

### 3

# DIAGNOSTICO DE NEUMOPATIA POR PNEUMOCYSTIS CARINII EN PACIENTES CON SIDA COMPARANDO DOS TECNICAS DE COLORACION

---

---

- \* Marco Antonio González Agudelo
- \* Ana María Giraldo Duque
- \*\* Santiago Estrada Mesa
- \*\*\* Fernando Bedoya
- \*\*\*\* Edilma Jaramillo
- \*\*\*\* Cristina de los Ríos

## RESUMEN

---

Se presenta la etiología de la neumopatía en pacientes con SIDA en nuestro medio, comparando dos técnicas de coloración; se estudiaron 36 pacientes con neumopatía (31%) de los 116 informados con SIDA al servicio de epidemiología del Servicio Seccional de Salud de Antioquia, entre Mayo de 1990 y Mayo de 1992. A todos se les hizo lavado broncoalveolar y coloración con plata metenamina modificada y calcofluor blanco. Se encontró que *P. carinii* es el responsable del 28% de los casos de neumopatía en pacientes con SIDA. No hay ninguna característica en la presentación clínica de la neumopatía por *P. carinii* que lo diferencie de la causada por

- 
- \* MD. Internista , Universidad Pontificia Bolivariana, Facultad de Medicina
  - \*\* MD. Microbiólogo, Laboratorio Departamental de Salud Pública SSSA.
  - \*\*\* MD. Neumólogo, Hospital La María
  - \*\*\*\* Bacterióloga Licenciada, Laboratorio Departamental de Salud Pública SSSA

Separatas: Doctor Marco A. González A. Calle 78B No. 69-240 Cons. 311

otros agentes etiológicos. La coloración de calco fluor blanco resultó tan confiable como la plata metenamina modificada; es más simple y es más fácil de interpretar y de menor costo, lo que la hace de elección en nuestro medio.

**Palabras clave:** Neumopatía, *Pneumocystis carinii*, broncofibroscopia, lavado broncoalveolar, plata metenamina modificada, calco fluor blanco.

## SUMMARY

---

The etiology of pulmonary disease in AIDS patients in our setting is presented, comparing two staining techniques; 36 patients with pulmonary disease were studied (31%) of the 116 reported with AIDS at the epidemiology department of the local health service in the Department of Antioquia between May 1990 and May 1992. All of them were studied with bronchoalveolar lavage and staining with modified methenamine silver and calcofluor white stain. It was found that *P. carinii* is responsible for 28% of cases of pulmonary disease in AIDS patients. No characteristic clinical presentation of pulmonary disease by *P. carinii* was found that helps to differentiate it from that caused by other etiologic agents. Staining with calcofluor white was as reliable as that with modified methenamine silver stain; it is simpler, easier to interpret, and has a lower cost, which makes it the most suitable staining technique in our patients.

**Key words:** Pneumopathy, *Pneumocystis carinii*, bronchofibroscopy, bronchoalveolar lavage, modified methenamine silver, calcofluor white.

## INTRODUCCION

El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) fue reconocido por primera vez en Estados Unidos, en el verano de 1981, cuando el Centro para el Control de Enfermedades (CDC) comunicó la aparición inexplicable de neumonía por *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) en cinco varones homosexuales previamente sanos, en los Angeles (1). Desde entonces *P. carinii* es considerado como el más importante de los patógenos oportunistas, teniendo en cuenta que aproximadamente el 80% de los pacientes con SIDA lo padecen en algún momento de su enfermedad (2,4).

*P. carinii* es un microorganismo de baja virulencia y se necesita por lo tanto un estado de inmunodeficiencia para que pueda ser patógeno. En el organismo ataca principalmente el tejido pulmonar, pero se han informado infecciones diseminadas por este microorganismo en varios pacientes (3,12).

Ha sido difícil la clasificación taxonómica de *P. carinii*, por su contenido estructural y hoy todavía se discute si pertenecen al grupo de los hongos o protozoos (3,13).

La presente investigación tiene como objetivo principal, comparar dos técnicas para el diagnóstico de neumopatía por *P. carinii* en los pacientes con SIDA; para el diagnóstico de esta infección se han utilizado varias técnicas en la toma de la muestra como: el lavado broncoalveolar y la biopsia transbronquial empleando el broncofibroscopio y la inducción del esputo usando un nebulizador ultrasónico con solución salina hipertónica (14,17). Las muestras de tejido, lavado broncoalveolar y esputo obtenidas por los anteriores procedimientos se colorean con diferentes técnicas

para identificar a *P. carinii*, entre ellas: plata metenamina de Grocott, de Gomori, y modificada, Giemsa, gram Weigert, azul de toluidina o Papanicolau; coloración fluorescente con anticuerpos policlonales contra *P. carinii*, y calcofluor blanco entre otras (18,21); esta última recientemente evaluada en la Clínica Mayo con buenos resultados (19) y es la que se analizará en un estudio comparativo con la plata metenamina modificada en esta investigación.

## MATERIALES Y METODOS

Entre Mayo de 1990 y Mayo de 1992 se informaron 116 pacientes con SIDA en la sección de epidemiología del Servicio Seccional de Salud de Antioquia, de los cuales, 36 (31%), se incluyeron en el estudio por presentar neumopatía durante su enfermedad.

El SIDA se definió de acuerdo con los criterios establecidos por el Centro para el Control de Enfermedades de los Estados Unidos.

La infección por HIV se comprobó por la técnica HIV-1 Western Blot Organon Tetnika.

La neumopatía se definió como un proceso sintomático consistente en tos, fiebre y disnea progresiva de más de una semana de duración, pero puede no tener los tres síntomas en el momento de la consulta.

A todos los pacientes que voluntariamente ingresaron al estudio, se les realizó una historia clínica. Se les ordenó unos RX de tórax que fueron interpretados por un médico Radiólogo; se sangraron para deshidrogenasa láctica y gases arteriales; posteriormente se les sometió a un lavado broncoalveolar, para obtener las muestras para tinción.

El procedimiento es como sigue: A todos los pacientes, previa premedicación con atropina y demerol, se les instiló anestesia tópica con xylocaina (R) spray al 2%, en orofaringe y glotis. Luego se pasó el broncoscopio y se cuñó en un bronquio subsegmentario libre de sangre y se irrigó con 150 cc de solución salina estéril dividida en tres infusiones de 50 cc cada una y luego se recuperó por succión la mayor cantidad posible.

De la cantidad recuperada del LBA una parte se sembró en agar sangre de carnero, BBL, agar chocolate BBL, MacConkey BBL, Mycocele BBL y Sabouraud BBL, y el sobrante se centrifugó a 3.400 Rpm por media hora, se descartó el sobrenadante y el resto se empleó para la preparación de las placas que se colorearon con la técnica de plata metenamina modificada, calcofluor blanco y Baar; el resto se sembró en medio de Ogawa modificado por Kudoh (O-K).

Las técnicas de coloración de plata metenamina modificada y calcofluor blan-

co se describen a continuación (19,22)

### Calco Fluor Blanco

Se extiende la muestra tomada por LBA, después de centrifugarla en dos portaobjetos y se dejan a temperatura ambiente antes de colorear. El extendido se fija por 2 minutos con metanol al 100% y se deja secar al ambiente; en adelante la placa del control y la del paciente serán tratadas de igual manera y se procederá como sigue:

Tomar 6 gotas de la solución A (Polysciences Inc.) y distribuirla a través de toda la placa con una pipeta, incubar por un minuto a temperatura ambiente y luego lavar con agua destilada. Cubrir la muestra con un cubre objetos (22x50 mm) y examinar la placa con un microscopio de fluorescencia recorriéndola con el objetivo de bajo poder (25X) y las áreas sospechosas (estructuras redondeadas con puntos brillantes en su interior) se examinarán con objetivos de alto poder (40X). (Figura 1).

FIGURA 1: MICROFOTOGRAFIA DE QUISTE DE P. CARINII COLOREADO CON CALCOFLUOR BLANCO, 40X



### Plata Metenamina Modificada

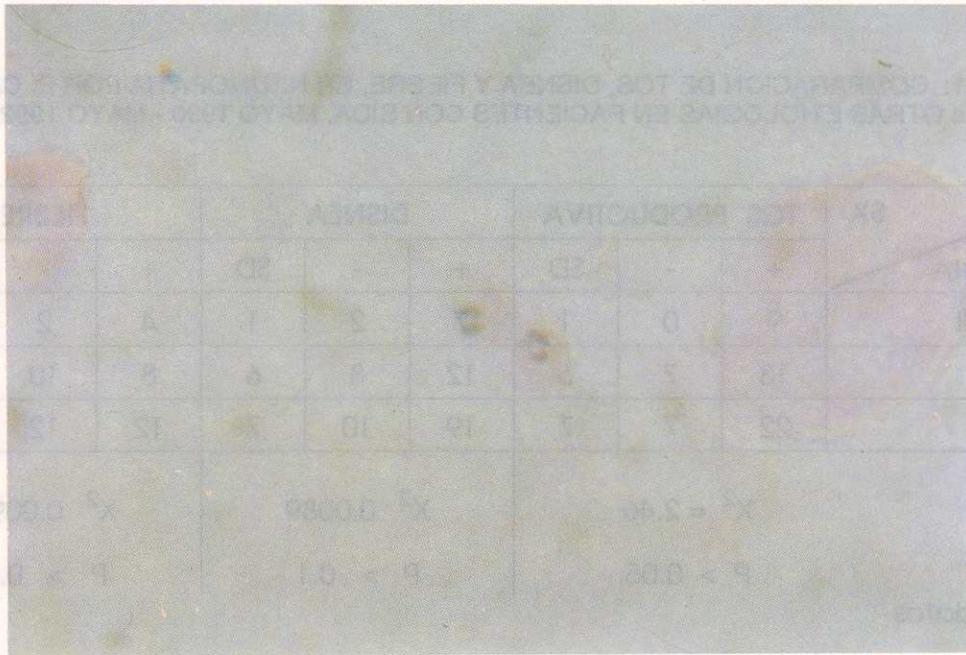
Luego de extendida la muestra obtenida por el LBA en los portaobjetos, se fijan con formalina por 10 minutos y luego se lavan en dos minutos con agua desionizada. Posteriormente se prepara la solución de coloración de plata metenamina en un tubo de poliestireno, con 1.5 mls. para cada coloración. Ajustando volúmenes de acuerdo con el número de placas a colorear, teniendo en cuenta la siguiente relación:

Solución de plata metenamina 4 mls.  
Tetraborato Sódico (0.4%) 4 mls.

Luego se impregna el portaobjetos con ácido crómico por 10 minutos y posteriormente se lava por 15 segundos con agua desionizada. Se sumerge en meta

bisulfito sódico por un minuto para remover los restos que quedaron del ácido crómico y se lava en un minuto con agua desionizada, se seca el reverso para colorearlo con plata metenamina en calor por seis minutos y se lava con agua desionizada por 15 minutos. Se pasa la placa en cloruro de oro treinta segundos y se lava por 15 segundos con agua desionizada, se pone la placa en tiosulfato sódico 3 minutos para remover excesos de plata y luego se lava por 15 segundos con agua desionizada; por último se coloca la placa en etanol al 80% por 30 segundos y Eosina por 1 minuto, posteriormente en etanol al 95% por pocos segundos y finalmente al 100% otros pocos segundos; se sumerge en **Xylene** unos segundos en dos veces y luego se mira al microscopio de luz. (Figura 2).

FIGURA 2: MICROFOTOGRAFIA DE QUISTE DE P. CARINII COLOREADO CON PLATA METENAMINA MODIFICADA 40X



Las lecturas de las placas las realizó un Médico Microbiólogo.

### Análisis Estadístico:

Se aplicó la prueba de chi cuadrado para buscar asociación entre las diferentes variables y las 2 pruebas de coloración.

### RESULTADOS

Se estudiaron 36 pacientes con sintomatología respiratoria y serología positiva para el virus del HIV, durante el período comprendido entre Mayo de 1990 y Mayo de 1992.

La etiología en los 36 pacientes estudiados se comportó de la siguiente manera: bacteriana en 17 pacientes (47%), *P. carinii* en 10 pacientes (28%), 1 paciente con *cryptococco neoformans* (2.7%) y 8 (22%) sin etiología conocida; no se hizo prueba para detectar virus en las muestras obtenidas de los pacientes.

Comparando las variables de tos no productiva, disnea y fiebre no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre los diferentes agentes etiológicos (Tabla 1).

Igualmente los hallazgos radiológicos en los pacientes con *P. carinii* variaron desde lecturas normales hasta infiltrados mixtos bilaterales, pero la asociación no fue estadísticamente significativa con respecto a los hallazgos de las otras etiologías de la neumopatía en estos pacientes.

Los valores de la presión parcial de oxígeno (PaO<sub>2</sub>) y la deshidrogenasa láctica mostraron un patrón constante en pacientes con las diferentes etiologías y no hubo tampoco asociación estadísticamente significativa entre los niveles de PO<sub>2</sub> y DHL y los diferentes agentes causales (Tabla 2).

TABLA 1: COMPARACION DE TOS, DISNEA Y FIEBRE, EN NEUMOPATIA POR P. CARINII Vs OTRAS ETIOLOGIAS EN PACIENTES CON SIDA. MAYO 1990 - MAYO 1992

ETIOLOGIA \ SX	TOS PRODUCTIVA			DISNEA			FIEBRE		
	+	-	SD	+	-	SD	+	-	SD
P CARINII	9	0	1	7	2	1	4	2	4
OTROS	13	7	6	12	8	6	8	10	8
TOTAL	22	7	7	19	10	7	12	12	12
	$\chi^2 = 2.46$			$\chi^2 = 0.0089$			$\chi^2 = 0.0092$		
	P > 0.05			P > 0.1			P > 0.1		

SD = Sin datos

**TABLA 2: COMPARACION DE HESHIDROGENASA LACTICA E HIPOXEMIA EN NEUMOPATIA POR P. CARINII Vs OTRAS ETIOLOGIAS EN PACIENTES CON SIDA. MAYO 1990 - MAYO 1992.**

ETIOLOGIA \ LAB	DHL			HOPOXEMIA		
	> 2 veces	< 2 veces	SD	PO <sub>2</sub> < 70	PO <sub>2</sub> > 70	SD
P CARINII	3	4	3	5	2	3
OTRA ETIOLOGIA	4	12	10	7	10	9
TOTAL	7	16	13	12	12	12
			$\chi^2$ 0.0057			
			P > 0.1			
				$\chi^2$ 0.0336		
				P > 0.1		

SD = Sin datos

Comparando las dos técnicas de coloración, el calco fluor blanco y la plata metenamina modificada, fueron positivas en 7 pacientes respectivamente (un resultado para PMM no fue informado);

(ver Tabla 3). Se encontró asociación estadísticamente significativa entre las dos pruebas ( $P < 0.00001$ ). Son por lo tanto igualmente seguras para el diagnóstico de *P. carinii* en las muestras del LBA.

**TABLA 3: COMPARACION DE DOS TECNICAS DE COLORACION EN PACIENTES CON NEUMOPATIA POR P. CARINII MAYO 1990 - MAYO 1992**

CALCO FLUOR BLANCO	PLATA METENAMINA MODIFICADA		TOTAL
	+	-	
+	7	2	9
-	0	26	26
TOTAL	7	28	35

$\chi^2 = 20.65$        $P < 0.00001$

## DISCUSION

Se presenta un trabajo descriptivo y prospectivo buscando la presencia de *P. carinii* como causa de neumopatía en pacientes con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) en nuestro medio, comparando las técnicas de coloración, Calco fluor Blanco y la Plata Metenamina Modificada.

En nuestro medio *P. carinii* fue responsable del 28% de la neumopatía en los pacientes con SIDA; este hallazgo contrasta con lo informado por la literatura mundial, ya que ha sido considerado un agente etiológico importante en los países desarrollados (hasta el 80%) y de ocurrencia muy baja en los países subdesarrollados, (11,12,20,23,24).

Cuando un paciente con SIDA consulta por neumopatía, se debe hacer una elaboración diagnóstica de acuerdo con las características del cuadro clínico, hallazgos radiológicos, de laboratorio y finalmente comprobar la etiología con los métodos microbiológicos disponibles en el medio (11,12).

En esta investigación se comparó la tos no productiva, fiebre, disnea, infiltrados a los RX, hipoxemia y deshidrogenasa láctica, que son características para *P. carinii* (2,4,11,12), con otros agentes etiológicos responsables de la neumopatía en pacientes con SIDA y no se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre estos hallazgos y los diferentes agentes causales (Tablas 1 y 2); esto es llamativo porque a diferencia de otras latitudes, en nuestro medio, la neumopatía por *P. carinii*, no tiene ninguna característica sobresaliente en su presentación, que permita sospechar el diagnóstico, lo que obliga a una búsqueda del agente que

origina la neumopatía, para ofrecer un tratamiento adecuado (2,3,20,23,25).

Para el diagnóstico etiológico se deben tener en cuenta dos consideraciones; la primera, la obtención de la muestra y en segundo lugar, los medios microbiológicos para sembrar la muestra y para hacer las coloraciones de acuerdo con las diferentes posibilidades: bacterianas, parasitarias, hongos o virales.

En cuanto a la obtención de la muestra para el estudio de la neumopatía por *P. carinii*, en primera instancia se hace mediante técnicas no invasivas como el esputo inducido, que tiene una sensibilidad que oscila entre el 54 y 90%, según las diferentes series (11,14,20,21,25). El lavado broncoalveolar (LBA), el cepillado bronquial y la biopsia trasbronquial son procedimientos invasivos, los cuales son seguros por presentar una sensibilidad y especificidad cercanas, al 100% (15,17,25,26); por esta alta sensibilidad y especificidad y su muy baja morbilidad, permitirá hacer una evaluación con mayor confiabilidad de la etiología de la neumopatía en los pacientes con SIDA en nuestro medio, que hasta ahora no se conocía y además analizar una nueva técnica de coloración para el diagnóstico de *P. carinii*, como el calco fluor blanco.

Para identificar *P. carinii* en la muestra obtenida, se han aplicado múltiples coloraciones, las más simples son las que colorean la pared del quiste (Plata Metenamina de Grocott o Gomori), pero requieren mucho tiempo para su montaje y personal muy experimentado para la lectura; además en casos en que el número de parásitos sea bajo puede confundirse con hongos. Otras coloraciones menos laboriosas pero que también colorean la pared del quiste son el

azul de Toluidina O y Gram Weigert; los cuerpos intraquísticos y formas intermedias se pueden observar con la coloración de Giemsa, Wright o alguna de sus variantes. Otras técnicas como la de Papanicolaou, amarillo de acridina o yodo propidium pueden revelar *P. carinii* si se examina con microscopio de fluorescencia. En fresco y con microscopio de luz se puede también observar *P. carinii* mediante una técnica especializada de fase o interferencia de contraste Nomarski, en campo brillante e iluminación oblicua. Otra técnica recientemente introducida es con anticuerpos policlonales fluorescentes contra *P. carinii* en la muestra del LBA o esputo inducido y es la que posee la mayor sensibilidad y especificidad hasta ahora encontrada (18,20,22,27,30).

La técnica que se empleó en esta investigación fue el Calco fluor Blanco, una coloración de quimio fluorescencia que permite la visualización de los cuerpos intraquísticos en un microscopio de fluorescencia (19) y se comparó con la Plata Metenamina Modificada, la cual colorea la pared del quiste y es la técnica empleada en nuestro medio. Se encontró que 10 pacientes de 36 estudiados fueron positivos para *P. carinii* por el Calco fluor Blanco mientras solo 7 con la coloración de Plata Metenamina Modificada (en un paciente no se informó su resultado); estos hallazgos tienen una asociación estadísticamente significativa ( $P < 0.0001$ ), lo que nos permite decir que son igualmente seguros para el diagnóstico, pero con la diferencia de que la coloración con Calco Fluor Blanco, es más sencilla, requiere menos tiempo en su montaje y es más fácil de interpretar en comparación con la Plata Metenamina que es una técnica laboriosa, requiere mucho tiempo y un personal experimentado para su interpretación.

Se concluye que *P. carinii* es una causa importante de neumopatía en los pacientes con SIDA en nuestro medio; la presentación clínica no es característica para ningún agente etiológico en particular y la coloración de Calco Fluor Blanco se recomienda en nuestro medio por ser tan segura como la Plata Metenamina Modificada y requiere menor tiempo en su montaje, es más fácil de interpretar y más económica.

### AGRADECIMIENTOS

Al personal del Laboratorio Departamental, al personal del Hospital La María, al doctor Héctor Ortega, al doctor William Mejía, asesor estadístico, al doctor Alvaro Porras M.

### REFERENCIAS

1. Center for Disease Control Revision of the CDC surveillance case definition for acquired immunodeficiency syndrome. *Morb Mort Week Rep* 36: 1 S, 1987.
2. Hughes, W. *Pneumocystis Carinii*; Clinical manifestations. En: *CRC Pres. Pneumocystis carinii* 2a. ed. Boca Ratón. 1987:7-75.
3. Walzer, P. *Pneumocystis carinii*. En: *Principles and practice of infectious disease*; 3a. Ed. New York; Churchill Livingstone; 1990: 2103-2110.
4. Millar, A. AIDS and the lung. *ABC of AIDS*. *Brit Med J* 1987; 294: 334-337.
5. Coulman, Cathleen; Green, Ira and Archibald, Robert. *Cutaneous Pneumocystis*. *Ann Int Med* 1987; 106: 396-398.
6. Glatt, Aaron y Ghirgwin, Keith. *Pneumocystis carinii Pneumopathy in Human Immunodeficiency Virus - Infected patients*. *Arch Inter Med* 1990; 150: 271-279.
7. Grimes, M. *Disseminated Pneumocystis carinii Infections in a patients with acquired immunodeficiency Syndrome*. *Human Pathol.* 1987; 18: 307-308.
8. Ho. Pomerantz R., and Kaplan J. *Pathogenesis of Infection with Human Immunodeficiency Virus*. *N Engl J Med.* 1987; 317: 278-286.

9. Hughes, W. *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *N Engl J Med.* 1987; 317: 1021-1023.
10. Limper, Andrew y Martin, William. Pathogenesis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. An in Vitro Model. *Chest*, 1989; 95: 180S-181S.
11. Murray, J. y Mills, J. Pulmonary Infections Complications of Human Immunodeficiency Virus Infection, Part. 1. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 141: 1256-1272.
12. Murray, J. y Mills, J. Pulmonary Infections Complications of Human Immunodeficiency Virus Infection. Part. 2. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 141: 1582-1598.
13. Masur H, Lane H, Kodacs J. *Pneumocystis* Pneumonia: From Bench to clinic. *Ann Inter Med.* 1985; 111: 813-826.
14. Bigbyta, Margolskøe D, Curtis JI. et al. The use fulness of induced sputum in the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Resp Dis.* 1986; 133: 515-518.
15. Ognibene, F.; Shelhamer, J.; Gill, V et. al. The Diagnosis of *Pneumocystis Carinii* Pneumonia in patients with Immunodeficiency Acquired Syndrome using subsegmental bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 129: 929-932.
16. Rankin, J. y Haven, W. Role of Bronchoalveolar lavage in the Diagnosis of Pneumonia. *Chest.* 1989; 95: 178S-190S.
17. Wallace J.: Barbers, R.; Oishi J., et al. Cellular and T Lymphocyte subpopulation profiles in bronchoalveolar lavage fluid from patients with AIDS and pneumonitis. *Am Rev Respir Dis.* 1984; 130: 786-790.
18. Flint A. Beckwith A. and Naylor B. *Pneumocystis carinii* Pneumonia, Cytologies, manifestations and rapid diagnosis in routinely prepared Papanicolau stain preparations. *Am J Med.* 1986; 81: 1009-1011.
19. Kim, Yoo, Parulekar S, Kw, Pauline et al. Evaluation of Calco Fluor White stain for detection of *Pneumocystis carinii*. *Diagn Microbiol Infect Dis,* 1991; 13:307-310.
20. Ospina, S. y Bedoya, C. Neumocystosis. Serie Actualizaciones No. 1. Medellin. 1991; 1-37.
21. Walker, J. Giemsa Staining for cyst and trophozoites of *pneumocystis carinii*. *J Clinic Pathol* 1989; 42: 432-434.
22. Section Microbiology Mayo Clinics. Methenamina Silver stain for *Pneumocystis carinii*. *Bacteriology Laboratory Proceeding Manual.* Rochester Minnesota. No.19, p. 20, 1988.
23. White D and Zaman M. Pulmonary Disease. *Clinic Med North Am.* 1992; 76: 19-44.
24. Serwadda D. Goodgame R, Kocjan, Absence of *Pneumocystosis* in Ugandan. AIDS patients. *AIDS.* 1981; 3: 47-48.
25. Bernard E. Kent B. Sepkowitz A et al. *Pneumocystosis.* *Clinic Med North Am.* 1992;76: 107-119.
26. Kahn, Frederick y Jones, Jeffrey. Analysis of Bronchoalveolar lavage specimens from Immunocompromised patients with a protocol Applicable in the Microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 1988; 26: 1150-1155.
27. Gill V, Evans G, Stock F, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* by fluorescent-Antibody stain using a combination of three monoclonal antibodies. *J Clinic Microbiol,* 1987; 25: 1837-1840.
28. Baughman R, Strohofer S, Clinton B, et al. The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Pneumocystis carinii*. *Arch Pathol Lab Med.* 1989; 113: 1062-1065.
29. Walzer P. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* Pneumonia. *J Infect Diseas.* 1988; 157: 629-631.
30. Ghali U, Garcia R, Skoban J. Fluorescence of *Pneumocystis carinii* in Papanicolau smears. *Hum Pathol.* 1984; 15: 907-909.
31. Phair I, Muñoz A, Detels R. et al. The Risk of *Pneumocystis carinii* Pneumonia Among Men Infected with Human Immunodeficiency Virus Tipe 1. *N Engl J Med.* 1990; 332: 161-165.