NEUMONIA INTERSTICIAL PLASMOCELULAR

II. Investigación parasitológica del *Pneumocystis carinii*

Drs. TULIO PIZZI y MARIA DIAZ

Departamento de Parasitología y Cátedra del Prof. Amador Neghme. Universidad de Chile.

Desde el año 1951, después de las investigaciones de Vanek¹ y Vanek y Jirovec² se ha demostrado en cuadros de neumonías intersticiales plasmocelulares, la presencia de elementos parasitarios identificados como *Pneumocystis carinii*. Estas observaciones han sido confirmadas por numerosos autores de países europeos, especialmente de Alemania³⁻⁴⁻⁵, Checoslovaquia⁶⁻⁷, Francia⁸ e Italia⁹⁻¹⁰⁻¹¹⁻¹², pero existe aun incertidumbre respecto a la ubicación sistemática del *Pneumocystis carinii*. Para algunos investigadores se trataría de un hongo¹³⁻¹⁴; la mayoría lo consideran, sin embargo, como un protozoo, posiblemente incluido en la clase Sporozoa⁶⁻¹⁵. La relación patogénica entre el *Pneumocystis carinii* y las neumonías intersticiales plasmocelulares no está tampoco definitivamente aclarada, si bien existen suficientes argumentos para considerarlo con razonable probabilidad como el agente causal, único o asociado, de ciertas neumopatías de la infancia. No obstante estas discrepancias, no se duda de la existencia de una entidad con características clínicas, radiológicas, anatomopatológicas y epidemiológicas bien definidas en la cual es posible demostrar, con técnicas apropiadas, la existencia de *Pneumocystis carinii*. Este cuadro, que ha sido denominado por algunos autores "neumonía a *Pneumocystis*"⁶, o "neumocistosis"²⁸, se caracteriza por los siguientes hechos fundamentales:

a) Afecta casi exclusivamente a lactantes prematuros o distróficos durante el primer semestre de la vida.

b) Presenta un cuadro clínico con síntomas generales alarmantes e intensa disnea y cianosis, pero con escasa o nula sintomatología objetiva pulmonar.

c) Radiológicamente se observan sombras pulmonares difusas bilaterales combinadas con signos de enfisema.

d) En el estudio histológico de los pulmones se encuentra infiltración de los tabiques alveolares por células linfocitarias y abundantes plasmocitos. Los alvéolos

contienen un exudado de aspecto espumoso o "en panal de abeja", en cuyo espesor es posible identificar formas de *Pneumocystis carinii*.

e) La afección tiende a presentarse con caracteres epidémicos, de preferencia en determinados servicios hospitalarios. El encadenamiento de los casos sugiere la posibilidad de contagio interhumano.

Hasta el momento la afección había sido descrita casi exclusivamente en Europa, si bien recientemente parece haberse comprobado algunos casos aislados en Estados Unidos¹⁹. En nuestro país, desde el año 1955, se han observado en el Servicio del Prof. A. Ariztía del Hospital "Luis Calvo Mackenna" de Santiago, numerosos cuadros que reúnan todas las características clínicas radiológicas y anatomopatológicas descritas anteriormente. Al estudiar el material de autopsia de algunos de esos casos, hemos podido confirmar la presencia de *Pneumocystis carinii*¹⁷. En la presente comunicación damos a conocer estas observaciones que creemos pueden corresponder a los primeros casos de neumonía intersticial plasmocitaria por *Pneumocystis carinii* identificados en Sud América.

MATERIAL Y MÉTODO

Nuestro material corresponde a 10 niños fallecidos entre 1955 y el primer semestre de 1956. Siete eran prematuros y la totalidad presentaban una distrofia de mayor o menor intensidad. Todos fallecieron entre los 3 y 7 meses de edad, por un cuadro con características clínicas y radiológicas de neumonía intersticial. Nueve de los diez casos habían fallecido con anterioridad a la fecha en que se solicitó nuestra colaboración para el diagnóstico parasitológico y nos vimos obligados, por lo tanto, a efectuar la identificación en material de órganos fijados e incluidos semanas o meses antes. Sólo en una oportunidad dispusimos de material fresco, que nos permitió efectuar frotis de trozos de

pulmón. Mediante esta técnica y tiñendo con May-Grünwald-Giemsa, se facilita considerablemente el diagnóstico.

El parásito es relativamente difícil de identificar en los cortes histológicos por sus pequeñas dimensiones, su fragilidad y porque se encuentra en el interior del exudado alveolar que lo enmascara en parte. Con los procedimientos habituales de tinción de hematoxilina-eosina y de van Gieson se consigue una buena tinción nuclear de los parásitos, pero sus contornos citoplasmáticos son imprecisos, confundándose con la masa eosinofílica del exudado. Diversos autores han preconizado las tinciones argénticas, especialmente la de Río Hortega⁸ para obtener una mejor visualización de los contornos parasitarios. Además de estas técnicas nosotros hemos conseguido una buena diferenciación por el procedimiento de Maximow¹⁸.

RESULTADOS

En todos los casos incluidos en esta comunicación se observaron formas de *Pneumocystis carinii*, en considerable abundancia. En la Figura 1 hemos indicado el probable ciclo evolutivo del parásito según los diferentes elementos observados en nuestras preparaciones. Salvo pequeños detalles, es esencialmente igual al descrito por Vanek, Jirovec y Lukes⁶.

El parásito se encontraba exclusivamente en el interior del exudado espumoso que llenaba los alvéolos. No hemos encontrado formas intracelulares o tisulares, como las descritas por otros autores⁴⁻¹¹, salvo uno que otro elemento observado ocasionalmente en el interior de macrófagos alveolares. Fué posible reconocer tres tipos de elementos: a) formas aisladas uninucleadas, b) formas aisladas con más de un núcleo y c) figuras "en roseta" compuestas de 8 elementos contenidos en una envoltura común. Los describiremos separadamente: a) *Formas aisladas uninucleadas*: Son elementos pequeños, que miden de 1 a 3 micrones, redondeados, ovales, ligeramente irregulares o francamente alargados. (Figura 2, Microfotografías 1, 2 y 3). El citoplasma se tiñe de color azul pálido con los métodos de Maximow y de May-Grünwald-Giemsa. El núcleo, que es pequeño y denso, se colorea muy intensamente; está ubicado en posición central o algo desplazado hacia

Figura Nº 1: Esquema del probable ciclo evolutivo de *Pneumocystis carinii*. Ha sido compuesto dibujando elementos directamente de preparaciones microscópicas.
1 micrón = 3 milímetros.

la periferia. En general predominan las formas redondeadas de núcleo central (ver Figura 1, 3.er elemento de izquierda a derecha en la línea horizontal) o las ovales con núcleo casi marginal. Las formas francamente alargadas son más raras y se parecen toxoplasmas (ver Figura 1 último elemento de la derecha de la línea horizontal), pero son muy pequeñas —no sobrepasan los 3 micrones— carecen de gránulos citoplasmáticos o paranucleares y sus dos extremos son igualmente aguzados, caracteres que los diferencian de las formas libres de *Toxoplasma gondii*. Algunos autores⁶ han descrito alrededor de estas formas, así como en los elementos con más de un núcleo, una membrana de envoltura que se confunde en parte con el exudado y que aparecería especialmente nítida con las tinciones argénticas. Vanek, Jirovec y Lukes⁶ la denominan "es-

FIGURA Nº 2. — Microfotografía Nº 1: Corte histológico de pulmón teñido con Maximow. Ocular 10 x Periplan, Leitz. Objetivo 24:1, Apocromático, Leitz. Obsérvese el exudado espumoso o "en panal de abeja" en el alvéolo, en cuyo interior se distinguen formas aisladas uninucleadas de *Pneumocystis carinii*. Microfotografía Nº 2: Corte histológico de pulmón teñido con Maximow. Ocular 15 x Periplan, Leitz. Objetivo 90:1. Inmersión, Apocromático, Leitz. Se observan formas aisladas uninucleadas de *Pneumocystis carinii* en el interior del exudado espumoso alveolar. Microfotografía Nº 3: Corte histológico de pulmón teñido con Maximow. Ocular 15 x Periplan, Leitz. Objetivo 90:1, Inmersión, Apocromático, Leitz. Forma redondeada uninucleada de *P. carinii*. Microfotografía Nº 4: Frotis de pulmón teñido con May-Grünwald-Giemsa. Ocular 15 x Periplan, Leitz. Objetivo 90:1, Inmersión, Apocromático, Leitz. Figura "en roseta" de *P. carinii*, con 8 elementos. Microfotografía Nº 5: Frotis de pulmón teñido con May-Grünwald-Giemsa. Ocular 15 x Periplan, Leitz. Objetivo 90:1, Inmersión, Apocromático, Leitz. Figura "en roseta" de *P. carinii*. Microfotografía Nº 6: Frotis de pulmón teñido con May-Grünwald-Giemsa. Ocular 15 x Periplan, Leitz. Objetivo 90:1, Inmersión, Apocromático, Leitz. Figura "en roseta" de *P. carinii*, con elementos alargados.

fera mucóidea". Nosotros no nos pronunciamos respecto a la naturaleza de esta membrana, que creemos podría corresponder a un artefacto producida por la retracción del cuerpo del parásito dentro de la masa del exudado en el momento de la fijación.

b) *Formas aisladas con más de un núcleo*: Es frecuente observar elementos amiboides o redondeados, de tamaño algo mayor —alrededor de 4 micrones— con dos, cuatro, seis y hasta ocho núcleos, los que tienden a disponerse periféricamente (ver Figura 1, elementos 4º y 5º en la línea vertical). Estas figuras parecen corresponder a etapas previas de las imágenes "en roseta" de 8 elementos que describiremos a continuación.

c) *Figuras "en roseta"*: Constituyen los elementos más característicos y aparecen en forma especialmente nítida en los frotis teñidos con May-Grünwald-Giemsa. Miden aproximadamente 7 micrones de diámetro, son redondeados y poseen una delgada envoltura que toma muy débilmente la eosina. En su interior se observan ocho elementos dispuestos periféricamente y que corresponden en su estructura a las pequeñas formas aisladas, redondas u ovales, descritas anteriormente. En raras ocasiones se observan "rosetas", conteniendo formas alargadas. (Ver Figura 1, elementos 6º y 7º de la línea vertical y Figura 2, Microfotografías 4, 5 y 6).

DISCUSIÓN

Los elementos observados por nosotros reúnen todas las características morfológicas correspondientes a *Pneumocystis carinii* y confirman, en consecuencia, la existencia de este parásito en nuestro país. Es indudable que el hecho de haberse diagnosticado sólo ahora los primeros casos de neumonía intersticial plasmocelular por *P. carinii* en Chile, no significa que el cuadro no haya existido anteriormente, dadas las dificultades que se encuentran para el diagnóstico aún en material de autopsia y teniendo en cuenta el frecuente empleo en anatomía patológica de tinciones inadecuadas para la identificación del parásito. Esta situación también ha existido, al parecer, en otros países, así por ejemplo, Vanek, Jirovec y Lukes⁶, indican que en las microfotografías de un trabajo de Ammich³¹, publicado en Alemania en 1938, el *P. carinii* es

claramente visible. Por nuestra parte, observando una lámina de neumonía intersticial atribuida a toxoplasma, en la página 204 del Atlas de Patología Tropical de Ash y Spitz³⁰ nos parece, hasta donde puede juzgarse por el examen de una microfotografía, que los elementos observados en el exudado alveolar podrían corresponder al *P. carinii*.

Desgraciadamente, los métodos de diagnóstico parasitológico durante la vida de los pacientes son aún muy inadecuados. Las tentativas para encontrar el parásito en la expectoración o en material obtenido por aspiración bronquial han fracasado sistemáticamente y lo mismo ha ocurrido con los cultivos y las inoculaciones experimentales. Algunos autores italianos^{10,11} han preconizado las punciones pulmonares, que en su opinión serían inocuas y permitirían el diagnóstico en un alto porcentaje de casos. Es probable que las reacciones serológicas de fijación del complemento puedan constituir en el futuro una ayuda valiosa en el diagnóstico²⁹.

Como hemos indicado anteriormente, la ubicación taxonómica de este parásito es incierta. La confusión respecto a la naturaleza exacta del *P. carinii* data incluso desde su descubrimiento. En efecto, Chagas, en 1909²⁰, describió por primera vez el parásito en cuyes inoculados con *Trypanosoma cruzi*, pero lo interpretó erróneamente como fases del ciclo evolutivo de ese trypanosoma. Más tarde, en 1910, Carini²¹ lo observó en ratas inoculadas con *Trypanosoma lewisi* y Vianna, en 1911^{22,23}, en cuyes infectados con diversas especies de trypanosomas, considerando también, ambos investigadores, como formas evolutivas de dichos flagelados. Chagas, en 1911,²⁴ lo observó en el pulmón de un paciente muerto de trypanosomiasis americana y Walker²⁵, al año siguiente, comprobó su presencia en cuyes infectados con *Trypanosoma evansi*. Delanoe y Delanoe²⁶, en 1912, fueron los primeros en diferenciarlo como una nueva especie, denominándolo *Pneumocystis carinii* y demostrando su independencia del ciclo evolutivo de los trypanosomas. Posteriormente, el *Pneumocystis* fué observado por diversos investigadores en distintas especies animales (véase revisión en ref. 6), incluyendo ratas, ratones, conejos, cobayos, monos y ovejas, sin causar aparentemente ninguna alteración patológica en estos mesoneros. En 1942, van der Meer y Brug²⁷, señalaron la presen-

cia de *Pneumocystis carinii* en frotis de pulmón de un niño de 3 meses que presentaba una cardiopatía congénita. Sólo en los años 1951 y 1952 Vanek¹ y Vanek y Jirovec² relacionaron el parásito con cuadros de neumonía intersticial plasmocelular, considerándolo como el agente específico de dicha afección. Wenyon¹⁵ consideró al *Pneumocystis* como un protozoo de la clase *Sporozoa* y del género *Klossiella*. Vanek, Jirovec y Lukes⁶ lo incluyen también dentro de los esporozoos en el grupo de los *Haplosporidia*. Csillag y Brandstein¹³ y Giese¹⁴ han creído, por otra parte, que las formaciones descritas como *Pneumocystis*, corresponderían en realidad a hongos. Sin embargo, sus observaciones han sido adecuadamente rebatidas por Westphal³ y por Jirovec²⁸ quienes al parecer demostraron que el pretendido aislamiento de hongos se debía a malas interpretaciones o a contaminación del material en estudio. El aspecto morfológico (formas ameboides, elementos alargados semejantes a esporozoitos) y las propiedades tintoriales del *Pneumocystis* (no toma la tinción de Gram) concuerdan más, a nuestro juicio, con las características de los protozoos que de los hongos.

La relación patogénica entre el *Pneumocystis carinii* y las neumonías intersticiales plasmocitarias ha sido también discutida. Desgraciadamente la falta de estudios experimentales, motivada por la imposibilidad actual de cultivar el parásito y el hecho de que aún no se haya encontrado un animal adecuado para hacer inoculaciones en el laboratorio, impiden una afirmación categórica en este sentido. Sin embargo, la ausencia de otro agente patógeno demostrable en estos casos y la presencia constante del *Pneumocystis* en un cuadro de características clínicas y anatomopatológicas bien definidas hacen suponer con mucha probabilidad de que sea la causa determinante de dichas alteraciones. Es sugestivo el hecho de encontrarse en estos casos, reacciones serológicas positivas al parecer con un alto margen de especificidad²⁹. Es imposible descartar, sin embargo, la posibilidad de asociación con un virus filtrable, si bien las tentativas de aislamiento han fracasado hasta el momento y los caracteres histopatológicos son diferentes a los observados habitualmente en cuadros pulmonares producidos por virus.

No hay duda, no obstante, que para la implantación del *Pneumocystis carinii* en el pulmón, se requiere de un terreno debilitado. Ignoramos en el momento actual cuales podrían ser los factores inmunobiológicos que intervendrían favoreciendo la infección. Las tentativas para infectar animales carenciados han fracasado³² y por nuestra parte, no hemos conseguido obtener inoculaciones positivas en ratones utilizando dosis altas de cortisona. Es posible que pueda existir en estos casos una deficiencia en el sistema properdina, cuya importancia en la inmunidad natural ha sido señalada por Pillemer y colaboradores³³. Próximamente iniciaremos investigaciones en este sentido. En todo caso, la adecuada preocupación por mejorar el estado general de los prematuros y distróficos debería ser un factor importante en el tratamiento y prevención de la enfermedad.

RESUMEN

En material de autopsia de 10 lactantes prematuros o distróficos fallecidos por cuadros de neumonía intersticial plasmocitaria se demostró la existencia del parásito *Pneumocystis carinii*. El diagnóstico parasitológico se efectuó en cortes histológicos teñidos con la técnica de Maximow. En uno de los casos, en que se dispuso de material fresco, el diagnóstico se confirmó, además, mediante la observación de frotis teñidos con May-Grünwald-Giemsa. Este último procedimiento es el de elección ya que permite observar con facilidad formas típicas "en roseta" de ocho elementos que son patognomónicas. Estas observaciones demuestran por primera vez, en Chile, la existencia de cuadros de neumonía intersticial plasmocitaria con presencia de *Pneumocystis carinii*.

Se describen los diversos aspectos morfológicos del parásito y se discute brevemente su ubicación taxonómica y su relación patogénica con los cuadros de neumonía intersticial plasmocitaria.

SUMMARY

PARASITOLOGICAL INVESTIGATION OF PNEUMOCYSTIS CARINII IN INTERSTITIAL PLASMA CELL PNEUMONIA.

The parasite *Pneumocystis carinii* was found in the lungs of 10 immature or dystrophic infants who died with a picture

of interstitial plasma cell pneumonia. The parasitological diagnosis was made in tissue sections stained with the Maximow's technic. In one case, in which fresh material was available, the diagnosis was also confirmed by the observation of typical "rosette-like formations" with 8 elements, using impression smears stained with May-Grünwald-Giemsa. These are the first cases of interstitial plasma cell pneumonia due to *Pneumocystis carinii* reported in Chile.

The morphological aspects of the parasite, its pathogenicity and taxonomy are briefly discussed.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.—VANEK, J. — "Atypická ("intersticiální") pneumonie dětí, vyvolaná *Pneumocystis carinii*". Casopis Lékarů Českých. 90:1121, 1951. Consultado el resumen en Trop. Dis. Bull. 49:194, 1952.
- 2.—VANEK, J. y JIROVEC, O. — "Parasitäre Pneumonie "intersticielle" Plasmazellenpneumonie der Frühgeborenen, verursacht durch *Pneumocystis carinii*". Zent. f. Bakt. 1. Abt. Orig. 158:120, 1952. Consultado el resumen en Trop. Dis. Bull. 49:908, 1952.
- 3.—WESTPHAL, A. — "Zur diagnose der *Pneumocystis carinii*. Infection des Menschen". Zeitschr. f. Tropenmed. & Parasitol. 4:549, 1953.
- 4.—HERZBERG, K.; HERZBERG-KREMER, H. y MAY, G. — "Ueber *Pneumocystis carinii* bei interstiellen Pneumonien. *Pneumocystis carinii* in Interstitial Pneumonia". Klin. Woch. 30:822, 1952.
- 5.—HAMPERI, H. — "Zur Frage des Parasitennachweises bei der interstiellen plasmocellulären Pneumonie". Klin. Woch. 30:820, 1952.
- 6.—VANEK, J.; JIROVEC, O. y LUKES, J. — "Interstitial Plasma Cell Pneumonia in Infants". Ann. Paediatrici. 180:1, 1953.
- 7.—PAVLICA, J. — "Pneumonia pneumocystica u. Sletého dítěte". Casopis Lékarů Českých (Praga). 94:962, 1955. Consultado el resumen en Trop. Dis. Bull. 53:373, 1956.
- 8.—LE TAN VINH. — "La Pneumonie a *Pneumocystis*. Ses rapports avec la pneumonie interstielle a plasmocytes". Arch. Franc. Péd. 11:1035, 1954.
- 9.—TORRICELLI, C. y MALANDRA, B. — "Prime osservazione in Italia della *Pneumocystis carinii* nella polmonite interstiziale plasmocellulare". Giorn. di Malattie Infettive e Parassit. 7:3, 1955.
- 10.—TORRICELLI, C. — "Attualità sulla polmonite interstiziale plasmocellulare". Il Lattante. 26:214, 1955.
- 11.—BORI, D. V. — "Osservazione sulla eziologia della polmonite interstiziale del lattante". Il Lattante. 26:199, 1955.
- 12.—BRUSA, P. — "Considerazione sulla polmonite interstiziale dell'immatura". Il Lattante. 26:193, 1955.
- 13.—SHILLAG, A. y BRANDSTEIN, L. — "The role of a *Blastomyces* in the etiology of Interstitial Plasmocytic Pneumonia of Premature Infant". Acta Microbiologica. 2:179, 1954. Consultado el resumen en: Trop. Dis. Bull. 52:578, 1955.
- 14.—GIESE, W. — Citado por Westphal (3).
- 15.—WENYON, C. M. — "Protozoology". Bailliere, Tindal and Cox, London. Vol. 2, pág. 1079, 1926.
- 16.—HAMPERI, H. — "Pneumocystis infection and Cytomegaly of the lungs in the Newborn and Adult". Am. J. Path. 32:1, 1956. Consultado el resumen en: Trop. Dis. Bull. 53:668, 1956.
- 17.—PIZZI, T. — "Comprobación de *Pneumocystis carinii* en casos de neumonia intersticial plasmocitaria". Bol. Chileno Parasit. 11:96, 1956.
- 18.—JILLIE, R. D. — "Histopathologic technic". The Blakiston Company, Philadelphia. 1948.
- 19.—LANGERON, M. — "Précis de Microscopie". 7^a ed. Masson et Cie. Paris, 1949.
- 20.—CHAGAS, C. — "Nova tripanozomíaze humana". Mem. Inst. O. Cruz. 1:159, 1909.
- 21.—CARINI, A. — "Formas de esquizogonia do *Trypanosoma lewisi*". Soc. Med. e Cir. S. Paulo (Agosto 16, 1910). Citado por Wenyon (15).
- 22.—VIANNA, G. — "Algunas notas sobre a cyclo evolutivo de *Trypanosoma gambiense*". Brazil-Medico. 25:61, 1911.
- 23.—VIANNA, G. — "Algunas fases de evolução dos trypanosomas equíneo e congolense". Brazil-Medico. 25:103, 1911.
- 24.—CHAGAS, C. — "Nova entidade morbida do homem. Resumo geral de estudos etiologicos e clinicos". Mem. Inst. O. Cruz. 3:219, 1911.
- 25.—WALKER, E. L. — Citado por Vanek, Jirovec y Lukes (6).
- 26.—DELANOE, M. y DELANOE, P. — "Sur les rapports des Kystes de Carini du poulmon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*". C. R. Acad. Sci. 155:658, 1912.
- 27.—VAN DER MEER, G. y BRUG, S. L. — "Infection a pneumocystis chez l'homme et chez les animaux. *Pneumocystis* Infection in man and in animals". Ann. Soc. Belge de Méd. Trop. 22:301, 1942. Consultado el resumen en: Trop. Dis. Bull. 41:152, 1944.
- 28.—JIROVEC, O. — "Nové poznatky o pneumocystose kojenu". Ceskoslov. Hyg. Epidemiol. Mikrobiol. Imunol. 4:389, 1955. Consultado el resumen en: Trop. Dis. Bull. 53:668, 1956.
- 29.—REISETBAUER, E. y MORITSCH, H. — "Epidemiologische und serologische Untersuchungen bei interstiellen plasmocellulären Frühgeburtspneumonie". Monatsch. f. Kinderheilk. 104:41, 1956.
- 30.—ASH, J. E. y SPITZ, S. — "Pathology of Tropical Diseases". W. B. Saunders Company. 1944.
- 31.—AMMICH, O. — "Ueber die nichtsyphilitische interstielle Pneumonie des ersten Kindesalters". Virchow Arch. f. path. Anat. 302:539, 1938.
- 32.—BARTA, K. — "Pokná problematika pneumocystových pneumonií". Casopis Lékarů Českých. 94:5, 1956. Consultado el resumen en: Trop. Dis. Bull. 52:583, 1955.
- 33.—FILLEMER, L.; BLUM, L.; LEPOW, I. H.; ROSS, O. A.; TODD, W. y WARDLAW, A. C. — "The Properdin System and Immunity. I. Demonstration and Isolation of a new Serum Protein, Properdin, and its role in immune Phenomena". Science. 120:279, 1954.