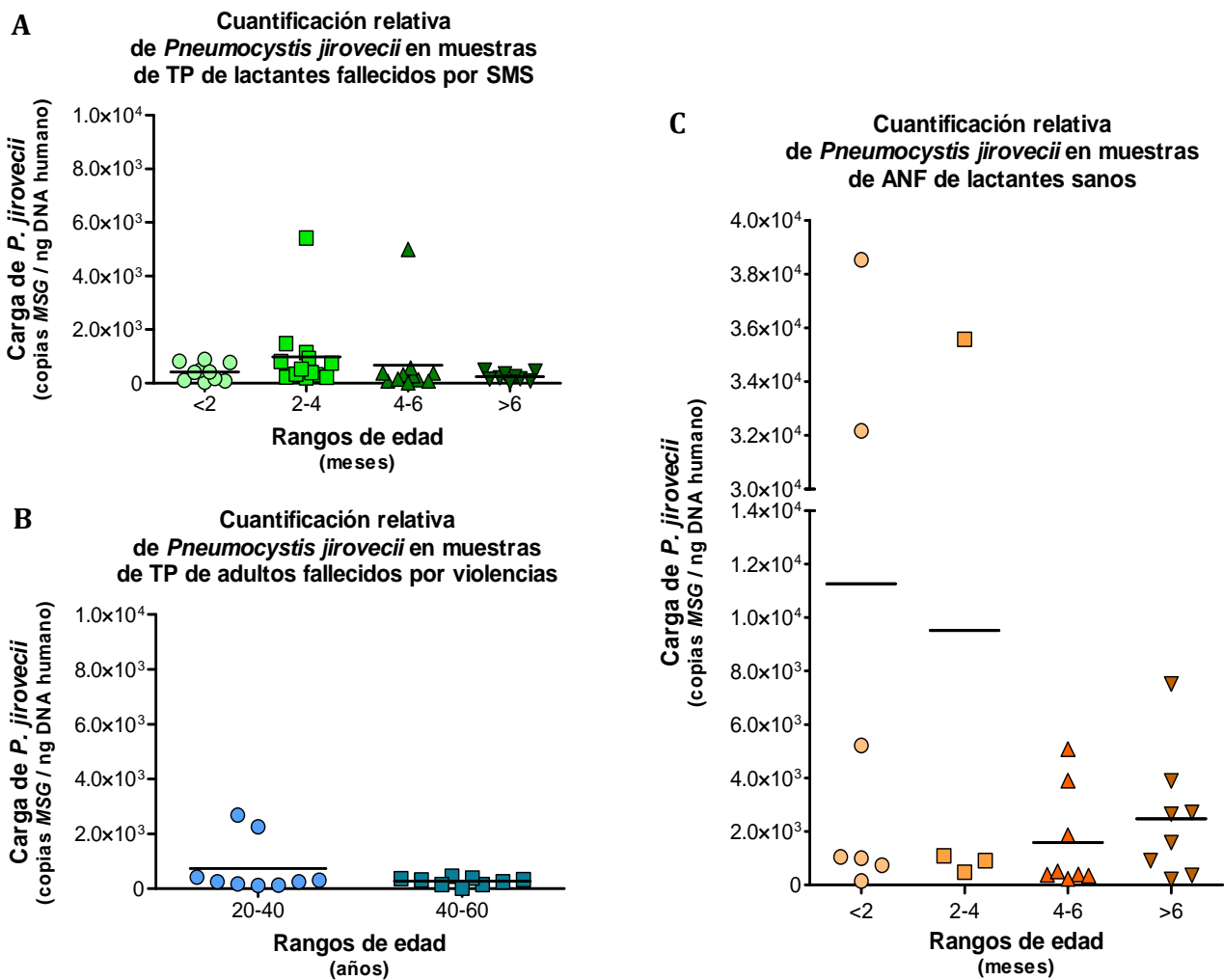


**DEL OBJETIVO ESPECÍFICO 4. Comparar carga de *Pneumocystis jirovecii* entre muestras respiratorias no invasivas y muestras de tejido pulmonar, en base a los resultados obtenidos en el objetivo específico 3.**

Se procedió a analizar qué tipo de muestras serán más confiables en cuanto a precisión de resultados. Para ello, se comparó el grado de dispersión de datos entre muestras invasivas (TP) de lactantes y adultos, y muestras no invasivas (ANF) de lactantes (*Figura 17*). Como resultado, se evidenció que las muestras no invasivas presentan mayor dispersión de cargas relativas, al tener algunas desviaciones estándar mucho mayores que las de los promedios de carga calculadas para las muestras invasivas (*Tabla 2*). En los tres grupos de muestras analizadas (TP de lactantes, TP de adultos y ANF de lactantes) se consideraron todos los datos, incluyendo aquéllos que se encontraban fuera del rango establecido por la media  $\pm$  2 desviaciones estándar. Al examinar los datos más dispersos, se puso especial cuidado en que la cuantificación de *MSG* (hecha en triplicado) y del gen de  $\beta$ -Globina humana (hecha en duplicado)

tuviesen valores precisos, todos cercanos al promedio de cada muestra, para asegurarse de que no hubiese errores en la medición.

Las dos muestras de TP de lactantes que presentaron cargas de *P. jirovecii* muy elevadas respecto a las demás (datos fuera del rango de la media  $\pm$  2 desviaciones estándar), tuvieron una baja cuantificación de DNA humano, por eso el valor normalizado arrojó valores tan altos. En el caso de las muestras de TP de adultos, hubo dos muestras que presentaron una cuantificación elevada de *MSG* y normal del gen de  $\beta$ -Globina humana respecto a las demás, lo cual sugiere que ambos pacientes cursaban una infección asintomática de *Pneumocystis*.



**Figura 17. Gráficos de dispersión para comparación entre muestras invasivas y no invasivas.**

**A.** Cargas normalizadas de *P. jirovecii* en muestras de tejido pulmonar (TP) de lactantes fallecidos por SMS. Grupos etarios: menores de 2 meses (n=10); de 2 a 4 meses (n=13); de 4 a 6 meses (n=11), y mayores de 6 meses (n=9). **B.** Cargas normalizadas de *P. jirovecii* en muestras de tejido pulmonar (TP) de adultos sanos fallecidos por violencias. Grupos etarios: de 20 a 40 años (n=9), y de 40 a 60 años (n=9). **C.** Cargas normalizadas de *P. jirovecii* en muestras de aspirado nasofaríngeo (ANF) de lactantes sanos. Grupos etarios: menores de 2 meses (n=7); de 2 a 4 meses (n=4); de 4 a 6 meses (n=8), y mayores de 6 meses (n=8). Cada círculo, cuadrado o triángulo representa la carga relativa de *P. jirovecii* de un paciente.

En cuanto a las muestras de ANF, se observó que algunos de los valores de carga relativa más altos y alejados de la mediana de cada rango de edad, tuvieron una cuantificación de DNA humano muy baja, y por eso, al normalizar, resultaron valores tan elevados de carga de *Pneumocystis*. Pero en otros casos, la cuantificación de *MSG* fue muy alta respecto al resto, mientras que la cantidad de DNA humano medido fue normal con respecto a las demás muestras de su grupo.

Al comparar los gráficos de la *Figura 17*, se evidencia un alto grado de dispersión en los datos de la cuantificación de *P. jirovecii* en las muestras de ANF, respecto a las muestras de TP.

**Tabla 2. Desviaciones estándar de los promedios de carga relativa de *P. jirovecii* en muestras invasivas y no invasivas.**

<b>Tipo de Muestra</b>	<b>Rango de Edad</b>	<b>Promedio de Carga (cMSG /ngDNAh)</b>	<b>Desviación Estándar (cMSG /ngDNAh)</b>
TP	<2 meses	414,8	319,9
	2 – 4 meses	977,5	1391,2
	4 – 6 meses	668	1443,8
	>6 meses	238,8	158,8
TP	20 – 40 años	730,3	997,1
	40 – 60 años	268	139,4
ANF	<2 meses	11265,5	16634,6
	2 – 4 meses	9514,1	17370,0
	4 – 6 meses	1589,7	1894,4
	>6 meses	2484	2399,4

TP: tejido pulmonar (muestras invasivas); ANF: aspirado nasofaríngeo (muestras no invasivas). Los resultados de desviaciones estándar fueron calculados en base a los mismos datos que están graficados en la *Figura 17*. Las barras rojas grafican el valor de desviación estándar correspondiente.



## V. DISCUSIÓN

El método de PCR Tiempo Real ofrece ventajas muy notables para el diagnóstico molecular <sup>[1, 2, 10]</sup>. Sin embargo, presenta ciertas desventajas o inconvenientes que pueden surgir en su montaje o su aplicación <sup>[11, 31]</sup>. En esta tesis así sucedió. Pero por otra parte se descubrieron aspectos muy interesantes que abren el camino para futura investigación.

Ante todo, se confirmó la importancia de la cuantificación relativa, obtenida por la normalización de datos. De hecho, este paso es fundamental si se quiere obtener cuantificaciones comparables entre sí. En este sentido, la normalización le otorga utilidad a los resultados. Por ejemplo, cuando se cuantificó *P. jirovecii* en las muestras de lactantes, ya sea en TP como en ANF, se observó claramente que los patrones de carga absoluta en los distintos grupos etarios cambiaban cuando se normalizaban los datos. Esto permitió analizar y sacar conclusiones plausibles en el caso de los lactantes fallecidos por SMS. Se hallaron cargas significativamente mayores en el grupo de lactantes de 2 a 4 meses de edad, lo cual concuerda con la mayor prevalencia de infección primaria documentada en lactantes de esa misma edad <sup>[58]</sup>.

En cuanto al análisis de las muestras pareadas de adulto, los resultados encauzan a investigación adicional. Al ser tan solo tres pacientes de quienes se analizó muestras del tracto respiratorio superior e inferior simultáneamente, los resultados obtenidos no pueden evidenciar si *Pneumocystis* coloniza mayormente la zona nasofaríngea o la zona broncopulmonar del paciente colonizado. Más bien, estos datos indican —en primera instancia— que bastaría con analizar muestras no invasivas (del tracto respiratorio superior) para detectar la presencia de *P. jirovecii* en los pulmones del paciente colonizado. Y esto puede ser cierto en cualquiera de los dos casos: ya sea cuando la carga del microorganismo es mayor en la nasofaringe, o bien, cuando lo es en la zona broncopulmonar.

Se observó que no siempre es fácil escoger un gen idóneo como blanco de detección. Cuando el objetivo al montar la técnica de q-PCR es cuantificar carga de *Pneumocystis* en pacientes con neumonía (PCP), la estandarización suele ser relativamente simple <sup>[4]</sup>. Pero la labor se torna más complicada cuando se requiere cuantificar cargas bajas en hospederos colonizados. En el caso de esta tesis, el método resultó excelente cuando se medían muestras provenientes de pacientes con neumonía por *Pneumocystis*, las cuales correspondían a los controles positivos usados en cada medición. Pero no fue así cuando se analizaron muestras obtenidas de individuos colonizados. Aunque había detección y cuantificación de producto amplificado, éste no resultó ser precisamente el fragmento de DNA que se buscaba, sino que eran dos productos de distinto tamaño, que alineaban en distintas partes del gen blanco escogido (*MSG*), según el análisis de secuencias.

En vista de lo anterior, surge la inquietud de cuál sería la forma más correcta de expresar los resultados de carga relativa de *P. jirovecii*. Considerando que el producto detectado no correspondía precisamente al fragmento previsto de *MSG* (región altamente conservada), sino que eran otras dos regiones de ese mismo gen, se podría expresar la carga relativa de *P. jirovecii* como “unidades arbitrarias de *MSG*” por ng de DNA humano. En realidad,

habría un desfase entre la cantidad de copias medidas y la cantidad de copias reales de este gen. Como este desfase es constante, la cuantificación absoluta se puede considerar válida al expresarla como “unidades arbitrarias de *MSG*”.

Tras el análisis de secuencias, se halló una baja similitud entre los productos amplificados y el gen *MSG*. Esto podría deberse a que ambos productos alineaban en la zona variable del gen, por ello no todas las bases coincidían. Cabe destacar que la secuencia de *MSG* utilizada para este análisis fue una seleccionada de entre muchas secuencias variadas de *MSG* descritas en *NCBI Nucleotide Database*, y además el análisis de secuenciación y alineamiento sólo se realizó con unas cuantas muestras escogidas de la totalidad de muestras de este estudio. Por esto, es lógico que las secuencias usadas para el análisis tengan sólo una similitud parcial con la secuencia de *MSG* seleccionada.

Ante estos resultados, se abre un interesante campo de investigación que podría responder a interrogantes como las siguientes: ¿Por qué se detectaban regiones distintas del gen *MSG* en muestras de pacientes colonizados, respecto a muestras de pacientes PCP (controles positivos)? Cuando las muestras de DNA de pacientes PCP eran diluidas a fin de asemejarlas a DNA de colonizados, ¿por qué se detectaba de todas formas la zona predeterminada de *MSG*? En estos casos ¿por qué no eran detectadas las otras dos secciones del gen, como sucedía con el DNA de pacientes colonizados? ¿Serán los organismos de *Pneumocystis* que causan PCP distintos a los que colonizan, en cuanto a sus secuencias de *MSG*? Estas preguntas surgieron a raíz de los inesperados resultados que se obtuvieron en esta tesis; sólo investigaciones posteriores las podrían esclarecer.

Otras evidencias interesantes que surgieron en este estudio fueron referentes a los tipos de muestra analizados. Se observó que las muestras de tejido pulmonar (TP) serían más confiables que las muestras de aspirado nasofaríngeo (ANF), para obtener una cuantificación más certera. Debido a la naturaleza acuosa de las muestras no invasivas, la cantidad de DNA humano que se obtenga en la muestra es muy variable, lo cual se convierte en un inconveniente para la normalización de datos. Este problema no fue notorio en el caso de las muestras de TP; como es tejido sólido y no una secreción acuosa, la cantidad de DNA humano obtenido dependerá en gran manera del tamaño de la muestra. Probablemente por esta razón los datos de cuantificación de *P. jirovecii* en TP tienen baja dispersión. Por el contrario, como ANF es una muestra de secreción respiratoria, puede ser muy variable la cantidad de células del hospedero que son arrastradas junto con la secreción al momento de la toma de muestra, independiente del volumen que se obtenga. Teniendo esto presente, a veces la muestra de ANF puede contener una carga “normal” de *Pneumocystis* para un individuo colonizado, pero una baja cantidad de células del hospedero, y por ende poco DNA humano. De modo que al normalizar, el resultado arrojaría una carga relativa de *Pneumocystis* aparentemente alta. O bien, podría suceder a la inversa: obtener un resultado de carga aparentemente bajo en un individuo colonizado, habiendo analizado una muestra de ANF con alta carga de *Pneumocystis* y una cantidad elevada de células del hospedero. En resumen, la variabilidad de composición de la muestra de ANF sugiere la necesidad de normalizar y analizar el resultado tomando en cuenta la cuantificación de *MSG* y del gen de  $\beta$ -Globina humana para comparar cargas. Estudios adicionales son necesarios para estandarizar tomas de muestra y determinar cuáles de éstas serían las más apropiadas para diagnóstico de colonización.

A pesar de los inconvenientes mencionados, el método de q-PCR implementado en esta investigación presenta una ventaja destacable por sobre otros montajes desarrollados en el extranjero <sup>[1, 2, 4, 13, 16, 21, 22, 23, 25]</sup>: se utilizaron muestras de tejido pulmonar humano, algo que es realizable gracias a que la legislación del país lo permite, mientras que en el extranjero no es posible hacerlo. Esto permitió que se estudiara de forma cuantitativa el grado en el que infecta *P. jirovecii* los pulmones de lactantes fallecidos por SMS, a distintas edades. Además, podemos proyectar un trabajo que compare cargas de *Pneumocystis* entre muestras de secreción respiratoria y muestras de tejido pulmonar, a fin de estudiar la forma que tiene este hongo de colonizar el tracto respiratorio humano.

Por otro lado, los estudios de prevalencia de *Pneumocystis* ya hechos en todo tipo de pacientes colonizados, tanto lactantes como adultos vivos, se pueden profundizar al cuantificar carga de este microorganismo en muestras no invasivas, y así obtener datos valiosos que se puedan correlacionar con la morbilidad de algunos pacientes o con las edades de mayor prevalencia de infección <sup>[54, 56, 57]</sup>.

En conclusión, este trabajo demostró que es necesario normalizar los resultados de cuantificación si se quieren obtener datos comparables entre sí, ya que la cuantificación absoluta en realidad no nos informa si el paciente tiene alta o baja carga de *Pneumocystis*, al no tener una referencia sobre la cual comparar. Además, se evidenció que las muestras de composición homogénea —como tejido pulmonar— son más confiables para obtener resultados precisos, aún cuando se trabaja con cuantificaciones relativas.

## REFERENCIAS

1. Alvarez-Martínez M, Miró J, Valls M, Moreno A, Rivas P, Solé M, Meshnick S, et al. **Sensitivity and specificity of nested and real-time PCR for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 56:153-160 (2006).
2. Arcenas R, Uhl J, Buckwalter S, Limper A, Crino D, Roberts G, Wengenack L. **A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid.** *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 54:169-175 (2006).
3. Baughman R, Strohofer S, Colangelo G, Frame P. **Semiquantitative Technique for Estimating *Pneumocystis carinii* Burden in the Lung.** *Journal of Clinical Microbiology* 28(6): 1425-1427 (1990).
4. Brandt D, Monecke S. **Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii*.** *Transplant Infectious Disease* 9:196-202 (2007).
5. Durand-Joly I, Chabé M, Soula F, Delhaes L, Camus D, Dei-Cas E. **Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*.** *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 45:405-410 (2005).
6. Edman J, Kovacs J, Masur H, et al. **Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi.** *Nature* 334:519-522 (1988).
7. Edman U, Edman J, Lundgren B, Santi D. **Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidilate synthase gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:6503-6507 (1989).
8. Edman J, et al. **Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:8625-8629 (1989).
9. Eisen D, Ross B, Fairbairn J, Warren R, Baird R, Dwyer B. **Comparison of *Pneumocystis carinii* detection by toluidine blue O staining, direct immunofluorescence and DNA amplification in sputum specimens from HIV positive patients.** *Pathology* 26(2):198-200 (1994).
10. Heid C, Stevens J, Livak K, Williams P.M. **Real Time Quantitative PCR.** *Genome Research* 6:986-994 (1996).
11. Hendriks-Balk M, Michel M, Alewijnse A. **Pitfalls in the normalization of real-time polymerase chain reaction data.** *Basic Research of Cardiology* 102:195-197 (2007).
12. Huang L, Morris A, Limper A, Beck J. **An Official ATS Workshop Summary: Recent Advances and Future Directions in *Pneumocystis Pneumonia (PCP)*.** *Proceedings of American Thoracic Society* 3:655-664 (2006).
13. Huggett J, Taylor M, Kocjan G, Evans H, Morris-Jones S, Gant V, Novak T, Costello A, Zumla A, Millar R. **Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients.** *Thorax* 63:154-159 (2008).
14. Hughes W. ***Pneumocystis carinii* pneumonia: new approaches to diagnosis, treatment and prevention.** *The Pediatric Infectious Disease Journal* 10:391-399 (1991).
15. Iliades P, et al. **Cloning of the *Pneumocystis jirovecii* trifunctional FAS gene and complementation of its DHPS activity in *Escherichia coli*.** *Fungal Genetic Biology* 41:1053-1062 (2004).
16. Kaiser K, Rabodonirina M, Picot S. **Real time quantitative PCR and RT-PCR for analysis of *Pneumocystis carinii hominis*.** *Journal of Microbiological Methods* 45:113-118 (2001).

17. Kovacs J, et al. **Multiple genes encode the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*.** *Journal of Biological Chemistry* 268:6034-6040 (1993).
18. Kutty G, Ma L, Kovacs J. **Characterization of the expression site of the major surface glycoprotein of human-derived *Pneumocystis carinii*.** *Molecular Microbiology* 42:183-193 (2001).
19. Kutty G, Maldarelli F, Achaz G, Kovacs J. **Variation in the Major Surface Glycoprotein Genes in *Pneumocystis jirovecii*.** *Journal of Infectious Diseases* 198(5):741-749 (2008).
20. Laakkonen J. ***Pneumocystis carinii* in wildlife.** *International Journal of Parasitology* 28:241-252 (1998).
21. Larsen H, Masur H, Kovacs J, Gill V, Silcott V, Kogulan P, Maenza J, Smith M, Lucey D, Fischer S. **Development and Evaluation of a Quantitative, Touch-Down, Real-Time PCR Assay for Diagnosing *Pneumocystis carinii* Pneumonia.** *Journal of Clinical Microbiology* 40(2):490-494 (2002).
22. Larsen H, Huang L, Kovacs J, Crothers K, Silcott V, Morris A, Turner J, Beard C, Masur H, Fischer S. **A Prospective, Blinded Study of Quantitative Touch-Down Polymerase Chain Reaction Using Oral-Wash Samples for Diagnosis of *Pneumocystis Pneumonia* in HIV-Infected Patients.** *The Journal of Infectious Diseases* 189:1679-1683 (2004).
23. Larsen H, von Linstow M, Lungren B, Høgh B, Westh H, Lundgren J. **Primary *Pneumocystis* Infection in Infants Hospitalized with Acute Respiratory Tract Infection.** *Emerging Infectious Diseases* 13(1):66-72 (2007).
24. Linke M, Cushion M, Walter P. **Properties of the major antigens of rat and human *Pneumocystis carinii*.** *Infection and Immunity* 57:1547-1555 (1989).
25. Linssen C, Jacobs J, Beckers P, Templeton K, Bakkers J, Kuijper E, Melchers W, Drent M, Vink C. **Inter-laboratory comparison of three different real-time PCR assays for the detection of *Pneumocystis jirovecii* in bronchoalveolar lavage fluid samples.** *Journal of Medical Microbiology* 55:1229-1235 (2006).
26. Ma L, Kovacs J, **Expression and characterization of recombinant human-derived *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase.** *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 44:3092-3096 (2000).
27. Matos O, Costa M, Correia I, Monteiro P, y cols. **Infecção por *Pneumocystis jirovecii* em imunocompetentes com patologia pulmonar, em Portugal.** *Acta Medica Portugal* 19:121-126 (2006).
28. Matsumoto Y, Yoshida Y. **Sporogony in *Pneumocystis carinii*: sinaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts.** *The Journal of Protozoology* 31:420-428 (1984).
29. Medrano F, Montes-Cano M, Conde M, Horra C, Respaldiza N, Gasch A, Perez-Lozano M, Varela J, Calderon E. ***Pneumocystis jirovecii* in General Population.** *Emerging Infectious Diseases* 11(2):245-250 (2005).
30. Meijerink J, Mandigers C, van de Locht L, Tönnessen E, Goodsaid F, Raemaekers J. **A Novel Method to Compensate for Different Amplification Efficiencies between Patient DNA Samples in Quantitative Real-Time PCR.** *Journal of Molecular Diagnostics* 3(2):55- (2001).
31. Miller R, Huang L. **A Need for Standardized Definitions for Clinical Studies of *Pneumocystis*.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53(S1): S87-S88 (2006).
32. Morris A, Beard C, Huang L. **Update on the epidemiology and transmission of *Pneumocystis carinii*.** *Microbes Infect* 4:95-103 (2002).
33. Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. **Epidemiology and Clinical Significance of *Pneumocystis* Colonization.** *The Journal of Infectious Diseases* 197:10-17 (2008).

34. Nevez G, Raccurt C, Jounieaux V, Dei-Cas E, Mazars E. **Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV- positive patients.** *Aids* 13:535-536 (1999).
35. Nevez G, Totet A, Pautard J, Rancourt C. ***Pneumocystis carinii* detection using nested PCR in nasopharyngeal aspirates of immunocompetent infants with bronchiolitis.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* Suppl:122S-123S (2001).
36. Newton D, Rao K, Dluhy R, Baatz J. **Hemoglobin is expressed by alveolar epithelial cells.** *The Journal of Biological Chemistry* 281(9): 5668-5676 (2006).
37. Pifer L, Hughes W, Stagno S, Woods D. ***Pneumocystis carinii* Infection: Evidence of High Prevalence in Normal and Immunosuppressed Children.** *Pediatrics* 61(1):35-41 (1978).
38. Procop G, Haddad S, Quinn J, Wilson M, Henshaw N, Reller L, Artymyshyn R, Katanik M, Weinstein M. **Detection of *Pneumocystis jirovecii* in Respiratory Specimens by Four Staining Methods.** *Journal of Clinical Microbiology* 42(7): 3333-3335 (2004).
39. Rabodonirina M, Raffentot D, Cotte L, et al. **Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from human immunodeficiency virus-infected patients: use of a simple DNA extraction procedure and nested PCR.** *Journal of Clinical Microbiology* 35:2748-2751.
40. Rohner P, Jacomo V, Studer R, Schrenzel J, Graf J. **Detection of *Pneumocystis jirovecii* by Two Staining Methods and Two Quantitative PCR Assays.** *Infection* Dec. 5 (2008).
41. Sing A, Trebesius K, Roggenkamp A, Rüssmann H, Tybus K, Pfaff F, Bogner J, Emminger C, Heesemann J. **Evaluation of Diagnostic Value and Epidemiological Implications of PCR for *Pneumocystis carinii* in Different Immunosuppressed and Immunocompetent Patient Groups.** *Journal of Clinical Microbiology* 38(4): 1461-1467 (2000).
42. Skawran B, Dierich M, Steinemann D, Hohlfeld J, Haverich A, Schlegelberger B, Welte T, von Neuhoff N. **Bronchial epithelial cells as a new source for differential transcriptome analysis after lung transplantation.** *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 36:715-721 (2009).
43. Souza W, Benchimol M. **Basic biology of *Pneumocystis carinii* – A Mini Review.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100(8):903-908 (2005).
44. Stedman T, Butler D, Buck G. **The HSP70 gene family in *Pneumocystis carinii*: molecular and phylogenetic characterization of cytoplasmic members.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* 45:589-599 (1998).
45. Stringer J, Keely S. **Genetics of Surface Antigen Expression in *Pneumocystis carinii*.** *Infection and Immunity* 69(2):627-639 (2001).
46. Stringer J, Beard C, Miller R, Wakefield A. **A New Name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from Humans.** *Emerging Infectious Diseases* 8(9):891-896 (2002).
47. Stringer J. **Antigenic Variation in *Pneumocystis*.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* 54(1):8-13 (2006).
48. Thomas Jr C, Limper A. ***Pneumocystis* Pneumonia.** *The New England Journal of Medicine* 350:2487-2498 (2004).
49. Thomas Jr C, Limper A. **Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia.** *Nature Reviews. Microbiology* 5:298-308 (2007).
50. Totet A, Respalda N, Pautard J, Raccurt C, Nevez G. ***Pneumocystis jirovecii* Genotypes and Primary Infection.** *Clinical Infectious Diseases* 36:1340-1342 (2003).
51. Tse C, Capeau J. **Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel.** *Annales de Biologie Clinique* 61 : 279-293 (2003).

52. Varela J, Respadiza N, Sanchez B. **Lymphocyte response in subjects with chronic pulmonary disease colonized by *Pneumocystis jirovecii*.** *Journal of Eukaryotic Microbiology* 50 Suppl: 672- 673 (2003).
53. Vargas S, Hughes W, Wakefield A, Oz H. **Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia.** *The Journal of Infectious Diseases* 172(2): 506-510 (1995).
54. Vargas S, Ponce C, Hughes W, Wakefield A, Weitz J, Donoso S, Ulloa A, Madrid P, Gould S, Latorre J, Avila R, Benveniste S, Gallo M, Belletti J, Lopez R. **Association of Primary *Pneumocystis carinii* Infection and Sudden Infant Death Syndrome.** *Clinical Infectious Diseases* 29:1489-1493 (1999).
55. Vargas S, Ponce C, Gigliotti F, Ulloa A, Prieto S, Muñoz M, Hughes W. **Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a Patient with *P. carinii* Pneumonia to Immunocompetent Contact Health Care Workers.** *Journal of Clinical Microbiology* 38(4): 1536-1538 (2000).
56. Vargas S, Hughes W, Santolaya M, Ulloa A, Ponce C, Cabrera C, Cumsille F, Gigliotti F. **Search for Primary Infection by *Pneumocystis carinii* in a Cohort of Normal, Healthy Infants.** *Clinical Infectious Diseases* 32:855-861 (2001).
57. Vargas S, Ponce C, Sanchez C, Ulloa A, Bustamante R, Juarez G. **Pregnancy and Asymptomatic Carriage of *Pneumocystis jirovecii*.** *Emerging Infectious Diseases* 9(5): 605-606 (2003).
58. Vargas S, Ponce C, Luchsinger V, Silva C, Gallo M, López R, Belletti J, Vellozo L, Avila R, Palomino M, Benveniste S, Avendaño L. **Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* and Viruses in Presumably Immunocompetent Infants Who Died in the Hospital or in the Community.** *The Journal of Infectious Diseases* 191:122-126 (2005).
59. Wada M, Sunkin S, Stringer J, Nakamura Y. **Antigenic variation by positional control of major surface glycoprotein gene expression in *Pneumocystis carinii*.** *Journal of Infectious Diseases* 171:1563-1568 (1995).
60. Wada M, Nakamura Y. **Type-II major-surface-glycoprotein family of *Pneumocystis carinii* under the control of novel expression elements.** *DNA Research* 6:211-217 (1999).
61. Wakefield A, Pixley F, Banerji S, Sinclair K, Miller R, Moxon E, Hopkin J. **Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification.** *The Lancet* 336(8713):451-453 (1990).
62. Wakefield A, Pixley F, Banerji S, Sinclair K, Miller R, Moxon E, Hopkin J. **Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 43(1):69-76 (1990).
63. Wakefield A. ***Pneumocystis carinii*.** *British Medical Bulletin* 61:175-188 (2002).
64. Walzer PD, Schultz M, Western K, Robbins J. ***Pneumocystis carinii* pneumonia and primary immune deficiency diseases of infancy and childhood.** *The Journal of Pediatrics* 82:416-422 (1973).
65. Walzer PD. **Pathogenic Mechanisms. *Pneumocystis carinii* pneumonia.** 2° Edición, Nueva York: Dekker, 1994:123-140.
66. Wilkin A, Feinberg J. ***Pneumocystis carinii* Pneumonia: A Clinical Review.** *American Family Physician* 60(6):1699-1708 (1999).

## **APÉNDICE**

### **CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**FORMULARIO DE AUTORIZACIÓN  
PARA PARTICIPAR EN EL ESTUDIO CLÍNICO**



CONSENTIMIENTO INFORMADO  
FORMULARIO DE AUTORIZACIÓN  
PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO CLÍNICO



El presente documento le informará en qué consiste este estudio clínico, para que usted decida con conocimiento si quiere participar en él o no.

Título del Estudio:

**“Estudio de *Pneumocystis* y características de las secreciones respiratorias en muestras de secreción nasal, bucal y tejido pulmonar”**

**Investigadores:** Lic. BQ. Jaime Astorga Saavedra  
Dr. \_\_\_\_\_  
Enf. Patricia Pizarro Franchino  
Mg.Cs.BQ. Carolina Ponce Olmos  
Lic.Cs Biol. Francisco Pérez Blanco

**Dirección:** Laboratorio de Infecciones Respiratorias, Programa de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av. Independencia 1027, Independencia, Santiago.

**Responsable de la Línea de Investigación:**  
Dr. Sergio Vargas Munita.

**Dirección:** Laboratorio de Infecciones Respiratorias, Programa de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Av. Independencia 1027, Independencia, Santiago.

**Teléfono:** 978 62 95  
**Fax:** 732 51 60

**Nombre del Participante:** \_\_\_\_\_

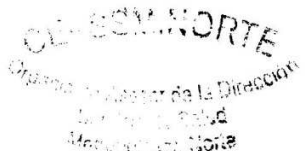
**Edad:** \_\_\_\_\_ **Diagnóstico:** \_\_\_\_\_

**Dirección:** \_\_\_\_\_

**Teléfonos de contacto:** \_\_\_\_\_

**1. PROPÓSITO DEL ESTUDIO.**

Estimado Señor(a): Le estamos invitando a colaborar con nosotros participando en un estudio clínico para montar un método diagnóstico nuevo en nuestro país. El estudio consiste en cuantificar el microbio *Pneumocystis* y proteínas de secreción en muestras de nariz y boca y en muestras de pulmón.



18 MAYO 2010

De ésta forma, estudiando las secreciones de la boca y nariz y sin necesidad de entrar al pulmón podremos predecir lo que ocurre en el pulmón con *Pneumocystis* y sus efectos en las secreciones.



## 2. RAZONES MÉDICAS PARA REALIZAR ESTE ESTUDIO.

*Pneumocystis* es un hongo microscópico que puede colonizar a cualquier persona. En el caso de pacientes cuyo sistema inmune está debilitado, *Pneumocystis* puede causarles neumonía. Mientras que en adultos y niños sanos o con enfermedades respiratorias sin compromiso del sistema inmune, este microbio puede pasar inadvertido.

Actualmente solo es posible saber si el paciente tiene o no *Pneumocystis* pero no la cantidad que está presente en el aparato respiratorio ni como afecta las secreciones.

Con este estudio se logrará establecer un método diagnóstico que permitirá conocer cuánto *Pneumocystis* tiene cada paciente en sus pulmones tomándole solamente una muestra nasal o de la boca. Para ello, debemos averiguar cómo infecta este microbio dentro del tracto respiratorio: si permanece en mayor cantidad en la nariz, boca y garganta, o si predomina en los pulmones.

## 3. SU PARTICIPACIÓN ES VOLUNTARIA.

Usted puede acceder libremente a participar o no en este estudio clínico. Si usted acepta participar, se le tomarán las muestras del estudio que se detallan mas abajo.

Por otra parte, si usted no acepta participar en el estudio, no significará ningún tipo de perjuicio en las atenciones de salud en este Hospital.

## 4. EN QUÉ CONSISTE SU PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO.

Pueden participar en el estudio adultos sanos y enfermos. Mientras más pacientes participen, más completo será el estudio.

Se le tomarán 3 muestras en total:

1. Antes de la intervención quirúrgica se le sacará un poco de mucosidad nasal con una tórula (hisopo o cotonito), la que se le introduce unos 2 o 3 centímetros en cada fosa nasal y se retira rápidamente.
2. También antes de la intervención quirúrgica, se le pedirá que haga gárgaras reteniendo en la boca 2 cucharadas de líquido un poco salado que se llama suero fisiológico y moviéndolo para enjuagar bien la boca y la garganta durante 1 minuto y luego escupir el líquido en un tubo.
3. La tercera muestra la tomaremos después de la intervención quirúrgica y será una porción pequeña que sacaremos desde el tejido pulmonar que el cirujano ya le haya extirpado. No se sacará tejido pulmonar especialmente para este estudio. Obtendremos la muestra de lo que el cirujano ya haya sacado.

A las 3 muestras se les estudiará la cantidad de *Pneumocystis* y de algunas moléculas que componen las secreciones respiratorias.

## 5. QUÉ RIESGOS TIENE USTED AL PARTICIPAR EN ESTE ESTUDIO.

Su participación en este estudio no tiene riesgos atribuibles. La toma de muestra de hisopado nasofaríngeo no es algo peligroso; pero puede provocarle algunas molestias como

CEISS-NORTE  
Organismo Asesor de la Dirección  
Salud y Medio  
Metropolitano Norte

Página 2 de 4

31 MAYO 2010

versión Marzo 04, 2010

18 MAYO 2010

tos o nauseas. La muestra de gargarismo tampoco tiene ningún riesgo, y la muestra de tejido pulmonar se obtendrá del mismo trozo de tejido que su cirujano le habrá extraído durante la operación. Por lo tanto, se le sacará la misma cantidad de tejido pulmonar independientemente de si participa o no en este estudio.



## 6. BENEFICIOS DEL ESTUDIO.

Actualmente, ningún examen diagnóstico sirve para indicar cuánto *Pneumocystis* tienen los pacientes en sus pulmones. Los métodos actuales sólo revelan la presencia o ausencia de este microbio en la nariz o garganta de la persona, con una confiabilidad relativamente buena. Sin embargo, este nuevo método diagnóstico será altamente sensible y confiable, y permitirá contar *Pneumocystis* en muestras fáciles de extraer. Pero además, con el estudio se podrá deducir la cantidad de este microbio presente en los pulmones de los demás pacientes, sin tener que tomarles muestras dolorosas e invasivas.

Por otra parte, se conocerá más sobre cómo influye *Pneumocystis* en las secreciones respiratorias de los pacientes, de modo que será un avance importante en el estudio de cómo este microorganismo causa enfermedad.

Los resultados que se obtengan al analizar sus muestras le serán informados vía telefónica. Aparte de esto, puede que los avances que se logren con este estudio no le beneficien a usted directamente, pero en caso de hallar *Pneumocystis* en sus muestras, su médico tratante podría prescribirle un tratamiento si fuese necesario para su salud.

## 7. MUESTRAS BIOLÓGICAS

Sus muestras serán conservadas en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile bajo la responsabilidad del Investigador Responsable de este estudio. Cualquier uso futuro y/o publicación de resultados que se extienda más allá de lo aprobado en este consentimiento deberá estar aprobado por el Comité de Ética correspondiente y no será necesario solicitarle a Ud. una nueva aprobación. Su identidad estará protegida por el código alfanumérico en uso en el laboratorio del Investigador Responsable. Las muestras serán eliminadas en un plazo de 10 años y usted podrá solicitar su devolución y disponer de lo que pudiera quedar de ellas en cualquier momento hasta esa fecha.

## 8. COSTOS

El participar en este estudio no le significará ningún gasto de dinero. Las muestras se le tomarán solo una vez y serán analizadas sin costo alguno para usted.

## 9. ENCARGADOS DE RESPONDER SUS PREGUNTAS.

Si necesita hacer cualquier pregunta acerca de las tomas de muestras del estudio, usted puede comunicarse con la enfermera Patricia Pizarro o Andrea Araya, al teléfono 978 62 95, o con el Dr. \_\_\_\_\_, al teléfono \_\_\_\_\_. Si desea información adicional sobre el estudio, puede contactarse con el Dr. Sergio Vargas, a los teléfonos 978 62 95 y 732 56 83, o con el Lic. Bioquímico Jaime Astorga, al 978 65 56.

Dr. Carlos Navarro Cox, presidente del Comité de Ética del SSMN teléfono: 5758506

CEL-SOVI-NORTE  
Organismo Asesor de la Dirección  
Servicio de Salud  
Metropolitano Norte

Página 3 de 4

18 MAYO 2010

versión Marzo 04, 2010

