

Artículo Original

MUTACIONES ASOCIADAS CON RESISTENCIA A TMS EN PNEUMOCYSTIS JIROVECII Y SU IMPACTO EN PACIENTES EN TERAPIA INTENSIVA.

Mauro Javier Rosso¹ y Rubén Rober Romero M.¹, Messina F.¹, De Vedia L.², Marin E.¹, Lista N.², Piovano G.², Di Virgilio E.², Depardo R.¹, Walker L.¹, Juarez F.¹, Arechavala A.¹, Santiso G.¹ Rosso²

1. Unidad Micología, Hospital de Infecciosas F. J. Muñiz.

2. Unidad de Terapia Intensiva, Hospital de Infecciosas F. J. Muñiz.

Correspondiente: María de las Mercedes Romero, Unidad Micología, Hospital de Infecciosas F. J. Muñiz. Uspallata 2272, CABA. mecharomero@gmail.com

<https://doi.org/10.55634/1.2.1>

RESUMEN

La neumocistosis es una infección oportunista frecuente entre los pacientes con sida. Últimamente ha crecido la incertidumbre acerca de la resistencia a TMS ya que se han caracterizado mutaciones en el gen de la DHPS que estarían relacionadas a este fenómeno. Sin embargo, se desconoce la relación real con la evolución clínica. Con el objetivo de conocer la prevalencia de dichas mutaciones e inferir su implicancia se estudiaron por PCR y RFLP en 30 muestras de LBA de pacientes con sida y se relacionó su presencia con la cantidad de días de internación, el requerimiento de ARM y óbito. Se encontró un altísimo porcentaje de aislamientos con mutaciones. Esto hace que resulte poco probable su relación con la morbimortalidad. Sin embargo, en los pacientes sin mutaciones resultó ser notoria la diferencia en los días de internación aunque la escasa cantidad de pacientes con cepas sin mutaciones hace que sea difícil obtener conclusiones definitivas.

Palabras clave: neumocistosis, resistencia a TMS, mutaciones en DHPS.

INTRODUCCIÓN

La neumocistosis es una enfermedad infecciosa oportunista grave, con manifestaciones casi exclusivamente pulmonares, distribuida mundialmente, que ha tenido una fuerte asociación con el SIDA desde el inicio de la pandemia.

Es ocasionada en los humanos por *Pneumocystis jirovecii* (PJ), un hongo no cultivable que presenta un alto estenoxenismo, características que dificultan mucho su detección para el diagnóstico de certeza que solo se alcanza mediante la visualización del microorganismo a partir de muestras de lavado broncoalveolar, con los riesgos y complicaciones que implica dicho procedimiento y con la necesidad además, de un observador entrenado (1).

La neumocistosis afecta a distintos grupos de inmunocomprometidos con prevalencia que varía del 10 al 50%, con diferencias en las manifestaciones clínicas, el desarrollo de la enfermedad según la afección subyacente y con diferencias también en la mortalidad.

En los últimos años con los avances en medicina, se incrementó la supervivencia de los pacientes con patologías inmunosupresoras y debido al uso de medicamentos inmunomoduladores han aparecido nuevos grupos susceptibles de padecer neumocistosis. Sin embargo, en los países en desarrollo aun es el sida la principal causa favorecedora asociada con neumocistosis por la gran cantidad de enfermos que no tienen acceso a la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) y a la profilaxis de patologías oportunistas, y también por las condiciones socioeconómicas desfavorables que generan falta de adherencia a dichos tratamientos (2,3).

En los últimos años, lamentablemente, la cantidad de enfermos con PJP no ha disminuido a pesar de la disponibilidad de TARGA y profilaxis.

Esto ha instalado mundialmente la incertidumbre y el temor por la presencia de cepas de *P. jirovecii* resistentes a trimetoprima-sulfametoxazol (TMS), la droga de elección para profilaxis y tratamiento de esta micosis (4, 5).

La TMS actúa inhibiendo la síntesis del ácido tetrahidrofólico, necesario para la elaboración de purinas. La trimetoprima interfiere en la acción de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y las sulfas en la de dihididropteroatosintasa (DHPS) como se observa en el cuadro 1.

Diversos investigadores han descrito mutaciones en ambas enzimas que se cree estarían relacionadas a la resistencia a TMS. Sin embargo, las mutaciones en DHFR son muchísimas, muy variables y su implicancia está aún muy controvertida.

En el caso de la DHPS se han caracterizado dos mutaciones puntuales en los codones 55 y 57 donde se genera un cambio de treonina por alanina y de prolina por serina respectivamente.

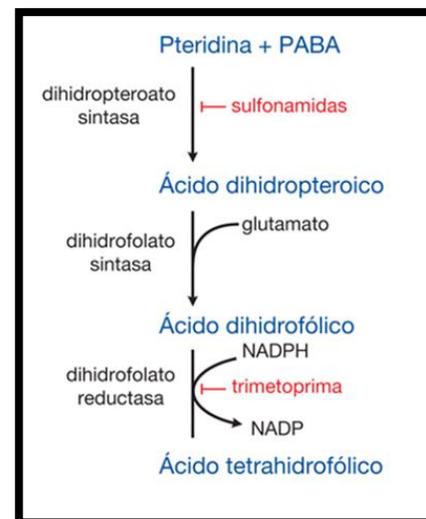
Estos cambios en la proteína alteran el sitio blanco de acción de las sulfas y por ello estarían relacionados con la resistencia a dicha droga, como se ha visto en otros microorganismos. A pesar de los numerosos estudios moleculares, se desconoce la implicancia real que tendrían estas mutaciones en la evolución de los pacientes y el posible fracaso terapéutico (6,7).

OBJETIVO

Conocer la prevalencia de las mutaciones asociadas a resistencia a sulfas en PJ y relacionar su presencia con parámetros de evolución clínica en pacientes internados en terapia intensiva para inferir el impacto in vivo de dichas mutaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 30 muestras de lavado broncoalveolar (LBA) de 30 pacientes internados en terapia intensiva del Hospital de Infecciosas F. J. Muñiz con sida y neumocistosis pulmonar confirmada por manifestaciones clínicas concordantes y la observación microscópica de elementos compatibles con PJ en dicha muestra. De ellos, 20 eran hombre y 10 mujeres.



Cuadro 1. Intervención de trimetoprima y sulfonamidas en la vía de síntesis del ácido tetrahidrofólico.

Se realizó la extracción de ADN de los LBA por medio de columnas de extracción y posteriormente se llevó a cabo la amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen de la DHPS utilizando dos rondas de amplificación con cebadores específicos diseñados in-house.

Una vez obtenido el amplicón se realizó el estudio de los polimorfismos en los fragmentos de restricción (RFLP) con las enzimas *AccI* y *HaeIII* con sitio de corte en los codones 55 y 57 respectivamente del gen de la DHPS (8, 9). Esto permitió evidenciar la presencia de mutaciones puntuales en dichos codones.

El genotipo observado se relacionó luego con los siguientes parámetros clínicos: cantidad de días de

internación en terapia intensiva, requerimiento de asistencia respiratoria mecánica (ARM) y óbito.

RESULTADOS

El 90%(27) de los pacientes estudiados presentaron mutaciones en el codón 55; 20% (6) en el 57; 93,3% (28) al menos una mutación; 16,7% (5) ambas y 6,7% (2) ninguna. El análisis de los parámetros clínicos según cada uno de los perfiles mencionados se observa en la Tabla 1.

Presencia de mutaciones	N (%)	Mediana de días de internación en UTI (rango)	Requerimiento de ARM (%)	Óbito (%)
Codón 55 mutante, codón 57 salvaje	22 (73,3)	20 (5-65)	8 (36,4)	6 (27,3)
Codón 55 mutante, codón 57 mutante	5 (16,6)	20 (10-32)	1 (20)	0
Codón 57 mutante, codón 55 salvaje	1 (3,3)	13	0	0
Sin mutaciones	2 (2,7)	9 (7-14)	0	0
Con al menos una mutación	28 (93,3)	21 (5-65)	9 (32,1)	6 (21,4)

Tabla 1. Parámetros clínicos asociados con la presencia de mutaciones

ARM: asistencia mecánica respiratoria

UTI: Unidad de terapia intensiva

DISCUSIÓN

El alto porcentaje de pacientes con cepas de *P. jirovecii* con al menos una mutación (93,3%) excede ampliamente lo comunicado por otros autores en otros países del mundo (10, 11).

Esto podría deberse a la población particular de nuestro centro, caracterizada por pacientes con baja adherencia a tratamientos y múltiples recaídas en patologías oportunistas. Por otro lado podría considerarse que exista en este medio hospitalario un nicho ecológico de alta concentración de cepas con mutaciones.

Los valores observados inevitablemente nos llevan a poner en duda el impacto que tiene in vivo la presencia

de mutaciones en el sitio blanco de acción de las sulfas dado que, clínicamente, la falla de tratamiento suele ser marcadamente menor a lo que la presencia de mutaciones sugeriría. El hecho de que la portación de cepas con mutaciones en el codón 55 sea tan común entre la población estudiada hace que resulte difícil adjudicarle un rol relevante en la mortalidad y morbilidad.

La mortalidad observada es la habitual esperada para la neumocistosis para la población de pacientes en terapia intensiva, teniendo en cuenta además que en general son pacientes con otros oportunistas concomitantes.

Con respecto a la mutación del codón 57, los 6 pacientes que la presentaron evolucionaron de forma similar al resto pero es necesario contar con más datos para sacar conclusiones fidedignas. Sin embargo, en los pacientes sin mutaciones es notoria la diferencia en los días de internación (12), el requerimiento de ARM y el óbito, aunque la escasa cantidad de pacientes de este grupo hace que sea difícil obtener resultados de validez estadística.

Finalmente, dado el altísimo porcentaje de aislamientos con mutaciones es difícil saber si las mismas son irrelevantes en la evolución de los pacientes o si existe en nuestro centro un nicho de alta prevalencia de cepas mutantes y no hay pacientes suficientes con neumocistosis a expensas de cepas sin mutaciones como para evaluar si estos tienen una presentación menos grave y una recuperación más rápida. En

el futuro sería interesante realizar una comparación con pacientes de otros centros o incluso de otros países donde las tasas de portación de mutaciones son marcadamente menores. Es imperioso continuar este estudio con un mayor número de muestras y con un análisis más exhaustivo de la evolución clínica de los pacientes así como su historial de exposición a TMS y sus antecedentes de internación.

Esto nos dará herramientas para dilucidar el origen de la presencia de mutaciones y poner en debate los factores de riesgo para este fenómeno así como la posibilidad de tomar nuevas conductas en el abordaje de los pacientes con neumocistosis dado que, por ejemplo, en la actualidad no existen en nuestro país recomendaciones claras acerca del aislamiento de estos enfermos (13).

CONFLICTOS DE INTERESES

Ninguno de los autores declara presentar conflicto de intereses en relación a esta publicación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Calderón Sandubete E, de Armas Rodríguez Y, Capó de Paz V. *Pneumocystis jirovecii*: cien años de historia. *Rev Cubana Med Trop* 2011;63:97-116.
2. Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, et al. Current Epidemiology of *Pneumocystis Pneumonia*. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10: 1713–1720.
3. Calderón EJ, de Armas Y, Panizo MM, Wissmann G. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Latin America. A public health problem? *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013; 11:565-570.

4. Helweg-Larsen J, Benfield T, Eugen-Olsen J, Lundgren J, Lundgren B. Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *Lancet* 1999; 354: 1347–51
5. Huang L, Crothers K, Atzori C, Benfield T, Miller R, Rabodonirina M, et al. Dihydropteroate Synthase Gene Mutations in *Pneumocystis* and Sulfa Resistance. *Emerg Infect Dis*, 2004; 10: 1721–1728.
6. Calderón E, de la Horra C, Montes-Cano MC, s Respaldiza, Martín J, Varela JM. Resistencia genotípica a sulfamidas en pacientes con neumonía por *Pneumocystis jirovecii*. *Med Clin (Barc)* 2004;122:617-9..
7. Ponce CA, Chabé M, George C, Cárdenas A, Durán L, Guerrero J, et al. High Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* Dihydropteroate Synthase Gene Mutations in Patients with a First Episode of *Pneumocystis Pneumonia* in Santiago, Chile, and Clinical Response to Trimethoprim-Sulfamethoxazole Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61(2)e01290-16.
8. Helweg-Larsen J, Eugen-Olsen J, Lundgren B. Rapid Detection of Dihydropteroate Polymorphism in AIDS-related *Pneumocystis carinii* Pneumonia by Restriction Fragment Length Polymorphism. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 481-483.
9. Mogoye B, Du Plessis D, Poonsamy B, Freaun J. Characterisation of *Pneumocystis jirovecii* DHPS genotypes using a simple, inexpensive restriction fragment length polymorphism analysis. *South Afr J Infect Dis* 2015;30:46-50.
10. Suárez I, Roderus L, van Gumpel E, Jung N, Lehmann C, Fätkenheuer C, et al. Low prevalence of DHFR and DHPS mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains obtained from a German cohort. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2017. doi:10.1007/s15010-017-1005-4.
11. Sheikholeslami MF, Sadraei J, Farnia P, Forozandeh Moghadam M, Emadikochak H. Dihydropteroate synthase gene mutation rates in *Pneumocystis jirovecii* strains obtained from Iranian HIV-positive and non-HIV-positive patients. *Med Mycol*, 2015, 53, 361–368.
12. Nahimana A, Rabodonirina M, Bille J, Francioli P, Hauser PM. Mutations of *Pneumocystis jirovecii* Dihydrofolate Reductase Associated with Failure of Prophylaxis. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004; 48: 4301–4305.
13. Hauser P, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, Bille J, et al. Interhuman Transmission as a Potential Key Parameter for Geographical Variation in the Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* Dihydropteroate Synthase Mutations. *Clin Infect Dis*. 2010 Aug 15;51(4):e28-33.