

Infecciones en el paciente inmunodeprimido

María Ángeles Marcos^a, Miriam J. Álvarez-Martínez^a, Jordi Niubó^b y Tomàs Pumarola^a

^aServicio de Microbiología. Hospital Clínic. Barcelona. España.

^bServicio de Microbiología. Hospital Universitario de Bellvitge. L'Hospitalet de Llobregat. Barcelona. España.

Las técnicas de biología molecular han representado un importante avance en el diagnóstico microbiológico de las enfermedades infecciosas, al ser capaces de detectar el microorganismo causal con elevada sensibilidad y establecer marcadores pronósticos y de eficacia terapéutica, en un tiempo lo suficientemente breve para que los resultados generados tengan un impacto determinante en la evolución clínica del paciente inmunodeprimido. Sin embargo, continúan teniendo importantes limitaciones que deberán solucionarse en el futuro, de tal forma que no son excluyentes de otras metodologías utilizadas en microbiología: falta de estandarización, variabilidad intraanálisis e interanálisis, dificultad de comparar resultados entre diferentes laboratorios y bajo valor predictivo positivo, debido a su elevada sensibilidad, que dificultan la interpretación de los resultados. En el presente trabajo, se revisa la utilidad de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico y el seguimiento de la infección en el paciente inmunodeprimido por citomegalovirus humano, virus de Epstein-Barr, virus del herpes simple 6 y 7, virus JC y BK, *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis jirovecii*.

Palabras clave: Diagnóstico microbiológico. Biología molecular. Paciente inmunodeprimido. Trasplante. Infección oportunista.

Infections in immunosuppressed patients

Molecular biology techniques represent a major advance in the microbiologic diagnosis of infectious diseases, since these methods are able to detect etiological microorganisms with high sensitivity. Moreover, these procedures can also establish prognostic and therapeutic efficacy markers with a sufficiently short turnaround time for the results to have a real impact on the clinical management of immunosuppressed patients. However, these techniques still have substantial limitations that should be solved in the near future: lack of standardization, inter- and intra-assay variability, the difficulty of comparing results among different

laboratories and low positive predictive value, due to their high sensitivity, leading to problems in the interpretation of results. The present article reviews the usefulness of molecular biology techniques in the diagnosis and clinical management of infectious diseases caused by human cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, human herpes viruses 6 and 7, JC and BK viruses, *Toxoplasma gondii* and *Pneumocystis jirovecii* in immunosuppressed patients.

Key words: Microbiologic diagnosis. Molecular biology techniques. Immunosuppressed patient. Transplant. Opportunistic infections.

El laboratorio de microbiología clínica tiene un papel determinante en el tratamiento clínico del paciente inmunodeprimido mediante la detección de los diferentes microorganismos causales, diagnóstico de elevada complejidad, derivada de la propia inmunodepresión. En los últimos años, los laboratorios de microbiología también han implementado marcadores pronósticos, que permiten establecer la evolución del paciente y el inicio del tratamiento específico, y de eficacia terapéutica. Sin embargo, para que la actuación microbiológica tenga un impacto positivo en la evolución del paciente inmunodeprimido, debe generar resultados idealmente en menos de 24-48 h desde la recepción de las muestras. En este sentido, las técnicas microbiológicas convencionales, en general, tan sólo aportan detección de microorganismos y, en la mayoría de las ocasiones, de forma tardía. Las técnicas de biología molecular actuales están demostrando su capacidad para generar la información microbiológica necesaria en la clínica y en un breve período. Pero la propia sensibilidad de estas técnicas dificulta en ocasiones su interpretación, lo que no las hace en absoluto excluyentes de otras metodologías utilizadas en microbiología clínica.

En el presente trabajo, se revisa la utilidad de las técnicas de biología molecular para el diagnóstico y el seguimiento de la infección en el paciente inmunodeprimido por citomegalovirus humano (CMVH), virus de Epstein-Barr (VEB), virus del herpes simple 6 y 7 (VHH-6 y VHH-7), virus BK (VBK, *Polyomavirus hominis* 1) y JC (VJC, *Polyomavirus hominis* 2), *Toxoplasma gondii* y *Pneumocystis jirovecii*.

Citomegalovirus

El CMVH continúa siendo uno de los microorganismos patógenos más importantes en el trasplante. La enferme-

Correspondencia: Dra. M.A. Marcos.
Servicio de Microbiología. Hospital Clínic.
Villarroya, 170. 08036 Barcelona. España.
Correo electrónico: mmarcos@clinic.ub.es

dad suele producirse por reactivación de una infección latente, aunque la gravedad de las primoinfecciones es mayor, de ahí la necesidad del cribado serológico de donante y receptor. Si bien la serología es importante para determinar el estado serológico pretrasplante, su utilidad es muy limitada en el diagnóstico de la infección aguda en los pacientes inmunodeprimidos. El aislamiento en cultivo celular es también de poca ayuda, debido al importante retraso en la generación de resultados y su baja sensibilidad.

El CMVH se reactiva en ocasiones sin producir síntomas, por lo que se ha establecido la distinción teórica entre infección activa y enfermedad por CMVH. Esta distinción es clave para la profilaxis, pero también condiciona el diagnóstico. Implica la necesidad de disponer de pruebas que cuantifiquen la carga viral del CMVH en sangre periférica como un marcador de riesgo, donde la tendencia es más útil que el análisis individualizado, ya que su cuantificación inicial y la cinética de incremento son factores independientes en el riesgo de desarrollar enfermedad por CMVH. Así, la determinación de la carga viral es una herramienta diagnóstica clave en el tratamiento clínico de la enfermedad por CMVH. Para ello, debe utilizarse una técnica sensible, cuantificable, rápida y reproducible.

Históricamente, la determinación de la antigenemia pp65-CMVH ha sido la técnica utilizada de forma más amplia para este propósito, y continúa siendo de gran utilidad en centros con un número bajo de muestras. Sin embargo, el incremento progresivo en el número de muestras a analizar, la interpretación subjetiva que conlleva una pobre estandarización y precisión, la necesidad de procesar las muestras en menos de 6-8 h después de su obtención, la dificultad de la interpretación en presencia de leucopenia (< 1.000 leucocitos/ μ l) y la importante dedicación en personal, han llevado a la gran mayoría de los laboratorios a utilizar ensayos de biología molecular, propios o comerciales, para determinar la carga viral de CMVH. En los últimos años, se han desarrollado diversas técnicas de amplificación genética cuantitativa del ácido desoxirribonucleico (ADN)-CMVH, pero las publicaciones más recientes con estas técnicas no consiguen mejorar los resultados de la antigenemia¹⁻³.

Los ensayos de cuantificación de la carga viral mediante técnicas de amplificación de ADN-CMVH, tanto por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional, como en tiempo real, han demostrado ser de gran utilidad en el seguimiento de los pacientes cuando se utilizan protocolos de tratamiento preventivo, de diagnóstico de enfermedad y de seguimiento del tratamiento. Los estudios basados en técnicas de biología molecular han utilizado sangre total o plasma, sin que haya variabilidad significativa en los resultados obtenidos. La determinación en plasma es más simple y sus resultados se correlacionan bien con los obtenidos en sangre total.

Para los ensayos de cuantificación de ADN-CMVH no hay un estándar de referencia externo ni programas de control de calidad, por lo que es muy difícil determinar la variabilidad intralaboratorio, lo que dificulta la comparación de resultados, que tan sólo será posible cuando se disponga de un estándar con unidades internacionales, como ya ocurre con los virus de las hepatitis. Pero además, presentan una significativa variabilidad intraanálisis que no permite diferenciar entre valores de carga viral de 3-5 veces. Las nuevas técnicas de PCR en tiempo real han de-

mostrado tener una variabilidad menor intraanálisis e interanálisis². Otro aspecto importante es la falta de un valor umbral concreto que permita predecir el desarrollo de enfermedad y, por tanto, iniciar el tratamiento preventivo. Hoy por hoy, este valor tiene que establecerlo cada centro en función del riesgo del paciente y de la propia experiencia. Para la PCR cuantitativa, el valor umbral puede variar entre 400 y 5.000 copias. Los estudios de historia natural para determinar los valores de carga viral predictivos de enfermedad son escasos y deberían establecerse para cada tipo de ensayo y de trasplante. Sin embargo, el riesgo de enfermedad no depende tan sólo del valor umbral, sino también de otros parámetros de la cinética viral, como el incremento semanal de la carga viral, para los que todavía no hay datos concluyentes.

Otra limitación importante en la determinación de la viremia es su bajo valor predictivo negativo en la enfermedad localizada por CMVH, particularmente en el tracto gastrointestinal y en el pulmón. Adicionalmente, el valor predictivo positivo de las técnicas moleculares para el diagnóstico de enfermedad localizada en biopsias de tejido o lavado broncoalveolar (LBA)⁴ también es bajo, por lo que debe utilizarse el aislamiento en cultivo o el análisis histopatológico del tejido mediante técnicas inmunohistoquímicas o de hibridación in situ, para identificar las células infectadas.

La resistencia de CMVH a los fármacos antivirales es un problema emergente en el trasplante⁵. Es posible realizar la secuenciación de *UL97*, gen causante de la resistencia a ganciclovir, directamente a partir de las muestras biológicas del paciente y obtener resultados en 24-48 h, sin que se hayan observado diferencias con los resultados de secuenciación a partir de aislados clínicos⁶. Probablemente, se obtendrán resultados similares en la secuenciación de *UK54*, gen de la ADN polimerasa, que contiene las mutaciones de resistencia a cidofovir y foscarnet.

Virus de Epstein-Barr

Más del 90% de la población adulta ha sido infectada por el VEB y ha desarrollado anticuerpos. El VEB se transmite fundamentalmente mediante el contacto con las secreciones bucales, pero también hay referencias de transmisión por transfusiones de sangre y trasplante de órganos. Después de la infección primaria, el VEB permanece en los linfocitos B de forma latente. En el control de la infección por el VEB, es más importante la inmunidad celular que la humoral; así, si la inmunidad de las células T está afectada, como ocurre en los pacientes trasplantados, los linfocitos B infectados por el VEB comienzan a proliferar, y pueden derivar en una enfermedad linfoproliferativa postrasplante (ELPPT), que en general tiene mal pronóstico. Aunque la infección por VEB en pacientes trasplantados puede aparecer como una infección primaria, lo más frecuente son las reactivaciones. La mayor incidencia de ELPPT aparece entre el primer y el quinto mes postrasplante, con un pico máximo en el tercer mes. Como factores implicados en el desarrollo de la ELPPT se han descrito: el tipo de órgano trasplantado; el tipo, la duración y la intensidad de la inmunodepresión; la edad del receptor y la seronegatividad frente al VEB previa al trasplante; el tratamiento con sueros antilinfo-

citarios monoclonales o policlonales, tanto en la inducción, como en el tratamiento del rechazo agudo, y el *mis-match* para citomegalovirus entre donante y receptor. A pesar de haber diferentes tratamientos, la mortalidad es muy alta, por lo que el diagnóstico temprano es fundamental en la prevención de la ELPPT⁷.

Desde el punto de vista microbiológico, el diagnóstico de la infección por VEB se basa fundamentalmente en las pruebas serológicas y en métodos directos moleculares, principalmente mediante PCR. Las técnicas serológicas tienen una utilidad diagnóstica discreta en pacientes trasplantados, ya que estos pacientes presentan una respuesta serológica deficiente. Únicamente tendría interés, antes del trasplante, sobre todo en el caso del trasplante hematológico, conocer el estado serológico tanto del donante, como del receptor, ya que el trasplante de un donador seropositivo a un receptor seronegativo es un riesgo para desarrollar ELPPT posteriormente.

Se ha evaluado una gran variedad de procedimientos de PCR para detectar y cuantificar el VEB en muestras clínicas. El mayor inconveniente de estas técnicas es su falta de estandarización. Los datos publicados difieren en el tipo de muestra, el método elegido, la sensibilidad, e incluso en el número de copias utilizado como valor umbral para empezar con un tratamiento anticipado. Respecto al tipo de muestra, tanto el plasma como la sangre total o las células mononucleadas de sangre periférica son muestras adecuadas para detectar VEB. La sangre total y las células mononucleadas de sangre periférica presentan una sensibilidad similar y hay una buena correlación entre ellas en los valores de carga viral⁸. El plasma tiene una especificidad mayor que la sangre y las células mononucleadas para el diagnóstico de ELPPT, ya que no detecta infección latente. Sin embargo, es menos sensible; así, un incremento en el número de copias aparece de forma más temprana en sangre total que en plasma, y no todos los pacientes con reactivación tienen resultados positivos en plasma. No obstante, el plasma es una muestra útil en el seguimiento del tratamiento⁹.

La técnica de PCR puede ser cualitativa y cuantitativa. La PCR cualitativa tiene una utilidad bastante limitada, ya que sólo es un método de detección y, cuando se aplica a sangre total, es incapaz de distinguir entre infección activa y latente. Respecto a la PCR cuantitativa, hay varias modalidades: semicuantitativa¹⁰, cuantitativa competitiva¹¹ o en tiempo real¹². La PCR cuantitativa, a diferencia de la cualitativa, permite el seguimiento de la carga viral postrasplante, el seguimiento de la eficacia del tratamiento⁹, y puede ser de ayuda en el diagnóstico diferencial de ELPPT y rechazo agudo, que tienen un tratamiento terapéutico opuesto (disminución frente a incremento de la inmunodepresión)¹³. En los últimos años, fundamentalmente en el campo del diagnóstico de la infección en el paciente trasplantado, la PCR en tiempo real está reemplazando a los otros tipos de PCR. La principal ventaja de la PCR en tiempo real es su rapidez, ya que los procesos de amplificación y detección se realizan simultáneamente, aproximadamente en 1 h. Otra ventaja muy importante es que, al utilizar sistemas cerrados, el riesgo de contaminación disminuye de forma muy importante. Además, los sistemas en tiempo real permiten cuantificar la cantidad de ADN viral en la muestra de una manera más sencilla, precisa y en un rango mucho mayor que en

los métodos convencionales. Aunque hay un incremento significativo en la carga viral del VEB en el momento del diagnóstico de ELPPT⁹, no hay un nivel umbral de ADN viral que pueda predecir la ELPPT^{9,12}.

En conclusión, la reactivación del VEB es un hecho frecuente en pacientes trasplantados, especialmente hematológicos. El seguimiento seriado de la carga viral en los pacientes con más riesgo es fundamental para predecir la ELPPT, lo que permite aplicar cuanto antes un tratamiento preventivo y disminuir la incidencia de la enfermedad linfoproliferativa.

Virus del herpes humano 6 y 7

Se consideran virus de distribución universal, que causan infecciones frecuentes en la infancia, se mantienen en estado de latencia y son capaces de reactivarse en situaciones de inmunodepresión, como ocurre después de un trasplante. El modo de transmisión es fundamentalmente a través de la saliva. Tras la infección primaria, el genoma viral persiste de forma latente en los linfocitos, en las células mononucleadas de sangre periférica, en las células epiteliales de las glándulas salivares y en otros muchos tejidos y órganos. En España, la seroprevalencia en la población adulta es alta, alrededor del 90% para el VHH-6 y del 70% para el VHH-7. La incidencia de la infección por VHH-6 y VHH-7 en pacientes trasplantados tiene una enorme variabilidad, dependiendo fundamentalmente del tipo de trasplante y de la metodología y muestras utilizadas para su diagnóstico¹⁴⁻¹⁶. Las infecciones ocurren típicamente de forma temprana, dentro de las primeras 4 semanas postrasplante, antes que la infección por citomegalovirus. En la mayoría de los casos, las infecciones se deben a la reactivación del virus, aunque también se han descrito casos de primoinfección debidos a la transmisión del virus a partir de transfusiones sanguíneas o del órgano del donante¹⁵. La asociación entre infección activa y sintomatología clínica no está bien establecida. Probablemente, la mayoría de las infecciones cursa de forma asintomática, aunque puede aparecer fiebre, exantema cutáneo, neumonía intersticial, hepatitis, encefalitis y citopenias por supresión medular. Además de estos efectos directos, estos virus pueden dar lugar a efectos indirectos, como resultado de la activación de fenómenos inmunológicos o de otros herpesvirus, como CMVH, e incluyen fundamentalmente una frecuencia mayor de enfermedad por CMVH, aumento de las infecciones oportunistas, el rechazo y la disfunción del injerto.

El diagnóstico de la infección por VHH-6 y VHH-7 puede realizarse de forma directa mediante el aislamiento del virus, la detección de antígeno en sangre y la detección de ADN viral, o bien de forma indirecta mediante la demostración de anticuerpos específicos. La utilización de medios de cultivo para obtener el crecimiento del virus es un método poco utilizado, debido a la lentitud en obtener un resultado y a la laboriosidad de la técnica. La determinación de antigenemia en leucocitos de sangre periférica, aunque es una técnica rápida, tiene utilidad limitada debido a la difícil estandarización e interpretación de los resultados; además, en el paciente inmunodeprimido, el número de leucocitos puede estar disminuido, y, por tanto, también la sensibilidad de la prueba. Respecto

a la serología, su utilidad prácticamente queda restringida al conocimiento de la seroprevalencia pretrasplante, ya que presenta una serie de inconvenientes: no diferencia la reinfección o reactivación de la infección latente, en la mayoría de las veces en el paciente inmunodeprimido no hay respuesta inmunológica detectable, y puede producirse reactividad cruzada en la respuesta de anticuerpos frente a antígenos comunes del VHH-6 y VHH-7.

Por todo lo comentado anteriormente, las técnicas de detección de ADN mediante PCR son las ideales para el estudio de la infección por VHH-6 y VHH-7 en pacientes trasplantados. Entre sus ventajas, se encuentra la rapidez del diagnóstico, el empleo de muestras no invasivas, su elevada sensibilidad y la posibilidad de controlar la carga viral. Debido a que estos virus permanecen latentes en una proporción elevada de la población, es imprescindible que estas técnicas diferencien entre infección latente y activa. La detección de ADN en orina o saliva puede reflejar infección latente y, por tanto, sobreestimar la incidencia de infección activa. La detección de ADN viral en muestras acelulares, como el plasma y el líquido cefalorraquídeo (LCR), indica que hay infección activa¹⁷. Así, la presencia de ADN viral en LCR se ha asociado a encefalitis en ausencia de otra etiología¹⁸. El significado de la detección de ADN viral en el LBA en los pacientes inmunodeprimidos con neumonía intersticial no está claro¹⁹. Cuando se detecta virus en sangre total o células mononucleares en sangre periférica hay que ser muy cauteloso en la interpretación de los resultados, ya que se puede detectar infección latente. Por tanto, estas muestras no serán útiles a menos que se utilice una PCR cuantitativa.

Hay una gran variedad de procedimientos de PCR. La PCR cualitativa en cualquiera de sus modalidades, técnicas anidadas con detección en gel de agarosa, hibridación con sonda e incluso la novedosa técnica de los *microarrays*²⁰, sólo permite la detección de uno o más virus. Sin embargo, en el paciente trasplantado es imprescindible realizar un seguimiento seriado de la carga viral para conocer el verdadero significado de esta detección. En los últimos años, el desarrollo de técnicas de detección cuantitativa por PCR en tiempo real, a partir de diversas tecnologías (LightCycler, Taqman)²¹, ha permitido mejorar realmente el tratamiento del paciente trasplantado. El estudio de la carga viral permite realizar el seguimiento de los valores de ADN, para predecir la evolución de la infección y la respuesta al tratamiento. En la actualidad, se dispone de PCR múltiples que, de manera cualitativa o cuantitativa, pueden detectar simultáneamente varios virus, como por ejemplo VHH-6 y VHH-7; las 2 variantes de VHH-6; VHH-6, VHH-7, VHH-8, y CMVH²². La detección de varios virus de manera simultánea es de gran interés en el postrasplante, ya que se han descrito interacciones entre miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae*²³. Sin embargo, es necesario realizar más estudios que permitan crear guías y recomendaciones que ayuden a los microbiólogos a estandarizar las técnicas y al clínico a utilizar de forma correcta los resultados obtenidos.

Virus BK y JC

Los VBK y VJC infectan naturalmente a los humanos de forma muy prevalente en la población mundial (35-

85%). La infección por ambos virus suele producirse de forma subclínica en la primera infancia y persiste de por vida de forma asintomática. La actividad viral aumenta en gran medida en situaciones de inmunodepresión, y llegan a causar enfermedades renales (VBK) y del sistema nervioso central (SNC) por VJC. Otros *Polyomavirus* (PV) que pueden infectar a humanos son los virus KI y WU, recientemente descritos en infecciones respiratorias, y el virus de simios SV40. A los 5-8 años de edad, el 70% de la población ha seroconvertido para los virus JC y BK. La infección primaria es asintomática o leve, aunque se han descrito casos aislados graves. La latencia se realiza en células epiteliales del endotelio urinario y renal (VBK y VJC) con excreción esporádica de virus por orina (5-15% para el VBK, y 5-40% para el VJC en inmunocompetentes)²⁴. El VJC puede persistir además en linfocitos B de médula ósea, desde donde puede diseminarse al SNC.

El VBK causa nefropatía asociada a poliomavirus (NPV) en receptores de trasplante renal, raramente en receptores de otros órganos. La NPV puede conducir a disfunción e incluso a pérdida del injerto (de 10 a > 80%)^{25,26} y, por otra parte, puede ser difícil de distinguir del rechazo. En un subgrupo de pacientes con NPV, se ha observado coinfección por VBK y VJC y, en raras ocasiones, coinfección por VBK y SV40; en ambos casos, el papel etiológico del virus coinfectante resta por definir. También se ha descrito para VJC en solitario (< 3%), aunque con menor virulencia, ya que en ninguno de estos pacientes se perdió el injerto²⁷. La NPV es más frecuente durante el primer año postrasplante. El VBK puede causar además hematuria asintomática, cistitis hemorrágica (CH) y estenosis ureteral en pacientes trasplantados de médula ósea y de órgano sólido. El VJC es el agente causal de la leucoencefalopatía multifocal progresiva (LMP), una enfermedad grave, bastante rara antes de la pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). El 80% de los casos se observa en pacientes seropositivos para VIH-1 con deterioro de su inmunidad celular; el resto son pacientes con enfermedades linfoproliferativas y receptores de trasplante con intenso tratamiento inmunodepresor.

En el diagnóstico de NPV por VBK, dado que la infección activa con replicación viral es el único factor común en los trasplantados renales con NPV y que precede a la enfermedad, se ha postulado el cribado periódico de los pacientes mediante diversas pruebas de laboratorio para el diagnóstico temprano que permita la intervención clínica con el fin de conseguir una menor pérdida de injertos^{25,26}. Las pruebas de cribado son negativas en el 60-80% de los pacientes trasplantados renales²⁵, siendo su valor predictivo negativo > 99%, por lo que una prueba negativa prácticamente excluye la enfermedad. Las técnicas de cribado que han demostrado una precocidad y utilidad clínica mayores son la citología urinaria y las pruebas de detección de ácidos nucleicos en orina o en plasma, aunque también se puede demostrar la actividad viral por cultivo o microscopía electrónica. La viruria precede a la viremia en una media de 4 semanas y en una media de 12 semanas a la NPV²⁵. Una prueba de cribado positiva debe repetirse a las 2-4 semanas y, si persiste, ha de confirmarse por PCR en plasma y/o examen de biopsia renal. El cultivo celular convencional es poco práctico, dado que el crecimiento del VBK es lento y su efecto citopático poco prominente²⁶; la centrifugación-cul-

tivo (*shell-vial*), aunque más rápida, tampoco se ha utilizado en la práctica. La microscopia electrónica de orina, aunque específica de PV, es poco factible en la mayoría de los laboratorios de microbiología clínica y no permite la cuantificación. La citología urinaria requiere procesar la muestra antes que degenera la morfología celular. Las extensiones se observan en contraste de fases o con tinción de Papanicolaou para detectar las células del epitelio transicional infectadas, con el núcleo agrandado e inclusiones intranucleares basofílicas (*decoy cells*), cuya sensibilidad es del 100%, con valor predictivo negativo del 100% y positivo del 30%. La citología no permite diferenciar entre los distintos PV y existe la potencial confusión con adenovirus, CMVH o células malignas; puede realizarse de forma semicuantitativa: un punto de corte de > 10 *decoy cells*/preparación en presencia de células inflamatorias aumentaría la especificidad^{25,26}.

La orina destinada a realizar las pruebas de amplificación genética puede utilizarse sin ningún procesamiento previo. No obstante, es preciso tener en cuenta que la cuantificación puede variar por fluctuaciones en la concentración de la orina, o también si se utiliza la orina simplemente resuspendida, el sobrenadante de orina centrifugada, o el sedimento urinario; no hay un consenso al respecto, aunque es obvio que cada laboratorio debe estandarizar el procesamiento de la muestra. Siempre que se trabaje con métodos moleculares deberá conservarse la muestra congelada, en especial si se va a realizar cuantificación de ácido ribonucleico mensajero (ARNm). La excreción urinaria de VBK, aunque poco común en inmunocompetentes, es muy frecuente en trasplantados (10-45% en los de riñón y $> 50\%$ en los de médula ósea)²⁶. La mayoría de los estudios utilizan la PCR para amplificar el ADN genómico del VBK en orina, ya sea de forma cualitativa o cuantitativa. Por su elevada sensibilidad, las pruebas cualitativas, sobre todo si se utiliza PCR anidada, obligan a realizar pruebas de confirmación en muchas ocasiones, para lo que se ha propuesto que se realicen de forma semicuantitativa, usando como umbral la dilución 10^6 de la orina con un técnica de PCR cuya sensibilidad esté en 1-10 copias/ml.

La PCR cuantitativa realizada mediante PCR en tiempo real correlaciona con la NPV, y valores mantenidos por encima de 10^7 copias/ml orina durante más de 3 semanas se asocian a NPV^{25,26}. La cuantificación de ARNm de VP1 (gen tardío) es sólo posible si hay células infectadas de forma activa, siendo el umbral propuesto en orina para correlación con NPV de $\geq 6,5 \times 10^5$ copias ARNm/ng de ARN total^{25,26}. La viremia detectada por PCR correlaciona mejor con la NPV, aunque es menos temprana que la viruria. Valores mantenidos por encima de 10^4 copias/ml plasma durante más de 3 semanas se asocian a NPV con una sensibilidad cercana al 100% y una especificidad del 90%, aproximadamente, siendo los valores predictivos negativo y positivo del 100 y el 50%, respectivamente.

Se han descrito raros casos de NPV con viremia negativa, pero viruria positiva, posiblemente debidos al uso de una técnica de PCR ineficiente o al uso de cebadores inadecuados para la cepa viral. En otros casos, persiste un nivel de viremia bajo con biopsia negativa para NPV. En estas ocasiones sería recomendable controlar de cerca los valores de viremia y, si se cree conveniente, repetir la biopsia.

Plasma (EDTA) o suero pueden utilizarse para determinar la viremia. No obstante, es recomendable utilizar siempre el mismo tipo de muestra para el seguimiento de los pacientes. Para las técnicas de PCR, tanto en sangre como en orina, es preciso descartar la presencia de inhibidores mediante el uso de controles internos o por amplificación de un gen humano en el mismo extracto de la muestra. Es necesario desarrollar estándares internacionales para establecer la reproducibilidad y la validez de los resultados. Un panel internacional de expertos²⁵ ha recomendado el cribado de todos los trasplantados renales cada 3 meses durante los primeros 2 años postrasplante y anualmente hasta el 5.º año. Además, siempre que se observe disfunción del injerto con elevación de los valores de creatinina y siempre que se realice biopsia del injerto por cualquier motivo deberían realizarse pruebas de cribado para VBK^{25,26}. El coste-beneficio de esta estrategia debe valorarse en cada centro, dependiendo de la prevalencia de NPV observada.

El examen histológico e inmunohistoquímico de la biopsia renal sigue siendo necesario para el diagnóstico definitivo de NPV^{25,26}. El diagnóstico diferencial debe hacerse con el rechazo, cuyo tratamiento es la administración de inmunodepresores. Por el contrario, la NPV se trata con la reducción de éstos combinada con la vigilancia activa frente al rechazo. Los cambios citopáticos causados por el virus son los que permiten la diferenciación con el rechazo, aunque rechazo y NPV se pueden presentar de forma concomitante. Por otra parte, la NPV puede ser focal, por lo que se postula el examen de 2 *cores*. De todas formas, un resultado negativo en la biopsia no excluye totalmente la NPV, y no se descarta la repetición de ésta si persisten valores de ADN por encima del umbral. Durante la reducción del tratamiento inmunodepresor debe controlarse el ADN de PV en plasma y orina cada 2-4 semanas (disminución $> 2 \log_{10}$ en 8-12 semanas)²⁵. A pesar del cribado activo, algunos pacientes pueden perder el injerto a causa de NPV. El retrasplante es posible, pero la recurrencia de NPV es más elevada (15%). Por este motivo es recomendable esperar a la negativización de la replicación viral antes del retrasplante²⁵.

Respecto a la CH por VBK, un 77-90% de los pacientes adultos trasplantados de médula ósea excretan VBK en orina, en muchos casos sin CH²⁸; en niños alrededor del 60%. La CH con > 7 días de duración que se inicia en las 2-12 semanas postrasplante se ha asociado con viruria por VBK²⁶. Otras causas de CH son la toxicidad a fármacos (radioterapia, quimioterapia) o infecciones virales (adenovirus o CMVH). La cuantificación en orina del VBK muestra correlación con la CH aunque no se han podido establecer unos valores umbral, porque las variaciones individuales son muy pronunciadas. De todas formas, los pacientes con CH tienen unos valores máximos de viruria superiores (media 6×10^{12} copias/ml) que los pacientes sin CH ($5,7 \times 10^7$ copias/ml), por lo que se ha propuesto un umbral de 10^{10} copias/ml, aunque no todos los pacientes que superan este umbral desarrollan CH. La viremia también se ha correlacionado con CH, siendo el umbral propuesto 10^4 copias/ml de plasma para riesgo de presentar CH por VBK²⁸.

El diagnóstico de LMP por VJC es inicialmente clínico y radiológico (resonancia magnética o tomografía computarizada). La confirmación de laboratorio puede hacerse por el examen histopatológico de biopsia de las lesiones o,

de forma menos invasiva, por la detección del ADN de VJC en LCR. El LCR obtenido por punción lumbar en los pacientes con sospecha de LMP deberá conservarse congelado en alícuotas hasta el momento de su procesamiento. La PCR cualitativa o cuantitativa son los métodos más utilizados. En el caso del LCR, la cuantificación es de una importancia relativa, siendo más necesario obtener la máxima sensibilidad de la prueba. Por otra parte, en los pocos casos de NPV atribuidos en exclusiva al VJC, la cuantificación de la carga viral puede ser de importancia, dada la mayor frecuencia de excreción de VJC en pacientes inmunocompetentes. Los umbrales propuestos son similares a los del VBK: 10^7 copias/ml en orina y 10^4 copias/ml en plasma²⁷.

Toxoplasma gondii

La toxoplasmosis es una infección endémica, de distribución mundial, causada por *T. gondii*, protozoo intracelular obligado del orden *Coccidia*, phylum *Apicomplexa*. La infección en el hombre se adquiere por vía oral (ingestión de agua o alimentos contaminados con ooquistes, o de carne poco cocinada que contenga quistes titulares), por vía transplacentaria, siendo también posible la transmisión a través de órganos de donantes seropositivos a receptores seronegativos. En los pacientes inmunodeprimidos, como aquellos con sida, trasplantados y pacientes con inmunodepresión por neoplasia, la enfermedad es consecuencia de la reactivación de una infección latente. La toxoplasmosis en estos pacientes evoluciona muy rápidamente y tiene morbimortalidad elevada²⁹.

Hasta la aparición de las técnicas de biología molecular, el diagnóstico etiológico de la toxoplasmosis se ha realizado, casi exclusivamente, mediante serología. Sin embargo, si el paciente presenta una afectación inmunológica, la serología puede fallar o dar resultados equívocos. El principal problema de la PCR en el diagnóstico de la toxoplasmosis es la falta de protocolos estandarizados. Se han empleado varios tipos de PCR²⁹⁻³³: la PCR convencional (*nested* y *seminested* PCR), PCR en tiempo real y PCR seguida de oligocromatografía. Asimismo, se han usado varios genes³⁰ de *T. gondii* como diana de amplificación. El más empleado es el gen *B1*, con 35 copias en el genoma, y otros son: el gen *P30*, gen unicopia que codifica el antígeno mayor de superficie; el gen *ARNr* que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosómico, con 110 copias en el genoma; el fragmento de 529 pb con 300 copias por genoma; los genes unicopia alfatubulina y betatubulina, y un fragmento repetitivo de ADN, no codificante, el TGR1E. Respecto al tipo de muestra utilizada en pacientes inmunodeprimidos, se ha demostrado la utilidad del LCR, LBA, humor vítreo y acuoso, líquido pleural y peritoneal, aspirado de médula ósea, sangre periférica y tejidos afectados.

La encefalitis por *Toxoplasma*³¹ es la infección oportunista del SNC más frecuente en pacientes inmunodeprimidos, y la enfermedad es diagnóstica de sida en el 6,4% de los casos nuevos en España. Hasta la aparición de la PCR, la biopsia cerebral era la muestra en la que se efectuaba el diagnóstico de confirmación. En la actualidad, se confirma el diagnóstico mediante PCR en sangre o LCR, lo que evita la morbimortalidad intraoperatoria de la toma de biopsia. La sensibilidad de la PCR en sangre varía

entre el 16 y el 86%, según el tipo de ensayo utilizado. En LCR, la sensibilidad también es muy variable, entre el 17 y el 100%. Para ambas muestras, la sensibilidad de las técnicas disminuye drásticamente si el paciente ha recibido previamente tratamiento antitoxoplasma. Sin embargo, la quimioprofilaxis no parece afectar a los resultados. La especificidad en todos los estudios es del 100%. A pesar de la sensibilidad variable, la especificidad elevada y el valor predictivo positivo elevado, hacen de la PCR una técnica muy útil en el diagnóstico de las lesiones cerebrales focales en pacientes inmunodeprimidos cuando hay sospecha clínica y radiológica.

La forma de toxoplasmosis extracerebral más frecuente en pacientes inmunodeprimidos es la pulmonar. La detección de *T. gondii* en LBA, en los casos pulmonares, mediante PCR, tiene una sensibilidad y especificidad del 100%, independientemente de la técnica utilizada, mientras que en sangre la sensibilidad disminuye al 75%. En el diagnóstico de la forma diseminada, la PCR en sangre tiene una sensibilidad y una especificidad del 100%³⁰. En la toxoplasmosis ocular, la detección de ADN del parásito en el humor acuoso es menos sensible que la detección local de anticuerpos, y la PCR tiene una sensibilidad entre el 18 y el 37%. Sin embargo, cuando el diagnóstico se realiza en humor vítreo, la sensibilidad es del 100%³¹.

Por tanto, podemos concluir que, a pesar de la falta de estandarización de los métodos de diagnóstico molecular de toxoplasmosis, deben considerarse para complementar o confirmar el diagnóstico clínico, radiológico y serológico en los pacientes inmunodeprimidos, además de ser útiles en el seguimiento de la evolución del paciente con toxoplasmosis, o con riesgo de presentarla.

Pneumocystis jirovecii

La neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, antes *P. carinii* (PcP), sigue siendo una importante causa de morbimortalidad en los pacientes infectados por el VIH y en inmunodeprimidos por otras causas, a pesar del descenso observado tras la introducción de la profilaxis frente a *Pneumocystis*, y el tratamiento antirretroviral combinado (c-ART)³⁴. En los últimos 15 años, el uso de las técnicas moleculares ha aportado una información valiosa sobre la genética de *Pneumocystis*, lo que facilita la comprensión de la biología del organismo y la epidemiología de la infección en humanos. El impacto de los estudios moleculares ha tenido una importancia especial en el conocimiento de su taxonomía, hoy reclasificado como un hongo, así como en el del reservorio de la enfermedad y la fuente de la infección, y se ha determinado que el hombre es el reservorio de *P. jirovecii*, que la transmisión es persona a persona, a través de aerosoles, y que presumiblemente es colonizado transitoriamente a lo largo de la vida³⁴.

En la actualidad, el diagnóstico en LBA mediante la tinción de plata-metamina de Gomori, se considera la técnica de referencia. Sin embargo, los métodos moleculares han revolucionado el diagnóstico. La PCR es una técnica muy sensible, y permite la detección de *P. jirovecii* incluso cuando se encuentra en número tan bajo que la tinción es incapaz de demostrar. Puede también determinar su presencia en pacientes sin manifestaciones clínicas, definiendo el estado de portador o colonizado asintomático.

Asimismo, permite utilizar muestras no invasivas para detectar *P. jirovecii*, como los enjuagues orales o el esputo simple, lo que evita realizar técnicas agresivas para el paciente.

Aproximadamente, se han estudiado³⁴ unos 15 genes de *Pneumocystis* con diferentes objetivos, incluidos el diagnóstico, el estudio de los patrones de transmisión, la gravedad de la infección, y el fracaso del tratamiento y de la profilaxis. El primer gen que se identificó y evaluó para uso diagnóstico fue el que codifica la subunidad del ARN ribosómico grande (mtLSU rARN). Otro de los genes mitocondriales estudiados es el que codifica la subunidad pequeña del ARN ribosómico (mtSSU rARN). El tercero estudiado es el gen del citocromo b mitocondrial. Respecto a los genes nucleares, ITS1 e ITS2 (espaciador interno de transcripción 1 y 2 del ARN ribosómico) son los más utilizados. Entre los genes que codifican dianas específicas de fármacos, 2 se han estudiado en los últimos años, por su implicación con la resistencia emergente a los fármacos anti-*Pneumocystis*: el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el de la dihidropteroato sintetasa (DHPS). Ambos genes codifican enzimas clave en el metabolismo del ácido fólico. La combinación de trimetoprim (TMP) y sulfametoxazol (SMX), cotrimoxazol, es de elección en el tratamiento y profilaxis de la PcP, aunque parece que tan sólo el SMX tiene actividad anti-*Pneumocystis*. La DHFR es el sitio activo del TMP y la DHPS, del SMX. El uso prolongado del TMP-SMX, tanto para profilaxis como para tratamiento, ha ejercido una gran presión en la DHPS, y ha determinado la aparición de mutaciones en este gen, que se han asociado a resistencia a las sulfamidas³⁵. Por último, la glucoproteína mayor de superficie (MSG) es la principal proteína antigénica de la superficie de la membrana de todas las especies de *Pneumocystis*. Desempeña un papel importante en la adherencia del organismo a las células del epitelio alveolar. La MSG está codificada por una familia de genes multicopia. Con el cambio de expresión de MSG, el organismo cambia los antígenos de superficie, y escapa de la respuesta inmunitaria del huésped. Hay estudios preliminares del multilocus de la MSG que se han utilizado para discernir entre el cuadro clínico de PcP y el estado de portador de *Pneumocystis*³⁴.

Se han utilizado diferentes técnicas de PCR, PCR convencional, *nested*-PCR y PCR en tiempo real, en el diagnóstico de PcP, en LBA, esputo inducido y enjuagues orales. Los valores de sensibilidad oscilan entre el 84 y el 100%, y los de especificidad, entre el 58 y el 100% para LBA, según la técnica utilizada³⁶. En la actualidad, se han publicado diversos trabajos^{37,38} en los que se han comparado la sensibilidad y la especificidad de los enjuagues orales, frente al LBA, para el diagnóstico de la PcP mediante PCR convencional, presentando unos valores del 90 y el 95% para los enjuagues orales, y el 100 y el 90% para LBA, respectivamente. Dada la rentabilidad de los enjuagues orales en el diagnóstico de la PcP mediante PCR convencional, podría utilizarse esta muestra no invasiva en el diagnóstico sistemático con PCR en tiempo real. Hasta el momento, sólo se ha publicado un estudio³⁸ que ha usado los enjuagues orales en el diagnóstico de la PcP mediante PCR en tiempo real. Los valores de sensibilidad y especificidad fueron del 88 y el 85%, respectivamente.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores han declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Lengerke C, Ljubicic T, Meisner C, Loeffler J, Sinzger G, Einsele H, et al. Evaluation of the COBAS Amplicor HCMV Monitor for early detection and monitoring of human cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006;38:53-60.
- Allice T, Enrietto M, Pittaluga F, Varetto S, Franchello A, Colucci G, et al. Quantitation of cytomegalovirus DNA by real-time polymerase chain reaction in peripheral blood specimens of patients with solid organ transplants: comparison with end-point PCR and pp65 antigen test. *J Med Virol.* 2006;78:915-22.
- Pumannova M, Roubalova K, Vitek A, Sajdova J. Comparison of quantitative competitive polymerase chain reaction-enzyme-linked immunosorbent assay with LightCycler-based polymerase chain reaction for measuring cytomegalovirus DNA in patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;54:115-20.
- Chemaly RF, Yen-Lieberman B, Chapman J, Reilly A, Bekele BN, Gordon SM, et al. Clinical utility of cytomegalovirus viral load in bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. *Am J Transplant.* 2005;5:544-8.
- Chou S, Lurain NS, Thompson KD, Miner RC, Drew WL. Viral DNA polymerase mutations associated with drug resistance in human cytomegalovirus. *J Infect Dis.* 2003;188:32-9.
- Jabs DA, Martin BK, Ricks MO, Forman MS. Cytomegalovirus retinitis and viral resistance study group. Detection of ganciclovir resistance in patients with AIDS and cytomegalovirus retinitis: correlation of genotypic methods with viral phenotype and clinical outcome. *J Infect Dis.* 2006;193:1728-37.
- Paya CV, Fung JJ, Nalesnik MA, Kieff E, Green M, Gores G, et al. Epstein-Barr virus-induced post-transplant lymphoproliferative disorders. ASTS/ASTP EBV-PTLD task force and the Mayo clinic organized international consensus development meeting. *Transplantation.* 1999;68:1517-25.
- Hakim H, Gibson C, Pan J, Srivastava K, Gu Z, Bankowki MJ, et al. Comparison of various blood compartments and reporting units for detection and quantification of Epstein-Barr virus in peripheral blood. *J Clin Microb.* 2007;45:2151-5.
- Meerbach A, Wutzler P, Häfer R, Zintl F, Gruhn B. Monitoring of Epstein-Barr virus load after hematopoietic stem cell transplantation for early intervention in post-transplant lymphoproliferative disease. *J Med Virol.* 2008;80:441-54.
- Fellner MD, Durand K, Correa M, Bes D, Alonso LV, Teyssié AR, et al. A semiquantitative PCR method (SQ-PCR) to measure Epstein-Barr virus load: its application in transplant patients. *J Clin Virol.* 2003;28:323-30.
- Gärtner BC, Schäfer H, Marggraff K, Eisele G, Schäfer M, Dilloo D, et al. Evaluation of use of Epstein-Barr viral load in patients after allogeneic stem cell transplantation to diagnose and monitor posttransplant lymphoproliferative disease. *J Clin Microbiol.* 2002;40:351-8.
- Yancoski J, Danielian S, Ibanez J, Turconi A, Cuarterolo M, Zelazko M, et al. Quantification of Epstein-Barr virus load in Argentinean transplant recipients using real-time PCR. *J Clin Virol.* 2004;31:58-65.
- Van Esser J W, Niesters HG, Van der Holt E, Meijer E, Osterhaus AD, Gratama JW, et al. Prevention of Epstein-Barr virus lymphoproliferative disease by molecular monitoring and preemptive rituximab in high-risk patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2002;99:4364-9.
- Cervera C, Marcos MA, Linares L, Roig E, Benito N, Pumarola T, et al. A prospective survey of human herpesvirus-6 primary infection in solid organ transplant recipients. *Transplantation.* 2006;82:979-84.
- Anton A, Cervera C, Pumarola T, Moreno A, Benito N, Linares L, et al. Human herpesvirus 7 primary infection in kidney transplant recipients. *Transplantation.* 2008;85:298-302.
- Dockrell DH, Paya CV. Human herpesvirus-6 and -7 in transplantation. *Rev Med Virol.* 2001;11:23-36.
- Zerr Dm, Corey L, Kim HW, Huang ML, Nquy L, Boeckh M, et al. Clinical outcomes of human herpesvirus 6 reactivation after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis.* 2005;40:932-40.
- Bouvin G. Diagnosis of herpesvirus infections of the central nervous system. *Herpes.* 2004;11(S11):48A-56A.
- Nagata E, Ohyashiki JH, Kasuga I, Minemura K, Abe K, Yamamoto K, et al. Detection and quantification of human herpesvirus 6 genome using bronchoalveolar lavage fluid in immunocompromised patients with interstitial pneumonia. *Int J Mol Med.* 2001;8:379-83.
- Földes-Papp Z, Egerer R, Birch-Hirschfeld E, Striebel HM, Demel U, Tilz GP, et al. Detection of multiple human herpes viruses by DNA microarray technology. *Mol Diagn.* 2004;8:1-9.

21. Stöcher M, Hölzl G, Stekel H, Berg J. Automated detection of five human herpes virus DNAs by a set of LightCycler PCRs complemented with a single multiple internal control. *J Clin Virol.* 2004;29:171-8.
22. Deback C, Agbalika F, Scieux C, Marcelin AG, Gautheret-Dejean A, Cherot J, et al. Detection of herpesvirus HHV-6, HHV-7 and HHV-8 in whole blood by real-time PCR using the new CMV, HHV-6, 7, 8 R-gene kit. *J Virol Methods.* 2008;149:285-91.
23. Kidd IM, Clark DA, Sabin CA, Andrew D, Hassan-Walker F, Sweny P, et al. Prospective study of human betaherpesviruses after renal transplantation: association of human herpesvirus 7 and cytomegalovirus co-infection with cytomegalovirus disease and increased rejection. *Transplantation.* 2000;69:2400-4.
24. Polo C, Perez JL, Mielnichuck A, Fedele CG, Niubo J, Tenorio A. Prevalence and patterns of polyomavirus excretion in immunocompetent adults and children. *Clin Microbiol Infect.* 2005;10:640-4.
25. Hirsch HH, Brennan DC, Drachenberg CB, Ginevri G, Gordon J, Limaye AP, et al. Polyomavirus-associated nephropathy in renal transplantation: interdisciplinary analyses and recommendations. *Transplantation.* 2005;79: 1277-86.
26. Ferreira-González A, Sidiqi R. BK virus in the transplant patient. *Clinical Microbiology Newsletter.* 2007;29:121-8.
27. Drachenberg CB, Hirsch HH, Papadimitriou JC, Gosert R, Wali RK, Muni-venkatappa R, et al. Polyomavirus BK versus JC replication and nephropathy in renal transplant recipients: a prospective evaluation. *Transplantation.* 2007;84:323-30.
28. Priftakis P, Bogdanovic G, Kokhaei P, Mellstedt H, Dalianis T. BK virus (BKV) quantification in urine samples of bone marrow transplanted patients is helpful for diagnosis of hemorrhagic cystitis, although wide individual variations exist. *J Clin Virol.* 2003;26:71-7.
29. Edvinsson, B. Molecular diagnosis of infection with *Toxoplasma gondii* in immunocompromised patients. Dissertation from Karolinska Institutet. 2006. Disponible en: <http://diss.kib.ki.se/2006/91-7140-877-0/>
30. Montoya JG. Laboratory diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection and toxoplasmosis. *J Infect Dis.* 2002;185 Suppl 1:S73-S82.
31. Bastien P. Molecular diagnosis of toxoplasmosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(Suppl 1):S205-S215.
32. Remington JS, Thulliez P, Montoya JG. Recent developments for diagnosis of toxoplasmosis. *J Clin Microbiol.* 2004;42:941-5.
33. Switaj K, Master A, Skrzypczak M, Zaborowski P. Recent trends in molecular diagnostics for *Toxoplasma gondii* infections. *Clin Microb Infect.* 2005; 11:170-6.
34. Beard CB. Molecular typing and epidemiological insights. En: Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis pneumonia.* Marcel Dekkers eds; 2005; p. 479-504.
35. Alvarez-Martínez MJ, Moreno A, Miró JM, Valls ME, Rivas PV, De Lazzari E, et al. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Spanish HIV-Infected Patients in the Combined Antiretroviral Therapy Era: Prevalence of DHPS Mutations and Prognostic Factors of Mortality. *Diag Microb Infect Dis.* 2008 (En prensa).
36. Alvarez-Martínez MJ, Miró JM, Valls ME, Moreno A, Rivas PV, Solé M, et al. Sensitivity and Specificity of Nested and Real-time PCR in the detection of *Pneumocystis jirovecii* in clinical specimens. *Diag Microb Infect Dis.* 2006;56:153-60.
37. Helweg-Larsen JJS, Jensen Benfield T, Svendsen UG, Lundgren JD, Lundgren B. Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. *J Clin Microbiol.* 1998;36:2068-72.
38. Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, Gill VJ, Silcott VA, Kogulan P, et al. Development and evaluation of Quantitative, Touch-Down Real-Time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol.* 2002;40:490-4.