

***PNEUMOCYSTIS JIROVECI* EN NIÑOS Y ADOLESCENTES
CON DIFERENTES ENFERMEDADES. NUEVOS APORTES AL
CONOCIMIENTO.**

ENTIDAD EJECUTORA PRINCIPAL: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"

AUTOR PRINCIPAL: Yaxsier de Armas Rodríguez

OTROS AUTORES: Ernesto Monroy Vaca, María Teresa Illnait Zaragoz, Gilda Toraño Peraza, Raúl Díaz Rodríguez, Dania Vega Mendoza, Ileana Álvarez Lam, Virginia Capó de Paz, Jorge E. Pérez Lastre, Gerardo Martínez Machín.

COLABORADORES: Enrique Calderón, Olga Matos, Arturo Plascencia, Christen R. Stensvold.

OTRAS ENTIDADES PARTICIPANTES: Hospital Pediátrico Juan Manuel Márquez y Hospital Pediátrico William Soler.

Autor para la correspondencia:

Yaxsier de Armas Rodríguez, DrC.

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía km 6 ½. La Habana, Cuba P.O. Box 601, Marianao 13

Telef: 7-255-3256 al 58, Fax: 537 204 6051

Correo electrónico: yaxsier@ipk.sld.cu

RESUMEN:

Antecedentes: La neumonía por *Pneumocystis jirovecii* (PcP) es considerada una de las enfermedades oportunistas más frecuentes en los pacientes con VIH/sida. En los últimos años, cada vez es más frecuente el aumento de casos en otros grupos poblacionales tales como: pacientes con cáncer, diabéticos, embarazadas, niños y aquellos tratados con fármacos inmunosupresores. En el caso particular de los niños y adolescentes, la infección por este patógeno se ha asociado con la muerte súbita y neumonía intersticial, aunque su estudio en este grupo poblacional es aún limitado.

Uno de los mayores retos para el estudio del patógeno es que no puede ser cultivado en ningún medio microbiológico, aspecto que imposibilita el conocimiento de elementos importantes de su ciclo de vida, resistencia a fármacos y su papel en diferentes enfermedades. Hasta la actualidad, los métodos moleculares han desempeñado un rol protagónico en el estudio del microorganismo. Con su advenimiento, se ha detectado material genético del patógeno en muestras de individuos que no presentan síntomas ni signos de PcP. Este fenómeno se denomina colonización y ha revolucionado la epidemiología de la enfermedad, ya que los casos infectados pueden actuar como reservorio del microorganismo, transmitirlo a otras personas, desarrollar la PcP y los individuos susceptibles pueden adquirir variantes resistentes del patógeno, lo que complicaría su tratamiento efectivo y curación.

Problema que se ha resuelto de acuerdo con los objetivos del trabajo:

El tema de *Pneumocystis jirovecii* en población infantil y adolescente es escasamente abordado en la literatura científica, por lo cual esta investigación aporta elementos importantes para su conocimiento a nivel mundial. Entre los problemas que ha resuelto el presente trabajo se destacan:

Demostrar el papel de *P. jirovecii* en tres grupos diferentes de la población infantil y adolescente con distintas enfermedades de base (niños con síndrome coqueluchide, niños/adolescentes con VIH/sida y niños con síntomas respiratorios negativos al VIH). Se describe además, la posibilidad de contar con un PCR optimizado que en breve tiempo determina el número de copias del ADN del microorganismo presente en la muestra que se analiza, hallazgo sumamente importante, ya que esa información permite desarrollar alternativas de tratamiento para el individuo de acuerdo a su estado de infección/colonización. Por otra parte, el presente estudio brinda la primera evidencia científica de la presencia de microorganismos resistentes a las sulfamidas en la población cubana (no solo en

niños y adolescentes), fármaco de elección para tratar al patógeno, resultado vital y elemento importante que posee el facultativo para utilizar la política correcta de antibióticos y con eso lograr la curación del paciente. Finalmente, de acuerdo a los resultados obtenidos sugiere elementos a considerar en el manejo de los niños con VIH/sida y aquellos con síntomas respiratorios negativos al VIH analizados en el estudio.

Resultados: El estudio destaca la presencia de *P. jirovecii* en 29,3% de niños con síndrome coqueluchoide y la caracterización multilocus realizada describe una amplia variabilidad genética en las muestras estudiadas, así como la existencia de nuevos genotipos para el mt LSU rRNA y CYB (dianas esenciales del patógeno). En paralelo, se describe 18,0% de resistencia a las sulfamidas, fármaco de elección para tratar al microorganismo. Con respecto a los niños con VIH/sida, la investigación demostró ausencia del microorganismo en las muestras analizadas, lo cual difiere con otros reportes que evidencian una alta colonización por *P. jirovecii* en individuos con VIH, lo que sugiere que es cuestionable la terapia preventiva en los casos con altos niveles de linfocitos T CD4⁺. La prevalencia de colonización por *P. jirovecii* en niños con síndrome respiratorio negativos al VIH fue de 33,3%, lo que demuestra que este grupo de individuos puede actuar como reservorio del paciente y participar en el ciclo de transmisión del microorganismo. Es válido destacar que en este grupo, genotipos específicos se asocian con características clínicas determinadas, hallazgos importantes para el manejo de la infección.

Se describen además, los primeros polimorfismos del gen de la dihidrofolato reductasa en muestras cubanas, otra diana del patógeno involucrada en la resistencia a fármacos para tratar la infección. Este trabajo aporta elementos importantes y novedosos que contribuyen ampliar el conocimiento de *P. jirovecii* y trazar políticas correctas para su manejo y control en la población infantil/adolescente.

Impacto científico-social del trabajo

- Primera caracterización y descripción de la distribución de genotipos de *P. jirovecii* en población infantil a nivel internacional.
- Descripción de nuevos genotipos de genes importantes del patógeno mt LSU rRNA (Número de Acceso en GenBank: KC937058) y CYB (Número de Acceso en GenBank: KF578376 y KF578375) de gran importancia para su aplicación en la investigación de la epidemiología de *Pneumocystis* (estudio de brotes, identificación de fuentes de transmisión, etc.) y con potencial aplicación clínica (identificación de resistencia, virulencia, etc.).
- Demostración por primera vez a nivel mundial de la presencia de *P. jirovecii* en niños con síndrome coqueluchoide, abriendo la posibilidad de que pueda

ser un agente causal de este síndrome no considerado hasta ahora.

- Primeros hallazgos de microorganismos con mutaciones vinculadas a la resistencia a las sulfamidas en Cuba.
- Primera evidencia mundial de la existencia de niños portadores de patógenos con mutaciones de resistencia a la atovacuona, fármaco alternativo para tratar la neumocistosis.
- Brinda un PCR en tiempo real optimizado que permite cuantificar la carga del microorganismo en la muestra analizada facilitando la estrategia a seguir para el manejo del individuo.
- No detección del patógeno en muestras de pacientes con infección por VIH con niveles de linfocitos T CD4⁺ altos, lo que permite cuestionar la necesidad de emplear terapia preventiva en estos casos.
- Descripción de la utilidad de los exudados nasofaríngeos como muestras menos invasivas para el estudio de la infección/colonización en niños.
- Aporta datos que sugieren que el ciclo de transmisión de *Pneumocystis* en niños puede ser independiente del que ocurre en los adultos al compararlos con previos resultados cubanos.
- Mejor manejo clínico de los casos gracias a los aportes al conocimiento de las características del microorganismo.

COMUNICACIÓN CORTA DEL RESULTADO

Antecedentes

La neumonía causada por *Pneumocystis jirovecii* (PcP) es considerada una de las enfermedades oportunistas más frecuentes en los pacientes con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ocasionando elevada mortalidad. En los últimos años, la PcP se ha convertido en una enfermedad emergente en los individuos negativos al VIH y en aquellos inmunosuprimidos por otras causas diferentes a este virus. En la literatura científica, se constata un aumento en el número de casos en grupos poblacionales tales como □ pacientes con cáncer, diabéticos, embarazadas, individuos inmunosuprimidos por el empleo de fármacos inmunomoduladores, en niños y adolescentes.¹

La imposibilidad de cultivo microbiológico de *P. jirovecii* es un obstáculo importante, lo cual ha imposibilitado el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad, su biología y la susceptibilidad ante los fármacos de elección para su tratamiento.¹ Con el advenimiento de las técnicas moleculares, se ha detectado material genético del patógeno en muestras de individuos que no presentan síntomas ni signos de PcP. Este fenómeno se denomina colonización y ha revolucionado la epidemiología

de la enfermedad, ya que los casos infectados pueden actuar como reservorio del microorganismo, transmitirlo a otras personas, desarrollar la PcP y los individuos susceptibles pueden adquirir variantes resistentes del patógeno, lo que complicaría su tratamiento efectivo y curación.^{2,3}

Actualmente, se cuenta con escasos trabajos que abordan el estudio de *P. jirovecii* en la población infantil y adolescente. Tampoco, se constatan publicaciones que describan la distribución de genotipos del microorganismo en este grupo. Finalmente, los conocimientos sobre la resistencia a los fármacos de elección para combatir el patógeno en niños/adolescentes son aún limitados. Estas razones son las que impulsaron a realizar el presente estudio.

Materiales y métodos

Se presentan los resultados del estudio en niños con diferentes enfermedades de base (VIH/sida (14 casos), síndrome coqueluchoide (163 casos) y con síntomas respiratorios pero negativos al VIH (30 casos)) en el periodo comprendido entre junio de 2012 y mayo de 2015 en dos Hospitales Pediátricos de La Habana (Juan Manuel Márquez y William Soler) y en el Hospital del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Las muestras analizadas fueron 193 exudados nasofaríngeos y 14 lavados orales, a las cuales se les realizó la extracción de ADN y luego se amplificaron mediante PCR dianas importantes del patógeno: ARN ribosómico de la subunidad mayor de la mitocondria (mt LSU rRNA), beta-tubulina, citocromo B (CYB), superóxido dismutasa (SOD), dihidrofolato reductasa (DHFR) y dihidropteroato sintetasa (DHPS), estas últimas involucradas en la resistencia a las sulfamidas, tratamiento de elección para el microorganismo. Para determinar los polimorfismos en cada gen, se realizó la secuenciación nucleotídica. Las mutaciones en el gen de la DHPS vinculadas a resistencias se estudiaron mediante el análisis del polimorfismo genético de los fragmentos de restricción (PCR-RFLP).^{2,3,4,5}

Resultados

Los resultados de este trabajo representan la primera evidencia científica a nivel mundial de la presencia de *P. jirovecii* en niños con síndrome coqueluchoide. Es válido destacar que se muestra la caracterización genética de varios genes de *P. jirovecii* (análisis multilocus) por primera vez en muestras de niños a nivel internacional. Con nuevos polimorfismos de genes importantes del patógeno (mt LSU ARNr)² y Citocromo B (CYB)³, depositando su secuencia en el banco de genes con número de acceso KC937058 para mt LSU ARNr² y CYB (KF578376 y KF578375)³. Otro de los hallazgos interesantes del estudio, es el primer reporte cubano de la resistencia a las sulfamidas, fármaco de elección para tratar la PcP con implicación inmediata en la clínica del paciente.² De la misma manera, la actual

investigación brinda una PCR en tiempo real que determina la carga del microorganismo presente en las muestras analizadas, posibilitando el mejor manejo de los pacientes.² Además, constata la utilidad de los exudados nasofaríngeos como muestras menos invasivas para el estudio de la colonización/infección.²

La investigación presenta además otros aspectos novedosos y de interés científico a tener en cuenta. Comparando con resultados previos en adultos⁶, se sugiere un ciclo de transmisión independiente en niños, lo que ocurre al no coincidir los genotipos evaluados en ambos grupos, con implicación directa en la epidemiología de la enfermedad.² La ausencia de *P. jirovecii* en niños y adolescentes con VIH/sida y con niveles de linfocitos T CD4⁺ permite sugerir que el estado inmunológico del paciente es un elemento importante a tener en cuenta para la ocurrencia de la colonización por el patógeno y se debe considerar la no administración de terapia preventiva en estos casos.⁴ Además, los resultados presentados aquí, son la primera descripción de los genotipos de la dihidrofolato reductasa (enzima involucrada en la resistencia a fármacos para tratar la neumocistosis) y la demostración de que los niños con síntomas respiratorios y negativos al VIH participan en la transmisión y circulación de *P. jirovecii* debido a la alta prevalencia (33,3%) que se identificó en este grupo.⁵

Finalmente, el colectivo de autores considera que este estudio posee un importante impacto social, pues mejora el manejo clínico de los casos gracias a que proporciona información para el tratamiento específico y oportuno de los pacientes y aporta conocimiento de las características del microorganismo en este importante grupo poblacional (niños y adolescentes) que pueden ser utilizadas para elaborar correctas estrategias en su control.

Conclusiones

La investigación brinda conclusiones interesantes, en primer lugar muestra información científica novedosa para Cuba y el mundo sobre la biología, genética, epidemiología, resistencia a sulfamidas y otros fármacos alternativos en *P. jirovecii* en niños y adolescentes. Se muestra además la utilidad de los exudados nasofaríngeos en los estudios de epidemiología molecular y en el diagnóstico de la colonización/infección del patógeno, muestra menos invasiva para el paciente. De la misma manera, permite sugerir el análisis del empleo de terapia preventiva en niños y adolescentes con buen estado inmunológico, aspecto que pudiera ser tomado en consideración por la comunidad científica. La actual investigación abre nuevos caminos en la investigación de *P. jirovecii* al vincularse la presencia del patógeno a casos de niños con en el síndrome coqueluchoide. Finalmente, el presente estudio aporta nuevos conocimientos para el manejo y control de la colonización/infección de *P. jirovecii* en niños y adolescentes de diferentes enfermedades de base.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Esteves F, Medrano FJ, de Armas Y, Wissmann G, Calderón EJ, Matos O. *Pneumocystis* and Pneumocystosis: first meeting of experts from Latin-American and Portuguese-speaking countries - a mini-review. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(5):545-8. doi: 10.1586/14787210.2014.894883.
2. Monroy-Vaca EX, de Armas Y, Illnait-Zaragozı MT, Toraño G, Diaz R, Vega D, Alvarez-Lam I, Calderón EJ, Stensvold CR. Prevalence and genotype distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban infants and toddlers with whooping cough. *J Clin Microbiol.* 2014;52(1):45-51. doi: 10.1128/JCM.02381-13.
3. Monroy-Vaca EX, de Armas Y, Illnait-Zaragozı MT, Diaz R, Toraño G, Vega D, Alvarez-Lam I, Calderón EJ, Stensvold CR. Genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* in colonized Cuban infants and toddlers. *Infect Genet Evol.* 2014;22:60-6. doi: 10.1016/j.meegid.2013.12.024.
4. de Armas Y, Capó V, Pérez JE, Plascencia A, Calderón E. Apparent Absence of *Pneumocystis jirovecii* Colonization in Cuban HIV-infected Children and Adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 2016;35(5):594-5. doi: 10.1097/INF.0000000000001088.
5. Esteves F, de Sousa B, Calderón EJ, Huang L, Badura R, Maltez F, Bassat Q, de Armas Y, Antunes F, Matos O. Multicentre study highlighting clinical relevance of new high-throughput methodologies in molecular epidemiology of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Clin Microbiol Infect.* 2016;22(6):566.e9-566.e19. doi: 10.1016/j.cmi.2016.03.013.
6. de Armas Y, Friaza V, Capó V, Durand-Joly I, Govín A, De La Horra C, Dei-Cas E, Calderón EJ. Low genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* among Cuban population based on two-locus mitochondrial typing. *Med Mycol.* 2012;50(4):417-20. doi: 10.3109/13693786.2011.607474.