

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS PNEUMOLÓGICAS  
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**A COLONIZAÇÃO POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECHII* EM PACIENTES  
COM FIBROSE CÍSTICA**

**MARCO AURÉLIO PEDERIVA**

**Orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla**

Porto Alegre, 2009

**P371c** Pederiva, Marco Aurélio

A colonização por *Pneumocystis jirovecii* em pacientes com fibrose  
cística / Marco Aurélio Pederiva : orient. João Carlos Prolla. – 2010.

57 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Pneumológicas. Porto Alegre, BR-RS, 2010.

1. Fibrose cística 2. *Pneumocystis jirovecii* 3. Infecções por  
pneumocystis I. Prolla, João Carlos II. Título.

NLM: WI 820

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

Aos meus pais Gualdino (*in memoriam*)

e

Nelly

## **Agradecimentos:**

Desejo expressar meus agradecimentos a todos os que colaboraram para a execução deste trabalho e, em especial,

- ao Prof. João Carlos Prolla, pela orientação segura e pelo exemplo como professor;
  
- ao Prof. Enrique J. Calderón, do Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilha, Espanha, pela colaboração acadêmica que permitiu o desenvolvimento da linha de pesquisa sobre a epidemiologia molecular do *P. jirovecii* no Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
  
- aos colegas do grupo de estudos sobre *Pneumocystis* do Hospital de Clínicas de Porto Alegre - Gustavo Wissmann Neto, Ada Regina Diehl, Rosicler Brackmann e André Aquino - que colaboraram na coleta de amostras e nas técnicas de detecção e genotipagem do *P. jirovecii*.
  
- aos Professores Sandra Wajnberg e Luiz Antônio Nasi pelas recomendações no início e apoio durante os trabalhos.

## SUMÁRIO

Glossário / VII

Resumo/Abstract / VIII

### **1- Introdução / 1**

1.1 - A Fibrose Cística / 1

1.1.1 - A doença hereditária denominada Fibrose Cística / 1

1.1.2 - Manifestações clínicas da fibrose cística / 2

a) Manifestações no sistema respiratório / 2

b) Manifestações em outros órgãos e sistemas / 4

1.1.3 - Microorganismos associados à fibrose cística / 5

1.1.4 - O diagnóstico da fibrose cística / 6

1.2 - O fungo *Pneumocystis jirovecii* / 8

1.2.1 - O fungo *P. jirovecii* e a pneumonia por *Pneumocystis* (PcP) / 8

1.2.2 - A colonização por *P. jirovecii* / 12

a) A colonização por *P. jirovecii* em pacientes infectados pelo vírus HIV, imunossuprimidos por outras causas, gestantes e profissionais de saúde / 14

b) A colonização por *P. jirovecii* nas doenças pulmonares crônicas / 16

1.3 – Referências bibliográficas / 19

### **2- Justificativa do estudo / 31**

### **3- Objetivos / 32**

**4 - Artigo “*Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients” a ser encaminhado ao *Journal of Clinical Microbiology* / 33**

**5- Conclusões / 45**

**6- Considerações finais / 45**

## GLOSSÁRIO

- AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
- CTFR – Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
- CVF – Capacidade Vital Forçada
- DIPS – Diidropteroato Sintetase
- DPN – Diferença de Potencial Nasal
- DPOC – Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
- FC – Fibrose Cística
- GOLD – Global Health Initiative on Obstructive Lung Disease
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-8 – Interleucina 8
- INF- $\gamma$  – Interferon Gama
- mtLSUrRNA – Subunidade Maior do RNA Ribossômico Mitocondrial
- P. aeruginosa* – *Pseudomonas aeruginosa*
- P. jirovecii* – *Pneumocystis jirovecii*
- PcP – Pneumonia por *Pneumocystis*
- PCR – Reação em Cadeia pela Polimerase
- SMSI – Síndrome da Morte Súbita Infantil
- TNF- $\alpha$  – Fator de Necrose Tumora Alfa
- VEF1 – Volume Expiratório Forçado em 1 minuto

## RESUMO

### **Introdução:**

A Fibrose Cística é uma doença autossômica recessiva associada a infecções respiratórias crônicas e que leva a considerável morbidade e mortalidade. O *Pneumocystis jirovecii* é um fungo que causa pneumonia em imunossuprimidos e cuja colonização em várias doenças pulmonares mostrou ser um fenômeno clínico importante.

### **Objetivo:**

Avaliar a taxa de colonização e a distribuição dos genótipos do *P. jirovecii* entre pacientes com Fibrose Cística.

### **Material e métodos:**

Foram estudados 34 pacientes com Fibrose Cística que realizaram broncoscopia no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre março de 2004 e agosto de 2007. A detecção do *P. jirovecii* no lavado broncoalveolar (LBA) foi feita através de *nested-PCR* com a utilização dos *primers* pAZ 102-E e pAZ 102-H no primeiro *round* e pAZ 102-X e pAZ 102-Y no segundo. A caracterização do gene da Diidropteroato sintetase (DIPS) e da Grande Subunidade do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA) foi realizada através do uso de enzimas de restrição e de seqüenciamento genético, respectivamente. Os dados clínico-demográficos dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos e analisados quanto à presença de colonização.

### **Resultados:**

A colonização pelo *P. jirovecii* foi detectada em 38,2% (13/34) dos pacientes com Fibrose Cística. Nenhum dado clínico-demográfico pôde ser associado significativamente ( $p < 0,05$ ) à presença da colonização nos 34 pacientes estudados. Na caracterização genotípica da DIPS, o genótipo selvagem - ausência de mutações nas posições 55 e 57 - foi observado em todos os casos.



Na tipagem da mtLSUrRNA, o genótipo 1 (85C/248C) foi observado em 41,6% dos casos, o genótipo 2 (85A/248C) em 16,6% , o genótipo 3 (85T/248C) em 25% e o genótipo misto 1 e 3 em 16,6% dos casos.

### **Conclusão:**

Foi observada uma alta taxa (38,2%) de colonização pelo *P. jirovecii* entre os 34 pacientes. Este achado sugere que os portadores de Fibrose Cística podem constituir um reservatório significativo do fungo, uma importante fonte de infecção do microorganismo a outros pacientes. Quanto a uma possível associação entre a colonização pelo *P. jirovecii* e o curso clínico da doença, faz-se necessário estudar um número maior de pacientes. Os resultados da distribuição genotípica da mtLSUrRNA do *P. jirovecii* confirmam a predominância dos subtipos 1 e 3 entre os portadores da Fibrose Cística.

## **ABSTRACT**

### **Introduction:**

Cystic Fibrosis is an autosomal recessive disorder associated to chronic respiratory infections, which leads to considerable morbidity and mortality. *Pneumocystis jirovecii* is a fungus that causes pneumonia in immunosuppressed patients and its colonization rate on several pulmonary diseases is a significant clinical phenomenon.

### **Objective:**

Assess the rate of *P. jirovecii* genotypes colonization and distribution in patients with Cystic Fibrosis.

### **Material and methods:**

34 patients with Cystic Fibrosis who have undergone bronchoscopy at

Hospital de Clínicas de Porto Alegre between March 2004 and August 2007 were evaluated. Detection of *P. jirovecii* by analysis of bronchoalveolar lavage (BAL) was carried out with *nested-PCR*, with the use of primers pAZ 102-E and pAZ 102-H in the first round, and pAZ 102-X and pAZ 102-Y in the second round. Characterization of the dihydropteroate synthase (DHPS) gene and the mitochondrial Large Subunit ribosomal RNA (mtLSUrRNA) was performed with the use of restriction enzymes and genetic sequencing, respectively. The clinical and demographic data of patients was obtained from their medical records and analyzed for the presence of colonization.

### **Results:**

*P. jirovecii* colonization was detected in 38,2% (13/34) of the patients with Cystic Fibrosis. No clinical-demographic data was significantly associated ( $p < 0,05$ ) to the presence of colonization in the 34 studied patients. Genotypical characterization of DHPS, the wild genotype – absence of mutations in the 55 and 57 positions – was observed in all the cases. In mtLSUrRNA typing genotype 1 (85C/248C) was observed in 41,6% of the cases, genotype 2 (85A/248C) in 16,6%, genotype 3 (85T/248C) in 25% and mixed genotype 1 and 3 in 16,6% of the cases.

### **Conclusion:**

A high rate (38,2%) of *P. jirovecii* colonization was found in the 34 patients. This finding suggests that Cystic Fibrosis patients may constitute a major reservoir and source of infection for other patients. As for a possible association between *P. jirovecii* colonization and the clinical evolution of the disease, further research with a greater number of subjects is needed. The results of *P. jirovecii* mtLSUrRNA genotypical distribution confirm the predominance of subtypes 1 and 3 among Cystic Fibrosis patients.

# 1 – INTRODUÇÃO

## 1.1 - A FIBROSE CÍSTICA

### 1.1.1 - A doença hereditária denominada Fibrose Cística

A fibrose cística (FC) é o distúrbio hereditário mais comumente fatal em caucasianos nos Estados Unidos. É uma doença autossômica recessiva que afeta cerca de 1 em 3500 caucasianos na América do Norte e Europa, sendo que 94% dos pacientes dos Estados Unidos são caucasianos. A prevalência é de 1 em 17.000 entre os afro-americanos (1,2). No Brasil, estudo feito por Raskin e cols em cinco estados do sul e sudeste do Brasil, a prevalência oscila entre 1 em 1587 (Rio Grande do Sul) até 1 em 32258 (São Paulo), com média de 1:7576 habitantes (3).

A doença foi descrita por Andersen (4), em 1938, como “Fibrose Cística do Pâncreas”, com um prognóstico geralmente fatal no primeiro ano de vida naquela época. Os primeiros sinais e sintomas tipicamente ocorrem na infância, mas cerca de 5% dos pacientes são diagnosticados quando adultos. Ao longo dos anos, o avanço no conhecimento sobre a fisiopatologia e as formas de tratamento tornou maior a sobrevida destes pacientes (5). Os dados norte-americanos atuais mostram que a sobrevida média é de 36,5 anos, sendo que 43% das pessoas com FC têm mais de 18 anos (1).

A doença é causada por mutações num gene localizado no braço longo do cromossomo sete, na região 7q31 (6). Este gene é responsável pela codificação de uma proteína com 1480 aminoácidos denominada regulador da condutância iônica transmembrana da FC. (CFTR, de *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (7).

A mutação conhecida como  $\Delta F508$  contribui com cerca de 70% dos casos de FC. Ela é caracterizada por uma deleção de três pares de bases que resulta na ausência de fenilalanina na posição aminoácido 508 do gene CFTR. Já foram

descritas mais de 1400 mutações no gene que codifica a proteína reguladora da condutância transmembrana da FC, muitas delas incomuns. Pelo menos 230 tipos de mutações estão associadas a anormalidades clínicas (8).

### **1.1.2 - Manifestações clínicas da Fibrose Cística**

A maioria dos pacientes com FC apresenta na infância os primeiros sinais e sintomas da doença. Aproximadamente 5% dos pacientes têm obstrução gastrointestinal, o chamado íleo meconial, nas primeiras 24 h de vida (9). Outras apresentações comuns nos dois primeiros anos incluem sintomas respiratórios como tosse e/ou infiltrados pulmonares recorrentes. Devido à variedade de alterações vistas na estrutura e na função da proteína CFTR, a FC pode se apresentar com diversas manifestações pulmonares e não pulmonares (10).

#### **a) Manifestações no sistema respiratório**

A tosse é geralmente a manifestação mais precoce. No início é intermitente e assemelha-se a uma doença respiratória aguda. Algumas vezes é acompanhada por sibilos, particularmente em crianças jovens e lactentes. Os episódios de tosse tendem a persistir mais do que o esperado para uma doença respiratória aguda e passam a ocorrer com maior frequência. Com a progressão da doença, o escarro torna-se viscoso e purulento, inclusive de cor esverdeada (11).

Os achados físicos dependem do estágio da doença. Inicialmente os estertores crepitantes são intermitentes e ocorrem nas exacerbações. O murmúrio vesicular pode estar diminuído devido à hiperinsuflação pulmonar. Num quadro avançado, os roncosp e os crepitantes são comuns e contínuos e o baqueteamento digital é visto nos pacientes. A osteoartropatia pulmonar hipertrófica pode ocorrer em até 15% dos casos, especialmente adolescentes e adultos.

Na radiografia de tórax, a hiperinsuflação pode ser o primeiro achado, seguida por infiltrado peribrônquico. A impaction de muco e as alterações consistentes com bronquiectasias são observadas com a progressão da FC. O lobo superior direito é frequentemente o primeiro e o mais severamente envolvido. A

tomografia computadorizada de tórax de alta resolução revela alterações precoces de bronquiectasias que podem ser vistas antes da radiologia convencional. As alterações de hipertensão pulmonar tornam-se evidentes na doença avançada.

A primeira alteração na função pulmonar é a obstrução das vias aéreas, particularmente das pequenas. A espirometria mostra taxas de fluxo aéreo reduzidas, incluindo o volume expiratório forçado em 1 minuto (VEF1) e a relação VEF1/CVF (capacidade vital forçada). É comum a ocorrência de alçapamento aéreo (altas taxas de volume residual em relação à capacidade pulmonar total) e redução na capacidade de difusão pulmonar. A presença de hiperreatividade da via aérea é comum. A  $PO_2$  arterial tende a diminuir com o tempo como resultado de distúrbio na ventilação-perfusão. Somente no estágio avançado da doença ocorre o aumento da  $PCO_2$  e a acidose respiratória crônica. Os pacientes com um VEF1 menor que 30% do previsto, uma  $PO_2$  arterial menor que 55 mmHg, ou uma  $PCO_2$  arterial maior que 50 mmHg têm taxas de mortalidade maior que 50%. O curso da FC e a resposta ao tratamento podem ser monitorados por medidas seriadas de espirometria, volumes pulmonares e oxigenação (12).

O pneumotórax é uma complicação bem conhecida (>10% dos pacientes) e a sua incidência aumenta com a idade dos pacientes. Ele é geralmente associado com dor torácica, dispnéia e hemoptise, ainda que possa ser um achado ocasional na radiografia. A taxa de recorrência é alta e uma esclerose pleural pode ser necessária para prevenir as recorrências.

A hemoptise torna-se comum com o surgimento de bronquiectasias. Escarro com estrias de sangue é o achado mais freqüente. Hemoptise maciça ocorre em aproximadamente 1% dos pacientes e é geralmente associada com a exacerbação de uma infecção respiratória crônica.

Na doença avançada, a hipoxemia não tratada e a perda progressiva da função pulmonar podem produzir hipertensão arterial pulmonar e insuficiência ventricular direita. A insuficiência respiratória torna-se progressivamente mais difícil de tratar. Devido à dificuldade na eliminação das secreções, os pacientes freqüentemente respondem pouco à ventilação mecânica (13).

A doença respiratória é responsável pela maior parte da morbidade e mortalidade na FC. A morte normalmente ocorre de complicações pulmonares

(pneumonia, pneumotórax ou hemoptise) ou como resultado de insuficiência respiratória crônica terminal e *cor pulmonale* (14).

O epitélio da via aérea superior também é afetado e rinite crônica é comum. Os seios da face são quase universalmente envolvidos. Sinusite crônica é comum na infância e leva à obstrução nasal e rinorréia. A ocorrência de pólipos nasais chega a 25% e frequentemente requer tratamento com corticóides e/ou cirurgia (11).

## **b) Manifestações em outros órgãos e sistemas**

A síndrome do íleo meconial em recém-nascidos apresenta-se com distensão abdominal, constipação e vômitos. O raio-X de abdômen pode ser diagnóstico, com níveis hidro-aéreos no intestino delgado, uma aparência granular indicativa de mecônio e um cólon pequeno. Entre crianças e adultos jovens, 3% apresentam a Síndrome da Obstrução Intestinal Distal, equivalente ao íleo meconial. Esta se caracteriza por dor no quadrante inferior direito, anorexia, vômitos ocasionais e massa palpável, sendo por vezes confundida com a apendicite aguda, cuja frequência não é aumentada na FC.

A insuficiência pancreática exócrina ocorre em >90% dos pacientes com FC. Os ductos pancreáticos são obstruídos por muco espesso, impedindo o suco pancreático de atingir o duodeno. A secreção insuficiente de enzimas pancreáticas determina a má absorção de gorduras e proteínas, com fezes mal cheirosas (15).

A desnutrição e retardo no crescimento acarretam alterações na função pulmonar e interferem na sobrevida do paciente (16,17).

As células beta pancreáticas são inicialmente poupadas, mas a sua função diminui com a idade (18). Esta disfunção, acrescida da resistência à insulina induzida pela inflamação, causa hiperglicemia e necessidade de reposição de insulina em mais de 15% dos pacientes com mais de 35 anos. O estado clínico e a função pulmonar deterioram-se nos anos precedentes ao diagnóstico da diabetes e levam à piora na sobrevida (19).

Aproximadamente 20 a 25% dos pacientes com FC desenvolvem doença hepática, mas apenas 6 a 8% evoluem para cirrose. A severidade varia

amplamente, com anormalidades limitadas a uma elevação da fosfatase alcalina em muitos pacientes. Nos casos severos, surgem hepatoesplenomegalia, icterícia, ascite e edema. Hematêmese por varizes esofágicas é uma complicação grave que pode requerer endoscopia e esclerose dos vasos afetados. A congestão hepática devido ao *cor pulmonale* pode também causar doença hepática. A insuficiência hepática pode requerer transplante (20).

Outras manifestações são: a infertilidade que ocorre em até 95% dos homens e 20% das mulheres e a osteoporose em 38-77% dos adultos (21,22).

### **1.1.3 - Microorganismos associados à Fibrose Cística**

A *Pseudomonas aeruginosa* é o patógeno mais frequentemente isolado nas infecções respiratórias em adultos com FC (23). A aquisição e a persistência da *P. aeruginosa* no trato respiratório inferior de pacientes com FC estão associadas com maior morbidade e mortalidade (24). Inicialmente as cepas isoladas têm a aparência não-mucóide e são multissensíveis aos antibióticos (25). Essas cepas de infecção recente podem ser erradicadas através de tratamento antibiótico (26). Entretanto, com o tempo, desenvolvem-se cepas de *P. aeruginosa* com fenótipo mucóide que se associam com declínio mais acelerado na função pulmonar e maior risco de morte. A infecção crônica da *P. aeruginosa* de fenótipo mucóide é usualmente impossível de erradicar e a meta do tratamento antibiótico passa a ser, então, a diminuição do número de bactérias (27). A redução da carga de bactérias leva à diminuição da inflamação na via aérea e dos sintomas sistêmicos associados. Embora a *P. aeruginosa* é ocasionalmente identificada em pacientes com outras doenças pulmonares, sua presença no escarro deveria imediatamente alertar o médico para a possibilidade de FC.

Geralmente, o *Staphylococcus aureus* é a primeira bactéria cultivada na secreção respiratória em crianças com FC, permanecendo como um importante patógeno no adulto (28).

A *Burkholderia cepacia* é mais um agente patogênico observado na FC e seu risco de disseminação de um paciente para outro determina um controle de infecção estrito nos hospitais. O *Haemophilus influenzae*, por sua vez, é uma

bactéria frequentemente encontrada nas crianças.

Outros microorganismos isolados, muitas vezes causando infecção concomitante, são *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia gladioli* e ocasionalmente formas mucóides de *Proteus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella*. Até 50% dos pacientes com FC têm *Aspergillus fumigatus* em seu escarro e até 10% destes pacientes exibem a síndrome de aspergilose broncopulmonar alérgica. Cerca de 10 a 20% dos pacientes adultos com FC têm cultura de escarro positiva para micobactérias atípicas e em alguns pacientes estes microorganismos causam quadros de micobacteriose.

Os pacientes com FC devem ser avaliados rotineiramente quanto ao antibiograma do escarro. A infecção crônica é associada com uma intensa resposta inflamatória com predomínio de neutrófilos, ocorrendo o remodelamento da via aérea, com hipertrofia das glândulas submucosas e aumento da secreção de muco (29,30).

#### **1.1.4 - O diagnóstico da Fibrose Cística**

A ocorrência de íleo meconial, insuficiência pancreática, manifestações pulmonares típicas ou história de familiar próximo com FC deveriam levar a uma suspeita da doença. O diagnóstico pode ser feito quando uma pessoa tem uma ou mais destas manifestações de FC, combinada com evidência de disfunção da CTRF (31). A prova da disfunção da CTRF geralmente é obtida com um teste positivo de cloreto no suor ou, menos frequentemente, através da medida da diferença de potencial através do epitélio nasal. A confirmação também pode ser obtida se a análise do DNA identificar mutações causadoras da doença em ambos os alelos (32).

O teste do suor através da iontoforese pela pilocarpina é o padrão áureo para a confirmação do diagnóstico da FC e deveria ser realizado num laboratório experimentado (33). A amostra é analisada para concentração de cloreto e sódio. Outros métodos, como a medida de condutividade (medida não-seletiva de íons) e a medida da osmolaridade, podem ser utilizados como testes de triagem. Neste



caso, valores alterados ou duvidosos devem ser confirmados por um teste quantitativo do suor (34).

O cloreto fornece a melhor discriminação diagnóstica. A medida do sódio é útil para o controle de qualidade. Uma concentração de cloreto maior que 60 mmol/L, quando acompanhada pelas manifestações clínicas maiores, é suficiente para o diagnóstico da FC (35). O teste do suor deve sempre ser repetido para confirmação. Somente 2% dos pacientes com FC têm um nível normal de  $Cl^-$  no suor (36).

Se o diagnóstico de FC é fortemente suspeito pelo contexto clínico ou história familiar compatível, a identificação de mutações no gene da CFTR pode proporcionar uma evidência definitiva da doença (37). Entretanto, o achado de uma ou de nenhuma mutação no gene da CRTR não exclui o diagnóstico de FC (38). Já foram relatados pacientes com FC não clássica sem evidência de mutações nos genes da CFTR (39).

A existência de genótipos complexos, de fatores modificadores e de mutações atenuadoras exige que o diagnóstico de FC seja feito com a contribuição dos achados clínicos. A análise de mutações para confirmar o diagnóstico de FC tem alta especificidade, porém baixa sensibilidade. A baixa sensibilidade decorre da existência de um grande número de mutações associadas à FC (mais de 1.400) e do fato de que geralmente os painéis comerciais disponíveis estudam somente uma minoria dessas mutações. Poucos centros de referência podem disponibilizar painéis com maior número de mutações ou realizar o seqüenciamento genético para o diagnóstico dos casos mais atípicos. A análise do DNA também é útil para a detecção de portadores, aconselhamento genético e rastreamento pré-natal e pode ser obtida pelo *swab* bucal (40).

As anormalidades do transporte iônico no epitélio respiratório na FC estão associadas com um padrão alterado na Diferença de Potencial Nasal (DPN). Uma DPN aumentada, em associação com um quadro clínico ou uma história familiar positiva, fundamenta o diagnóstico de FC. Entretanto, a ausência de aumento na DPN não exclui o diagnóstico de FC (41).

Embora o diagnóstico de FC seja normalmente feito na infância (70% dos casos no primeiro ano de vida), o número de casos diagnosticados na vida adulta tem aumentado (42). Em geral, os pacientes cujo diagnóstico é feito na vida adulta

possuem formas não clássicas de FC (43). Eles se apresentam com doença respiratória crônica, porém de menor gravidade, com menor incidência de infecção por *Pseudomonas aeruginosa* e menor frequência de insuficiência pancreática. Um fator que contribui para a dificuldade diagnóstica é que uma considerável parcela desses pacientes apresenta teste do suor normal ou limítrofe (44).

No Brasil, Lemos e cols descreveram 28 pacientes com diagnóstico de FC na vida adulta no estado da Bahia. A idade média foi de 31,1 anos, 53,7% eram negros ou mulatos e 43% tinham *P. aeruginosa* na cultura do escarro. Os autores salientaram a importância de investigar a FC em pacientes adultos com infecção respiratória de repetição, sinusite e bronquiectasias (45).

Paschoal e cols descreveram 54 pacientes cujo diagnóstico de FC foi feito na vida adulta, na cidade de Campinas, São Paulo. A média de idade foi de 41,8 anos, 85% dos casos tinham tosse produtiva crônica, 6% tinham diarreia ou fezes gordurosas, 48% tinham *P. aeruginosa* na cultura do escarro e o valor médio do volume expiratório forçado no primeiro segundo (VEF1) foi de 52% do previsto (46).

A despeito dessas diferenças, os critérios diagnósticos para FC são os mesmos tanto para crianças como para adultos (47). Além da repetição do teste do suor, o diagnóstico exige geralmente a realização da análise de mutações (48). A diferença de potencial nasal pode ser útil, mas a dificuldade de padronização do teste é um fator limitante na prática clínica.

## **1.2 - O FUNGO *PNEUMOCYSTIS JIROVECI***

### **1.2.1 - O fungo *Pneumocystis jirovecii* e a pneumonia por *Pneumocystis* (PcP)**

As publicações acerca do *Pneumocystis* e sua nomenclatura iniciaram no

Brasil. Carlos Chagas, do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, descreveu-o pela primeira vez em 1909 e pensou que se tratava de uma fase do *Trypanosoma cruzi* (49). Antonio Carini, um pesquisador italiano que atuava em São Paulo, demonstrou o mesmo organismo em pulmões de ratos em 1910 (50). A seguir, os franceses Delanoe e Delanoe descobriram que se tratava de um novo patógeno e o denominaram *Pneumocystis carinii*, em homenagem a Antonio Carini. O casal Delanoe sugeriu o nome “Pneumo” por seu tropismo pulmonar e “cystis” por sua forma característica (51). Após ter sido considerado um protozoário por quase 80 anos, foi definido como um fungo no ano de 1988 através da análise genética, conforme relatado por Edman e cols (52).

O gênero *Pneumocystis* pode ser encontrado em vários mamíferos. As espécies identificadas até o momento e seus respectivos hospedeiros são: *P. carinii* e *P. wakefieldiae* – rato (*Rattus norvegicus*); *P. murina* – camundongo (*Mus musculus*); *P. jirovecii* – homem (*Homo sapiens*); *P. oryctolagi* – coelho (*Oryctolagus cuniculus*). Já foram isolados *Pneumocystis* de outros mamíferos, porém ainda sem estudos conclusivos para a denominação de nova espécie do fungo: *Pneumocystis* de primatas não humanos (macacos de diversas espécies); *Pneumocystis* do furão (*Mustela putorius furo*); *Pneumocystis* do cavalo (*Equus caballus*); *Pneumocystis* do porco (*Sus scrofa*); *Pneumocystis* de micromamíferos; *Pneumocystis* do cão (*Canis familiaris*) (53).

Gigliotti e cols identificaram que não há transmissão do fungo entre os diferentes hospedeiros, ou seja, as espécies de *Pneumocystis* são específicas para o determinado mamífero (54).

Como supracitado, a espécie que infecta o homem é hoje chamada *Pneumocystis jirovecii*. Este nome foi proposto em 2002 por Stringer e outros pesquisadores em memória ao parasitologista Otto Jirovec, a quem é atribuída a primeira descrição do microorganismo como causa de doença em humanos. Otto Jirovec, um pesquisador de origem tcheca, descreveu em 1953 uma pneumonia com intenso infiltrado de células plasmáticas causada pelo *Pneumocystis*, que afetava crianças prematuras e/ou desnutridas. Esta pneumonia atingiu proporções epidêmicas na Europa Central durante a Segunda Guerra Mundial e nos anos seguintes (55).

Após a definição das espécies que infectam os diferentes mamíferos, as

técnicas moleculares evidenciaram um significativo polimorfismo genético no próprio *P. jirovecii*. Os loci do gene que codifica a enzima Diidropteroato sintase (DIPS) e o da subunidade maior do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA) são os mais utilizados nos estudos da epidemiologia molecular do fungo. A análise do gene da DIPS identifica o surgimento de mutações associadas à resistência às sulfas. O seqüenciamento do DNA da região da mtLSUrRNA identifica diferentes genótipos - 85C/248C (genótipo 1), 85A/248C (genótipo 2) e 85T/248C (genótipo 3) - utilizados para avaliar a distribuição geográfica do fungo (56).

O *P. jirovecii* é reconhecido como causa de infecção oportunista, a pneumonia por *Pneumocystis* (PcP). Indivíduos com o sistema imune debilitado, especialmente aqueles com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), são os mais comumente acometidos (57).

Houve uma queda significativa na incidência da PcP entre os pacientes com AIDS após a introdução da terapia antiretroviral combinada. Entretanto, a incidência tem aumentado entre pacientes sem o vírus HIV, causada pela utilização mais freqüente de terapias agressivas para diversas doenças, principalmente transplantes de órgãos, tratamentos para câncer e doenças reumatológicas. Os transplantes de órgãos sólidos desenvolvem PcP em 5 a 15% casos quando a quimioprofilaxia para esta infecção oportunista não é utilizada (58). Entre receptores de transplante de pulmão ou coração-pulmão, a taxa é ainda mais alta, atingindo até 25% dos casos (59). Nos transplantes de coração e rim, foi descrito que a utilização de tratamento imunossupressor mais potente tem aumentado as taxas de PcP (60). A PcP ocorre em 1 a 2% de todos os pacientes com doenças reumatológicas, mais frequentemente entre aqueles com terapia imunossupressora. Pacientes com granulomatose de Wegener estão em mais alto risco, com taxas de até 6% (61). Casos isolados de PcP em pacientes sem o vírus HIV têm sido relatados também em pacientes com asma, glomerulonefrite, colite ulcerativa e outras doenças (62).

À radiografia de tórax tipicamente encontramos um infiltrado intersticial e alveolar numa distribuição peri-hilar. Nos pacientes com uma imunossupressão não relacionada ao vírus HIV, a PcP tem um início mais fulminante e pode

rapidamente progredir para insuficiência respiratória. A associação de corticóides ao antibiótico nos pacientes com significativa hipóxia mostrou diminuição na mortalidade (63).

A droga de escolha para tratamento da PcP é o sulfametoxazol associado ao trimetoprim. Falhas na profilaxia com sulfa-trimetoprim (resistência à sulfa em baixas doses) têm sido associadas com mutações pontuais no gene que codifica a enzima diidropteroato sintetase, a enzima-alvo da sulfa. As mutações são pontuais e resultam na substituição de aminoácidos nas posições 55 e 57 desta enzima. Não há evidências conclusivas de que as mutações citadas causem uma resistência do *P. jirovecii* ao tratamento da PcP com sulfa em altas doses; entretanto, isto poderia ocorrer se novas mutações surgirem, o que teria um impacto imenso no manejo dos pacientes com AIDS (64, 65). Outro dado de importância foi trazido por Iliades e cols, que verificaram que as mutações associadas ao uso do sulfa-trimetoprim levam à resistência cruzada à maioria das sulfas usadas na prática clínica (66).

Um aspecto ainda a ser lembrado, ao introduzir alguns conceitos sobre o *P. jirovecii*, é que a exposição primária ocorre geralmente já na infância, como demonstrado pela presença de anticorpos para o microorganismo durante os primeiros anos de vida (67). A soroprevalência foi de 73% num estudo realizado na Espanha entre 233 crianças na faixa etária dos 6 aos 13 anos (68) e de 85% noutro realizado no Chile entre crianças de até 20 meses de idade (69). A presença freqüente do fungo entre as crianças, também determinada pela PCR em aspirado nasofaríngeo, leva a crer que elas possam representar uma das populações que servem como reservatório para o microorganismo (70).

Curiosamente, estudos de autópsia trouxeram resultados que indicaram uma possível relação entre a presença do microorganismo nos pulmões e a Síndrome da Morte Súbita Infantil (SMSI). Vargas e cols examinaram, através dos métodos citológicos convencionais, o tecido de autópsia pulmonar de 534 pacientes que morreram em casa ou no hospital; detectaram a presença do *P. jirovecii* em 25% das crianças cuja morte foi associada à Síndrome da Morte Súbita Infantil e em somente 2,9% das crianças que morreram no hospital por outras causas (71). Um relato mais recente do mesmo autor veio a questionar a associação entre a presença do *P.jirovecii* e a SMSI (72). Esta questão merece

estudos adicionais para ser plenamente compreendida.

### 1.2.2 - A colonização por *Pneumocystis jirovecii*

Devido ao fato do *P. jirovecii* não crescer em meios de cultura convencionais, sua detecção é feita por métodos citológicos como a prata metenamina, Wright, ou Giemsa, ou através de imunofluorescência com anticorpos monoclonais. Esses métodos são utilizados para o diagnóstico de PcP, na qual o indivíduo encontra-se infectado com uma carga de germes relativamente alta. Entretanto, o *P. jirovecii* pode também estar presente no trato respiratório quando não há evidência clínica de pneumonia. A detecção do *P. jirovecii* em indivíduos sem sinais ou sintomas de PcP tem sido definida como colonização. Outros termos usados são “infecção subclínica” ou “portador assintomático”. Embora alguns investigadores tenham relatado, de forma episódica, a detecção da colonização por *P. jirovecii* usando os métodos citológicos ou de imunohistoquímica, estes são geralmente inadequados para a detecção de colonização em virtude da baixa quantidade de germes existente (73).

O desenvolvimento da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) foi importante no avanço do estudo da colonização por *P. jirovecii*. Wakefield e cols foram os primeiros a descrever a detecção do fungo pela PCR em 1990, através da amplificação de uma seqüência de DNA, a subunidade maior do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA). A vantagem do locus mtLSUrRNA como um alvo para a PCR é ser um gene multicópia e assim melhorar a sensibilidade (74). Algumas modificações na detecção baseada na PCR melhoraram ainda mais a sensibilidade do método. Por exemplo, a *nested* PCR, em que uma segunda rodada de PCR usando *primers* internos aos originais é realizada, possibilita ainda maior sensibilidade na detecção do microorganismo. A PCR permite identificar a colonização por *P. jirovecii* em diversos espécimes clínicos, como lavado broncoalveolar, escarro, *swab* nasal e lavado de orofaringe (75).

A significância clínica da colonização por *Pneumocystis* ainda não foi

completamente entendida, mas pode ser importante por várias razões. Indivíduos colonizados podem estar em risco do desenvolvimento de PcP ou podem transmitir o microorganismo a pacientes susceptíveis ao desenvolvimento de um quadro de PcP. Por outro lado, nos indivíduos recebendo profilaxia anti-*Pneumocystis* por longo tempo, a colonização pode levar à seleção de mutações que têm sido associadas com a resistência à droga. Além disso, a presença de *P. jirovecii* nos pulmões, mesmo em baixos níveis, pode estimular uma resposta inflamatória do hospedeiro que leva ao dano pulmonar e pode exercer um papel na progressão de doenças pulmonares como a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC) (76).

Os estudos utilizando o modelo animal trouxeram dados impressionantes sobre a colonização por *Pneumocystis* e serviram de estímulo a estudar as taxas de colonização e seu significado no homem. Um interessante relato de Icenhour e cols demonstrou que, entre ratos de colônias comercializadas para estudos científicos, 98% dos ratos adultos já estavam colonizados por *Pneumocystis* ao serem recebidos do vendedor, com a detecção feita pela *nested* PCR em amostras de *swab* oral dos animais (77). Nos ratos recém-nascidos, os mesmos autores demonstraram que 80% deles já portavam o fungo na cavidade oral apenas duas horas após o nascimento e 97% após 24 h. Dentro de 48 h, a população inteira era portadora, confirmando o aspecto disseminado da presença do *Pneumocystis* entre os ratos (78).

Board e cols estudaram os macacos *Rhesus* infectados pelo Vírus da Imunodeficiência dos Símios. Após a inoculação do *Pneumocystis* nos brônquios, alguns animais progrediram para PcP e outros tornaram-se colonizados por longo período. O período de colonização foi marcado por inflamação pulmonar significativa demonstrada pela broncoscopia com lavado bronco-alveolar. Ocorreu um aumento de linfócitos T CD8 e neutrófilos nos pulmões, assim como uma elevação nos níveis de citocinas inflamatórias como IL-8 e TNF- $\alpha$ , indicando que o *Pneumocystis* alterou a resposta imune dos macacos (79).

A colonização por *P. jirovecii* em seres humanos é um tema recente e foi estudado em determinadas populações, como será descrito a seguir.

**a) A colonização pelo *P. jirovecii* em pacientes infectados pelo vírus HIV, imunossuprimidos por outras causas, gestantes e profissionais de saúde**

Algumas populações foram estudadas quanto à colonização por *P. jirovecii*: os pacientes infectados pelo HIV, os imunossuprimidos por outras causas, as mulheres gestantes e os profissionais de saúde, além dos pacientes pulmonares crônicos que serão abordados no tópico seguinte.

A colonização por *P. jirovecii* ocorre freqüentemente nos pacientes infectados pelo vírus HIV, numa prevalência que varia de acordo com a população estudada. Huang e cols verificaram 69% de colonização por *P. jirovecii*, através da *nested* PCR em amostras de escarro induzido e lavado broncoalveolar, em pacientes hospitalizados por outra pneumonia que não a PcP (80). Morris e cols analisaram o tecido de autópsia pulmonar de homens infectados pelo HIV que morreram de outras causas e demonstraram 46% de colonização (81).

Vários autores analisaram os possíveis fatores de risco para a colonização por *P. jirovecii* nos pacientes infectados pelo vírus HIV. A história prévia de PcP, o uso de profilaxia para PcP e o uso de terapia antiretroviral não mostraram associação com o risco de colonização pelo *P. jirovecii* (80,81). Os estudos publicados divergem sobre a associação entre a contagem de linfócitos CD4 e a colonização. Leigh e cols observaram os seguintes dados: a taxa de pacientes colonizados foi de 10% naqueles com contagem CD4 maior que 400 células/ $\mu$ L, 20% naqueles com CD4 entre 60 e 400 células/ $\mu$ L e 40% nos pacientes com contagem CD4 menor que 60 células/ $\mu$ L (82). Huang e cols, assim como Morris e cols, por outro lado, não encontraram associação entre a contagem de linfócitos CD4 e o risco de colonização pelo *P. jirovecii* (80,81), indicando que novos estudos necessitam ser conduzidos. Outros fatores já relacionados ao aumento do risco de colonização pelo *P. jirovecii* nos pacientes infectados pelo HIV são história de tabagismo e local de residência: noutro estudo de Morris A e cols, os fumantes apresentaram maior risco que os não fumantes, assim como os residentes de Los Angeles, EUA, tiveram menor risco de colonização por *P. jirovecii* que os pacientes de outras cidades (83).

Pacientes imunossuprimidos por outras causas também se mostraram



colonizados por *P. jirovecii* em vários estudos. Um grupo de 82 pacientes com diagnósticos de mieloma múltiplo, sarcoidose, leucemia linfocítica crônica e diabetes mellitus apresentou colonização em 16% dos casos. É interessante notar que a contagem de linfócitos CD4 foi, no estudo de Nevez e cols, um fator de risco para a colonização nos pacientes HIV negativos. Quando a contagem de linfócitos CD4 era menor que 400 células/ $\mu$ L ou a relação CD4/CD8 era menor que 1,0, a taxa de indivíduos colonizados foi de cerca de 30% (84).

A imunossupressão induzida por corticóides também foi associada a um maior de risco de colonização por *P. jirovecii*. Maskell e cols estudaram o lavado broncoalveolar de 93 pacientes, tendo observado que 44% dos pacientes em uso de corticóide estavam colonizados, enquanto que somente 12% daqueles que não recebiam o tratamento apresentavam a colonização pelo fungo (85). Esta associação foi também demonstrada por Helweg-Larsen e cols na avaliação de 80 pacientes com pneumonia bacteriana (86).

A alteração na imunidade que ocorre na gestação também pode aumentar o risco de colonização por *P. jirovecii*. Uma leve mudança na função dos linfócitos CD4 e as alterações hormonais podem ser os responsáveis por esta alteração no sistema imune. Um estudo prospectivo de 33 gestantes no terceiro trimestre detectou, através da PCR, o DNA do *P. jirovecii* nas narinas em 15% das gestantes e em nenhuma das 28 mulheres não grávidas avaliadas (87).

Alguns autores têm relatado a colonização de profissionais da saúde por *P. jirovecii*. Vargas e cols demonstraram, em estudo publicado em 2000, a colonização de dois profissionais - um médico e uma enfermeira - que tiveram contato próximo com uma paciente com PcP. (88) Da mesma maneira, Miller e cols relataram, no ano de 2001, a presença do fungo em profissionais que prestavam atendimento a pacientes com PcP, sendo dois médicos, duas enfermeiras e uma funcionária administrativa (89). No ano de 2003, Durand-Joly e cols investigaram a presença do fungo no lavado da orofaringe de 146 profissionais de saúde num hospital universitário de Lille, França; os autores demonstraram a presença do *P. jirovecii* em 8% dos profissionais que trabalhavam com pacientes imunossuprimidos no Setor de Hematologia e destacaram que o fungo poderia circular pelo ar a partir dos pacientes e colonizar os referidos profissionais que, transitoriamente colonizados, poderiam transmitir o

microorganismo a outros pacientes (90).

## **b) A colonização pelo *P. jirovecii* nas doenças pulmonares crônicas**

As doenças pulmonares crônicas são, até o momento, as mais estudadas em relação à colonização por *P. jirovecii*.

Calderón e cols foram os primeiros a demonstrar, no ano de 1996, a presença de colonização por *P. jirovecii* em pacientes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica (DPOC). Os autores analisaram, por métodos citológicos, o escarro de 50 pacientes com DPOC e encontrada uma taxa de 10% de colonização (91). Posteriormente, os mesmos autores estudaram 37 pacientes com bronquite crônica e encontraram que 41% deles estavam colonizados, desta vez através da *nested* PCR no escarro (92).

Otras doenças respiratórias crônicas também foram avaliadas. Probst e cols investigaram 141 pacientes com várias doenças respiratórias como DPOC, Fibrose Cística e câncer de pulmão e encontraram que 21% estavam colonizados (93). La Horra e cols avaliaram pacientes com câncer de pulmão e identificaram que todos os 10 pacientes com neoplasia de pequenas células tinham *P. jirovecii* em seu tecido pulmonar, comparados com somente 2 dos 10 pacientes que tinham neoplasia não-pequenas células e nenhum dos pacientes sem doença pulmonar subjacente; novos estudos são certamente necessários para verificar esta associação (94).

A DPOC é a doença respiratória crônica mais estudada quanto ao significado da colonização por *P. jirovecii*. A severidade da DPOC foi associada à colonização pelo fungo numa publicação de Morris e cols no ano de 2004. Foi observado que 37% dos pacientes com DPOC severo (classificação GOLD - “Global Health Initiative on Obstructive Lung Disease” - estágio IV) estavam colonizados, enquanto somente 5,3% daqueles com DPOC menos severo (estágios I-III). A taxa no estágio GOLD IV foi muito maior que os 9,1% observados nos pacientes com outras doenças pulmonares em estágio terminal. Esta associação entre a colonização por *P. jirovecii* e a severidade da DPOC foi independente da

história de tabagismo, sugerindo que a própria colonização poderia resultar em progressão da DPOC (95, 96). Somente um estudo não relatou associação entre DPOC e colonização pelo *P. jirovecii*, possivelmente por não incluir pacientes com grau avançado dessa doença (85).

A resposta imune na colonização foi avaliada em modelo animal e observou-se que ocorre uma infiltração celular e a liberação de mediadores inflamatórios. Board e cols examinaram a resposta imune à colonização por *Pneumocystis* em macacos infectados pelo Vírus da Imunodeficiência dos Símios. Após a inoculação do fungo, alguns dos macacos desenvolveram PcP e outros permaneceram colonizados. O período inicial após a inoculação foi marcado por um influxo de linfócitos T CD8+ e neutrófilos, independentemente se o evento final foi uma PcP fulminante ou uma colonização. A infiltração por linfócitos T CD8+ e neutrófilos persistiu através do curso da infecção, mesmo naqueles macacos que não desenvolveram PcP (97). Patil e cols demonstraram que os níveis de interferon ( $\text{INF-}\gamma$ ), fator de necrose tumoral ( $\text{TNF-}\alpha$ ) e interleucina (IL-8) aumentaram na colonização dos macacos por *Pneumocystis*. A intensidade e a persistência da resposta inflamatória sugeriram que a colonização poderia resultar em dano pulmonar (98).

A resposta inflamatória sistêmica também tem sido analisada nos seres humanos. Varela e cols demonstraram que pacientes com DPOC e colonizados por *P. jirovecii* tinham um maior número de linfócitos periféricos e de linfócitos CD4+. Outro estudo observou que indivíduos com DPOC apresentavam maiores níveis circulantes de  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-6, e IL-8. Estas evidências sugerem que uma inflamação associada à colonização poderia atuar na evolução da DPOC (99).

Existem poucos estudos publicados sobre a colonização por *P. jirovecii* em pacientes com Fibrose Cística (FC), os quais estão descritos a seguir.

Varela e cols analisaram, no ano de 1998, o escarro de 45 pacientes com FC através de métodos citológicos – azul de toluidina, Giemsa modificado, prata metenamina - e de imunofluorescência, não tendo observado nenhum paciente colonizado (100). Como comentado anteriormente, a sensibilidade desses métodos é muito baixa para a detecção da colonização por *P. jirovecii* em comparação com as técnicas moleculares.

Sing e cols avaliaram a colonização em 95 pacientes com FC na

Alemanha, no ano de 2001, através de métodos citológicos – Giema e prata de Grocott – e da *nested* PCR em amostras de escarro. Os métodos citológicos tiveram resultado negativo em todos os casos e a *nested* PCR revelou que 7,4% dos pacientes estavam colonizados. Os autores sugeriram que uma taxa maior poderia ser encontrada através da análise de amostras do lavado broncoalveolar (101).

Respaldiza e Calderón analisaram amostras de escarro e de lavado de orofaringe de 88 pacientes com FC na Espanha em 2005. Através da *nested* PCR e seqüenciamento genético, foram avaliadas a taxa de colonização e a distribuição dos diferentes genótipos da subunidade maior do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA). A colonização por *P. jirovecii* foi observada em 21,5% dos casos. Os genótipos observados foram: 85C/248C (genótipo 1) em 45,4%; 85T/248C (genótipo 3) em 27,2% e 85<sup>a</sup>/248C (genótipo 2) em 18,1% dos casos. Entre os pacientes estudados, 20,8% receberam tratamento com azitromicina e persistiram colonizados. A diferença na porcentagem de pacientes colonizados, em relação ao estudo de Sing e cols poderia ser explicada pela distribuição geográfica variável do *P. jirovecii* (102).

A análise dos genótipos da região mtLSUrRNA revelou-se uma boa ferramenta nas pesquisas da epidemiologia molecular do *P. jirovecii*. Montes-Cano e cols, do mesmo grupo de pesquisadores do estudo anterior, do Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilha, Espanha, analisaram os genótipos da região mtLSUrRNA em espécimes respiratórios de 33 pacientes com FC no ano de 2007. As taxas observadas foram: 42,4% do genótipo 3 (85T/248C); 36,3% do genótipo 1 (85C/248C); 15,1% do genótipo 2 (85A/248C); e 6% genótipos mistos. Os pacientes foram acompanhados por um ano e mostraram um ciclo contínuo de erradicação do *P. jirovecii* e nova colonização; observou-se, ao longo do tempo, uma predominância do genótipo 3, o que sugere que este pode ser um genótipo melhor adaptado na colonização dos pacientes com FC (103).

### 1.3- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 – Yankaskas JR, Marshall BC, Sufian B, et al. Cystic fibrosis adult care: consensus conference report. **Chest** 2004;125(1 Suppl):1-39.

2 - Gershman AJ, Mehta AC, Infeld M, et al. Cystic fibrosis in adults: An overview for the internist. **Cleve Clin J Med** 2006;73:1065-1074.

3 - Raskin S. Genética da fibrose cística. Conferência. **IX Congresso Brasileiro de Pneumologia Pediátrica**. Florianópolis, SC, 2001.

4 - Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathologic study. **Am J Dis Child** 1938;56:344-399.

5 - Dalcin PTR, Silva FAA. Fibrose cística no adulto: aspectos diagnósticos e terapêuticos. **J Bras Pneumol** 2008;34(2):107-117.

6 – Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. **Science** 1989;245(4922):1066-1073. Erratum in: *Science* 1989;245(4925):1437.

7 - Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng SH, et al. Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. **J Clin Invest** 1992;89(1):339-349.

8 - Davis PB. Cystic fibrosis since 1938. **Am J Respir Crit Care Med** 2006;173(5):475-482.

9 - Oliveira G, Oliveira C. Nutrition, cystic fibrosis and the digestive tract. **Nutr Hosp** 2008; 23;(2 suppl):71-86.

10 – De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. Diagnostic Working Group. **Thorax** 2006;61(7):621-

635.

11 – Fauci AS, Kasper DL, Longo DL, et al, editors. **Principles of Internal Medicine Harrison's 2008**;New York: Mc Graw Hill Medical; p. 1632-1635.

12 - Kalnins D, Stewart C, Tullis E, et al, editors. **Cystic fibrosis in adults 1999**; Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; p. 289-307.

13 – Scheid P, Anthoine D, Polu JM. Treatment of respiratory insufficiency in mucoviscidosis. **Rev Pneumol Clin 1995**;51(3):181-185.

14 – Ratjen FA. Cystic fibrosis: pathogenesis and future treatment strategies. **Respir Care 2009**;54(5):595-605.

15 - Kosciak RL, Farrel PM, Kosorok MR, et al. Cognitive function of children with cystic fibrosis: deleterious effect of early malnutrition. **Pediatrics 2004**;113(6):1549-1558.

16 - Farrel PM, Kosorok MR, Rock MJ, et al. Early diagnosis of cystic fibrosis through neonatal screening prevents severe malnutrition and improves long-term growth. Wisconsin Cystic Fibrosis Neonatal Screening Study Group. **Pediatrics 2001**;107(1):1-13.

17 - Kerem E, Conway S, Elborn S, et al. Consensus Committee. Standards of care for patients with cystic fibrosis: a European consensus. **J Cyst Fibros 2005**;4(1): 7-26.

18 - Alves CA, Aguiar RA, Alves AC, et al. Diabete melito: uma importante comorbidade da fibrose cística. **J Bras Pneumol 2007**;33(2): 213-221.

19 - Bridges N, Spowart K. Diabetes in Cystic Fibrosis. **Prog Resp Res 2006**;34: 278-283.

- 20 – Colombo C, Apostolo MG, Ferrari M, et al. Analysis of risk factors for the development of liver disease associated with cystic fibrosis. **J Pediatr** **1994**;124:393-399.
- 21 - Dodge JA. Male fertility in cystic fibrosis. **Lancet** **1995**;346(8975):587-588.
- 22 - Haworth CS, Selby PL, Webb AK, et al. Low bone mineral density in adults with cystic fibrosis. **Thorax** **1999**;54(11):961-567.
- 23 - Kang SH, Piovesan DM, Hoffmann CF, et al. Características dos pacientes adolescentes e adultos com fibrose cística do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Revista AMRIGS** **2004**;48(3):162-170.
- 24 - Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, et al. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. **Pediatr Pulmonol** **2002**;34(2):91-100.
- 25 - Burns JL, Gibson RL, McNamara S, et al. Longitudinal assessment of *Pseudomonas aeruginosa* in young children with cystic fibrosis. **J Infect Dis** **2001**;183(3):444-452.
- 26 - Döring G, Conway SP, Heijerman HG, et al. Antibiotic therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: a European consensus. **Eur Respir J** **2000**;16(4):749-767.
- 27 - Armstrong D: *Pseudomonas aeruginosa*: clinical research. **Prog Respir Res** **2006**;34: 131-137.
- 28 - Noone PG, Knowles MR. Standard therapy of cystic fibrosis lung disease. In: Yankaskas JR, Knowles MR, editors. **Cystic fibrosis in adults 1999**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; p. 145-73.

- 29 - Gibson RL, Burns JL, Ramsey BW. Pathophysiology and management of pulmonary infections in cystic fibrosis. **Am J Respir Crit Care Med** **2003**;168(8):918-951.
- 30 - Ramsey BW. Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis. **N Engl J Med** **1996**;335(15):1167.
- 31 - Stern RC. The diagnosis of cystic fibrosis. **N Engl J Med** **1997**;336(7):487-491.
- 32 - Watson MS, Cutting GR, Desnick RJ, et al. Cystic fibrosis population carrier screening: 2004 revision of American College of Medical Genetics Mutation panel. **Genet Med** **2004**;6(5):387-391.
- 33 - Farrel PM, Rosenstein BJ, White TB, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. **J Pediatr** **2008**;153(2):S4-S14.
- 34 - Parad RB, Comeau AM, Dorkin HL, et al. Sweat testing infants detected by cystic fibrosis newborn screening. **J Pediatr** **2005**;147(3 Suppl):69-72.
- 35 - De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, et al. Cystic fibrosis: terminology and diagnosis algorithms. **Thorax** **2006**;61(7):627-635.
- 36 - LeGrys VA, Yankaskas JR, Quittell LM, et al. Diagnostic sweat testing: the Cystic Fibrosis Foundation guidelines. **J Pediatr** **2007**;151(1):85-89.
- 37 - Karczeski B, Cutting G. Diagnosis of cystic fibrosis, CFTR-related disease and screening. **Prog Respir Res** **2006**;34:69-76.
- 38 - Groman JD, Meyer ME, Wilmott RW, et al. Variant cystic fibrosis phenotypes in the absence of CFTR mutations. **N Engl J Med** **2002**;347(6):401-407.



- 39 - Mekus F, Ballmann M, Bronsveld I, et al. Cystic-fibrosis-like disease unrelated to the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. **Hum Genet** **1998**;102(5):582-586.
- 40 - Chmiel JF, Drumm ML, Konstan MW, et al. Pitfall in the use of genotype analysis as the sole diagnostic criterion for cystic fibrosis. **Pediatrics** **1999**;103(4 Pt 1):823-826.
- 41 - Alton EW, Currie D, Logan-Sinclair R, et al. Nasal potential difference: a clinical diagnostic test for cystic fibrosis. **Eur Respir J** **1990**;3(8): 922-926.
- 42 - McWilliams TJ, Wilsher ML, Kolbe J. Cystic fibrosis diagnosed in adult patients. **N Z Med J** **2000**;113(1102):6-8.
- 43 - Groman JD. Phenotypic and genetic characterization of patients with features of nonclassic forms of cystic fibrosis. **J Pediatr** **2006**;146:675.
- 44 - Gilljam M, Ellis L, Corey M, et al. Clinical manifestations of cystic fibrosis among patients with diagnosis in adulthood. **Chest** **2004**;126(4):1215-1224.
- 45 – Lemos AC, Matos E, Franco R, et al. Fibrose cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. **J Bras Pneumol** **2004**;30(1):9-13.
- 46 - Paschoal IA, de Oliveira Villalba W, Bertuzzo CS, et al. Cystic fibrosis in adults. **Lung** **2007**;185(2):81-87.
- 47 - Widerman E, Millner L, Sexauer W, et al. Health status and sociodemographic characteristics of adults receiving a cystic fibrosis diagnosis after age 18 years. **Chest** **2000**; 118(2): 427-433.
- 48 - Boyle MP. Nonclassic cystic fibrosis and CFTR-related diseases. **Curr Opin Pulm Med** **2003**;9(6):498-503.

- 49 – Chagas C. Nova Trypanozomiaza humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n gen, n sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **1909**;1:159-208.
- 50 – Carini A. Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. **Bulletin de l'Institut Pasteur** **1910**;tIX:973-978.
- 51- Delanoe P, Delanoe M. Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. **C R Hebd Seances Sci** **1912**;155:658-659.
- 52 – Edman JC, Kovacs JA, Masur H, et al. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the Fungi. **Nature** **1988**;334:519-522.
- 53 – Wissmann G, Morilla R, Friaza V, et al. El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. **Enferm Infecc y Microbiol Clin** **2010**;28(1)38-43.
- 54 – Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, et al. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. **Infect Immun** **1993**;61:1886-1890.
- 55 – Stringer JR, Beard CB, Miller RF, et al. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. **Emerg Infect Dis** **2002**;8:891-896.
- 56 – Beard CB, Roux P, Nevez G, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. **Emerg Infect Dis** **2004**;10:1729-1735.
- 57 - Morris A, Lundgren JD, Masur H, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. **Emerg Infect Dis** **2004**;10:1713-1720.
- 58 - Hardy AM, Wajszczuk CP, Suffredini AF, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in renal transplant patients treated with cyclosporine and steroids. **J Infect Dis** **1984**; 149:143-147.

- 59 - Arend SM, Westendorp RGJ, Kroon FP, et al. Rejection treatment and cytomegalovirus infection as risk factors for *Pneumocystis carinii* in renal transplant recipients. **Clin Infect Dis** 1996;22:920-925.
- 60 - Chave J-P, David S, Wauters J-P, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients to other immunosuppressed patients: a cluster of *Pneucystis carinii* pneumonia in renal transplant recipients. **AIDS** 1991;5:927-932.
- 61 - Godeau B, Coutant-Perronne V, Huong DLT, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the course of connective tissue disease: report of 34 cases. **J Rheumatol** 1994;21:246-251.
- 62 - Sepkowitz KA, Brown AE, Armstrong D. *Pneumocystis carinii* pneumonia without acquired immunodeficiency syndrome: more patients, same risk. **Arch Intern Med** 1995;155:1125-1128.
- 63 - Thomas Jr. CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis* pneumonia. **Nature** 2007;5:298-308.
- 64 - Lane BR, Ast JC, Hossler PA, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. **J Infect Dis** 1997;175: 482-485.
- 65 - Kazanjian PH, Fisk D, Armstrong W, et al. Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* pneumonia, in the United States and China. **J Infect Dis** 2004;189:1684-1687.
- 66 - Iliades P, Meshnick SR, Macreadie IG. Mutations in the *Pneumocystis jiroveci* DHPS gene confer cross-resistance to sulfa drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2005;49(2):741-748.
- 67 – Meuwissen JH, Tauber I, Leeuwenberg AD, et al. Parasitologic and serologic observation of infection with *Pneumocystis carinii* in humans. **J Infect Dis** 1977;136:43-49.

- 68 - Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, et al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. **Clin Microbiol Infect** 2004;10:1029-1031.
- 69 - Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal healthy infants. **Clin Infect Dis** 2001;32:855-861.
- 70 - Totet A, Latouche S, Duwat H, et al. Multilocus Genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in patients developing diverse forms of parasitism: implication for a wide human reservoir for the fungus. **J Eukaryot Microbiol** 2003;50(Suppl):670-671.
- 71 - Vargas SL, Ponce CA, Hughes WT, et al. Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. **Clin Infect Dis** 1999;29:1489-1493.
- 72 - Vargas SL, Ponce CA, Galvez P, et al. *Pneumocystis* is not a direct cause of sudden infant death syndrome. **Pediatr Infect Dis J** 2007;26:81-83.
- 73 - Huang L, Morris A, Limper AH, et al. An official ATS workshop summary: recent advances and future directions in *Pneumocystis* pneumonia (PCP). **Proc Am Thorac Soc** 2006; 3: 655-64.
- 74 - Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. **Lancet** 1990;336:451-453.
- 75 - Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. Hominis: high genotype similarity with contemporary isolates. **J Clin Microbiol** 1998; 36:90-93.
- 76 - Cushion MT, Smulian AG. *Pneumocystis* 2006: Summary of the research presented at the ninth international workshop on opportunistic protists. **J Eukaryot Microbiol** 2006; 53(1 Suppl):80-84.

77 - Icenhour CR, Rebholz SL, Collins MS, et al. Widespread occurrence of *Pneumocystis carinii* in commercial rat colonies detected using targeted PCR and oral swabs. **J Clin Microbiol** 2001;39:3437-3441.

78 - Icenhour CR, Rebholz SL, Cushion MT. Early acquisition of *Pneumocystis carinii* in neonatal rats using targeted PCR and oral swabs. **J Eukaryot Microbiol** 2001;(Suppl):135-136.

79 - Board KF, Patil S, Lebedeva I, et al. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in a simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. **J Infect Dis** 2003;187:576-588.

80 - Huang L, Crothers K, Morris A, et al. *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. **J Eukaryot Microbiol** 2003;(50 Suppl):616-617.

81 - Morris A, Kingsley LA, Groner G, et al. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV-infected men. **AIDS** 2004;18: 793-798.

82 - Leigh TR, Kangro HO, Gazzard BG, et al. DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect sub-clinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. **Respir Med** 1993;87:525-529.

83 - Morris A, Kingsley LA, Groner G, et al. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV-infected men. **AIDS** 2004;18: 793-798.

84 - Nevez G, Raccurt C, Vincent P, et al. Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus-negative patients: assessing risk with blood CD4+ T cell counts. **Clin Infect Dis** 1999;29:1331-1332.

85 - Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study.

**Thorax 2003**; 58: 594-7.

86 - Helweg-Larsen J, Jensen JS, Dohn B, et al. Detection of *Pneumocystis* DNA in samples from patients suspected of bacterial pneumonia – a case-control study. **BMC Infect Dis 2002**;2:28.

87 - Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, et al. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. **Emerg Infect Dis 2003**;9:605-606.

88 - Vargas SL, Ponce CA, Gigliotti F, et al. Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with pneumonia to immunocompetent contact health care workers. **J Clin Microbiol 2000**;38:1536-1538.

89 - Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. **J Clin Microbiol 2001**;39:3877-3882.

90 - Durand-Joly I, Soula F, Chabe M, et al. Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: a challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. **J Eukaryotic Microbiol 2003**;50(suppl):614-615.

91 - Calderon EJ, Regordan C, Medrano FJ, et al. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. **Lancet 1996**;347:977.

92 - Calderon EJ, de la Horra C, Medrano FJ, et al. *Pneumocystis jirovecii* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2004**;23:545-549.

93 - Probst M, Ries H, Schmidt-Wieland T, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in patients with chronic lung diseases. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000**;19:644-645.

94 - de la Horra C, Varela JM, Fernandez-Alonso J, et al. Association between human-*Pneumocystis* infection and small-cell lung carcinoma. **Eur J Clin Invest** **2004**;34:229-235.

95 - Morris A, Scirba FC, Lebedeva IP, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. **Am J Respir Crit Care Med** **2004**;170: 408-413.

96 - Beard CB, Fox MR, Lawrence GG, et al. Genetic Differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS: epidemiological implications. **J Infect Dis** **2005**;192:1815-1818.

97 - Board KF, Patil S, Lebedeva I, et al. Experimental *Pneumocystis carinii* pneumonia in a simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. **J Infect Dis** **2003**;187:576-588.

98 - Patil SP, Board KF, Lebedeva IP, et al. Immune responses to *Pneumocystis* colonization and infection in a simian model of AIDS. **J Eukaryot Microbiol** **2003**;50 Suppl: 661-662.

99 - Varela JM, Respaldiza N, Sanchez B, et al. Lymphocyte response in subjects with chronic pulmonary disease colonized by *Pneumocystis jirovecii*. **J Eukaryot Microbiol** **2003**;(50 Suppl):672-673.

100 - Varela JM, Dapena J, Regordan C, et al. Absence of *Pneumocystis carinii* carriers among patients with cystic fibrosis. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** **1998**;17:741-742.

101 - Sing A, Geiger AM, Hogardt M, et al. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. **J Clin Microbiol** **2001**;39:7-8.

102 - Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, et al. Prevalence of colonization and genotypic characterization of *Pneumocystis jirovecii* among

cystic fibrosis patients in Spain. **Clin Microbiol Infect** 2005;11:1012-1015.

103 - Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, et al. Dynamic colonization by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. **Clin Microbiol Infect** 2007;13:1008-1011.



## 2- JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A colonização por *P. jirovecii* tem sido descrita nos últimos anos e algumas evidências sugerem que possa ter importância clínica nas doenças pulmonares crônicas.

Na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica, foi observado que a colonização por *P. jirovecii* provoca um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e está associada à severidade da doença. Além disto, um paciente pulmonar crônico que se encontra colonizado pode atuar como reservatório do fungo e transmiti-lo, através da tosse, a um indivíduo susceptível de desenvolver um quadro de PcP.

Até o momento, foram publicados somente três estudos europeus sobre a colonização por *P. jirovecii* em pacientes com Fibrose Cística, uma doença hereditária de consideráveis morbidade e mortalidade. Esses estudos descreveram taxas de colonização entre 7,4-21,5% dos pacientes.

O estudo aqui apresentado busca trazer dados sobre a colonização por *P. jirovecii* em pacientes com Fibrose Cística atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. É um estudo pioneiro na América do Sul sobre a colonização por esse microorganismo em pacientes com doenças pulmonares crônicas, utilizando as técnicas moleculares de detecção e genotipagem que foram inseridas no nosso meio através da colaboração acadêmica entre pesquisadores do Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Universidade Federal do Rio Grande do Sul e do Instituto de Biomedicina de Sevilla / Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla, Espanha.

### **3- OBJETIVOS**

#### **Objetivo geral:**

Estudar a colonização pelo *P. jirovecii* em pacientes com Fibrose Cística no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

#### **Objetivos específicos:**

- a) Definir a taxa de colonização pelo *P. jirovecii* nos pacientes com Fibrose Cística submetidos à coleta do lavado broncoalveolar no Hospital de Clínicas de Porto Alegre entre março de 2004 e agosto de 2007.
- b) Analisar a caracterização genotípica (Diidropteroato sintetase e Grande Subunidade do RNA ribossômico mitocondrial) do *P. jirovecii* observado.
- c) Analisar os dados clínico-demográficos dos pacientes com Fibrose Cística quanto à presença da colonização pelo microorganismo.

#### **4- Artigo a ser encaminhado ao *Journal of Clinical Microbiology***

**Title:**

*Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients

**Running title:** *Pneumocystis* colonization in Brazilian CF-patients

**Authors:**

Marco Aurelio Pederiva<sup>1</sup>, Gustavo Wissmann<sup>1</sup>, Ruben Morilla<sup>2</sup>, Vicente Friaza<sup>2</sup>, Enrique J. Calderon<sup>2</sup>, João Carlos Prolla<sup>1\*</sup>

**Affiliations:**

<sup>1</sup>Grupo de Estudos em *Pneumocystis*, Unidade de Infectologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

<sup>2</sup>Centro de Investigacion Biomedica de Epidemiologia y Salud Publica, Virgen del Rocío University Hospital, Seville, Spain.

**\*Corresponding Author:**

João Carlos Prolla, MD, PhD

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, Brazil.

Telephone number:

FAX number:

e-mail: jcprolla@yahoo.com

**Abstract word counts:** 50

**Text Word counts:** 1197

**Keywords:** *Pneumocystis*, Epidemiology, Cystic Fibrosis

**Abstract**

This study describes the prevalence of colonization and molecular typing of *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian Cystic fibrosis patients. The high prevalence of colonization observed (38.2%) raises the question about the role of these patients as reservoir and source of infection, and of whether *Pneumocystis* can play a role in the progression of disease.

Cystic fibrosis (CF) is the most common life-shortening autosomal recessive disorder in Caucasian populations. Understanding the microbial flora of the CF respiratory tract is of considerable importance, as patient morbidity and death are primarily caused by chronic respiratory infections. However, colonized CF airways represent a surprisingly complex and diverse ecosystem (3).

*Pneumocystis jirovecii* is an atypical opportunistic fungus with lung tropism and worldwide distribution that causes pneumonia in immunosuppressed individuals. *Pneumocystis* colonization has recently been described in subjects with various lung diseases, and accumulated evidence suggests it may be an important clinical phenomenon (9). So far, few studies have been conducted in Europe to evaluate the prevalence of *Pneumocystis* colonization in patients with CF, which reported ranges from 7.4% to 21,5% (11,13). However, there is no information about *Pneumocystis* colonization in CF outside Europe. We addressed the issue regarding the prevalence of colonization and distribution of *P. jirovecii* genotypes among CF patients from Brazil.

Between March 2004 and August 2007, 34 consecutive CF patients attending the bronchoscopy unit for evaluation of their disease were studied. The informed consent of patients or their guardians was obtained in all cases. The study was approved by the hospital's ethics committee. Complete clinical, functional and radiologic evaluation was performed in all patients. Epidemiological information for each patient was obtained by medical chart review including age, sex, height, weight, bacterial colonization, use of pancreatic enzyme supplements, diagnosis of diabetes mellitus, forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>) and the number of hospital admissions last year. Previous

treatment with sulfa-drugs or azithromycin was defined as the prescription of any of these agents, regardless of the prescription length, in the 6 months before the bronchoscopy study. Weight-for-age Z-score was used to identify moderate to severe malnutrition cases (4). Diagnostic bronchoscopy with bronchoalveolar lavage (BAL) fluid examination was also performed.

Detection, genotypic characterization of the mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtLSUrRNA) gene and investigation of mutations in the gene that codes for the synthesis of the enzyme dihydropteroate synthase (DHPS) were performed as previously described (6).

a) Detection of *P. jirovecii* was carried out by analyzing BAL samples with nested-PCR at the gene encoding the mtLSUrRNA, with primers pAZ102-E and pAZ102-H in the first-round amplification, followed by pAZ102-X and pAZ102-Y in the second-round amplification (6). *Pneumocystis* DNA was extracted after samples were digested with proteinase K at 56°C by using a commercial kit (QIAGEN, Hilden, Germany). In order to prevent contamination, pipette filters were used for all manipulations. DNA extraction and preparation of the reaction mixture were performed in two different rooms under separate laminar-flow hoods. PCR and analysis of PCR products were performed in another room. Controls were run simultaneously with respiratory samples. Positive controls were BAL specimens from *Pneumocystis* pneumonia patients; negative controls were autoclaved water in the PCR mixture in the absence of the DNA template controls. All assays were performed at least twice.

b) Mitochondrial genotype characterization of *P. jirovecii*. All samples that were positive according to nested-PCR were sequenced; polymorphisms at

nucleotide positions 85 and 248 were detected by direct sequencing (6). The nested-PCR products were purified by using Sephacryl S-400 columns (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden) and reamplified with ABI Prism dRhodamine Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Then for each reaction, 5  $\mu$ L of PCR product, 4  $\mu$ L of terminator ready reaction mix, and 3 pmol/L of primer were added. The extension products were purified using the ethanol precipitation procedure to remove excess dye terminators. Each sample pellet was resuspended in 12.5  $\mu$ L of template suppression reagent and heated at 95°C for 3 min to denature the product. Electrophoresis was carried out on the ABI prism 310 sequencer (PE Applied Biosystems) in accordance with the manufacturer's recommendations. The sequenced DNA fragments were analyzed by Sequence Navigator version 1.0.1 (PE Applied Biosystems).

c) Detection of DHPS polymorphism. Samples identified as positive by nested-PCR of the mtLSUrRNA gene were studied by PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP), as previously described (1,6). In brief, the single-copy gene of DHPS was amplified by the primers DHPS-3 and DHPS-4 by using a touchdown-PCR protocol, yielding a 370-bp fragment. The PCR product was divided into 3 aliquots. One aliquot was used to confirm the presence of a 370-bp fragment from the DHPS gene. The second and third aliquots were used to identify wild-type sequences versus mutations in codons 55 and 57 by RFLP with AccI and HaeIII (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), respectively.

Statistical analysis was performed using SPSS software, version 15.0 (SPSS, Chicago, IL, USA). The Chi-square test or Fisher's exact test was used for

qualitative variables; the student's t-test was applied for quantitative variables, and the variance test was used to confirm normal distribution. A *P*-value <0.05 was considered statistically significant.

*P. jirovecii* colonization was detected in 13 (38.2%) CF patients. Twelve of these positive samples yielded typing results for positions 85 and 248 of the mtLSU rRNA gene. Standard cytological staining was negative for *P. jirovecii* in all cases and none of the *P. jirovecii* DNA-positive CF patients suffered from overt *Pneumocystis* pneumonia. No differences were detected with regard to clinical and demographic data when comparing *P. jirovecii* carriers with noncarriers (Table 1). Patients with CF who were colonized by *P. jirovecii* showed a higher frequency of *P. aeruginosa* infection than noncolonized subjects, but the difference was not statistically significant (Table 1).

Genotype 1 (85C/248C) was observed in 41.6% of the cases, genotype 2 (85A/248C) in 16.6%, genotype 3 (85T/248C) in 25.0%, and mixed genotype 1 and 3 was detected in 16.6% of the cases (Figure 1). Wild DHPS genotype was detected in all samples.

The results of our study reveal the high prevalence of *P. jirovecii* colonization in Brazilian patients with CF and confirm, together with previous studies, that *P. jirovecii* colonization in CF patients is a frequent situation (5,11,13).

Of the six mtLSUrRNA region genotypes described previously, only three were found among the CF patients in the present study. Genotype 85C / 248C was the most prevalent, and the genotype distribution among Brazilian CF patients was similar to that described in the Spanish CF population (5,7,11). The



absence of mutations associated with sulfa resistance in *P. jirovecii* DHPS gene from Brazilian CF patients is consistent with the same prior observation from Brazilian AIDS patients and is probably related to the low use of sulfa drugs in this population (14).

In this study, *P. jirovecii* colonization has not been associated with the severity of CF. However, recent studies suggested that *P. jirovecii* colonization may play a role in the pathophysiology of chronic obstructive pulmonary disease by inducing inflammatory changes (2,8,10). On the other hand, a recent study has provided molecular evidence that the transmission of *P. jirovecii* from colonized immunocompetent carrier hosts to susceptible persons may occur (12).

Our study describes a high prevalence of *P. jirovecii* colonization among Brazilian CF patients. Since these patients could potentially act as major reservoirs and sources of infection for susceptible individuals, further research is needed to assess the true scope of the problem and to design rational preventive strategies, if necessary. Moreover, it is necessary to elucidate the role of *P. jirovecii* colonization and/or infection in the natural history of CF in order to improve the clinical management of this disease.

### **Acknowledgments**

J.C. Prolla is supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil. R. Morilla, V. Friaça and E. J. Calderón are supported by the European Commission (ERA-NET PathoGenoMics).

## References

- 1- Calderon, E. J., C. de la Horra, F. J. Medrano, A. Lopez-Suarez, M. A. Montes-Cano, N. Respaldiza, J. Elvira-Gonzalez, J. Martin-Juan, A. Bascuñana, and J. M. Varela. 2004. *Pneumocystis jiroveci* isolates with dihydropteroate synthase mutations in patients with chronic bronchitis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. **23**:545-549.
- 2- Calderon, E. J., L. Rivero, N. Respaldiza, R. Morilla, M. A. Montes-Cano, V. Friaiza, F. Muñoz-Lobato, J. M. Varela, F. J. Medrano, and C. de la Horra. 2007. Systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease who are colonized with *Pneumocystis jiroveci*. Clin. Infect. Dis. **45**: e17-9.
- 3- Harrison, F. 2007. Microbial ecology of the cystic fibrosis lung. Microbiology. **153**: 917-23.
- 4- Lai, H.C., M. R. Kosorok, S. A. Sondel, S. T. Chen, S. C. FitzSimmons, C. G. Green, G. Shen, S. Walker, and P. M. Farrell. 1998. Growth status in children with cystic fibrosis based on the National Cystic Fibrosis Patient Registry data: evaluation of various criteria used to identify malnutrition. J. Pediatr. **132**: 478–85.
- 5- Montes-Cano, M. A., C. de la Horra, F. J. Dapena, I. Mateos, V. Friaiza, N. Respaldiza, F. Muñoz-Lobato, F. J. Medrano, E. J. Calderon, and J. M. Varela. 2007. Dynamic colonization by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. Clin. Microbiol. Infect. **13**:1008-1011.
- 6- Montes-Cano, M.A., C. de la Horra, J. Martin-Juan, J. M. Varela, R.

- Torronteras, N. Respaldiza, F. J. Medrano, and E. J. Calderon.** 2004. *Pneumocystis jiroveci* genotypes in the Spanish population. Clin. Infect Dis. **39**:123-128.
- 7- Montes-Cano, M.A., C. de la Horra, N. Respaldiza, F. J. Medrano, J. M. Varela, and E. J. Calderon.** 2006. Polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii* strains in Spanish children with cystic fibrosis. J. Infect. Dis. **193**: 1332-3.
- 8- Morris, A., F. C. Sciruba, K. A. Norris.** 2008. *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease? COPD. **5**: 43-51.
- 9- Morris, A., K. Wei, K. Afshar, and L. Huang.** 2008. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. J. Infect. Dis. **197**:10-17.
- 10- Norris, K. A., A. Morris, S. Patil, and E. Fernandes.** 2006. *Pneumocystis* colonization, airways inflammation and pulmonary decline function in acquired immunodeficiency syndrome. Immunol. Res. **36**:175-187.
- 11- Respaldiza, N., M. A. Montes-Cano, F. J. Dapena, C. de la Horra, I. Mateos, F. J. Medrano, E. J. Calderon, and J. M. Varela.** 2005. Prevalence of colonization and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. Clin. Microbiol. Infect. **11**:1012-1015.
- 12- Rivero, L., C. de la Horra, M. A. Montes-Cano, A. Rodriguez-Herrera, N. Respaldiza, V. Friaiza, R. Morilla, S. Gutierrez, J. M. Varela, F. J. Medrano, and E. J. Calderon.** 2008. *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. Emerg. Infect. Dis. **14**: 1116-8.
- 13- Sing, A., A. M. Geiger, M. Hogardt, and J. Heeseman.** 2001. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. J. Clin. Microbiol. **39**: 2717–2718.

**14- Wissmann, G., M. J. Alvarez-Martinez, S. R. Mesnhick, A. R. Diehl, and J. C. Prolla.** 2006. Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. *J. Eukaryot. Microbiol.* **53**:305-307.

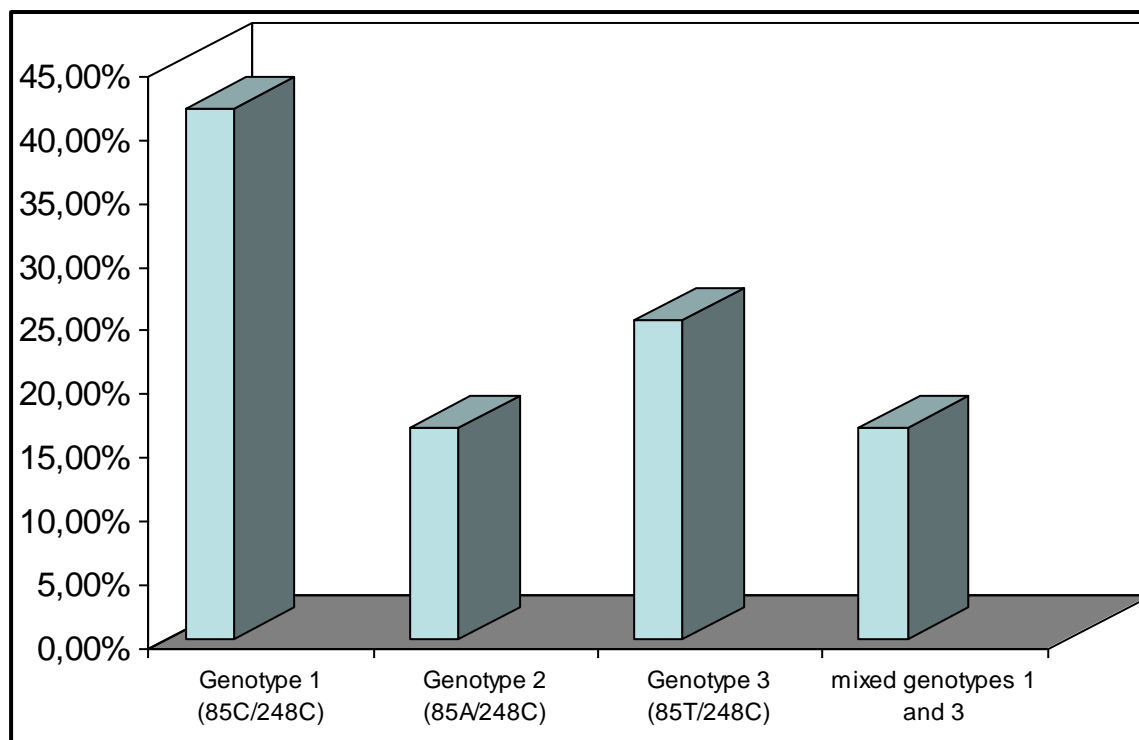
Table 1. Demographic and clinical data from 34 Brazilian cystic fibrosis patients according to *Pneumocystis jirovecii* colonization

Characteristic	Patients with <i>P.jirovecii</i> colonization (n=13)	Patients without <i>P.jirovecii</i> colonization (n=21)	p-value
Age, median (range)	12 (1-35)	8 (1-22)	0.12 <sup>a</sup>
Male sex, no. (%)	5 (38.7)	12 (57.1)	0.29 <sup>b</sup>
Bacterial colonization, no.(%)	11 (84.6)	18 (85.7)	0.64 <sup>c</sup>
<i>P. aeruginosa</i> colonization, no. (%)	11 (84.6)	11(52.4)	0.06 <sup>c</sup>
Sulfa or azitromicin use, no. (%)	1 (7.7)	4 (19.0)	0.35 <sup>c</sup>
FEV-1% <sup>e</sup> (mean ± SD)	70.9 ± 16.1	67.9±16.3	0.78 <sup>d</sup>
Diabetes mellitus, no. (%)	2 (15.4)	5 (23.8)	0.44 <sup>c</sup>
Pancreatic enzyme use, no. (%)	10 (76.9)	17 (81.0)	0.55 <sup>c</sup>
Moderate to severe malnutrition, no. (%)	2 (15.4)	4 (19.0)	0.58 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Mann-Whitney U-test; <sup>b</sup>Chi-square test with Yates correction; <sup>c</sup>Fisher's exact test;

<sup>d</sup>Student's t-test; <sup>e</sup>Percentage from predicted forced expiratory volume in 1 s.

Figure 1. Rates of genotypes at the mtLSUrRNA *Pneumocystis jirovecii* locus from 34 Brazilian cystic fibrosis patients.



## 5- CONCLUSÕES

A colonização pelo *Pneumocystis jirovecii* foi observada em 38,2 % (13/34) dos pacientes com Fibrose Cística que foram submetidos à coleta do lavado broncoalveolar entre março de 2004 e agosto de 2007.

A caracterização genotípica demonstrou o predomínio dos subtipos 1 (85C/248C) e 3 (85T/245C) à análise da Grande Subunidade do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA). Na análise do gene da Diidropteroato sintetase, todas as amostras apresentaram o chamado genótipo selvagem (55Treonina/57Prolina).

Não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa entre os dados clínico-demográficos coletados, entre os quais dados relacionados com a severidade da Fibrose Cística, e a presença da colonização pelo *P. jirovecii*.

## 6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A colonização por *P. jirovecii* nas doenças pulmonares crônicas é um tema que, nos últimos anos, tem merecido a atenção de diversos pesquisadores. As evidências obtidas nos recentes estudos que envolveram pacientes com a Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica demonstraram que a colonização pode estar associada a uma piora na evolução da doença.

Poucos estudos foram publicados até o momento sobre a colonização por *P. jirovecii* em pacientes com Fibrose Cística. O estudo aqui apresentado vem contribuir com novos dados sobre a colonização em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Através da utilização de técnicas moleculares implantadas no Centro de Pesquisa Experimental, foi possível concluir esta pesquisa, a primeira a ser realizada no Brasil sobre a epidemiologia molecular do *P. jirovecii* na Fibrose Cística.

As seguintes contribuições podem ser destacadas: o sucesso da metodologia utilizada; a detecção de uma alta taxa de pacientes colonizados; a

concordância dos resultados da genotipagem da subunidade maior do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA) com estudos prévios. Estes aspectos são detalhados a seguir.

A metodologia utilizada apresentou ótimos resultados em relação à extração do DNA e aos testes de detecção e genotipagem das regiões da Diidropteroato sintetase e da mtLSUrRNA do *P. jirovecii*. A cuidadosa extração do DNA das lâminas citológicas permitiu a amplificação de todas as amostras estudadas, demonstrando que é possível extrair um material adequado a partir dessas lâminas, coradas pelo método de Giemsa e guardadas em arquivo sem necessidades específicas para conservação.

A taxa de colonização demonstrada neste estudo foi de 38,2% dos pacientes avaliados. Esta taxa é maior do que a de 21,5% relatada por Respaliza e cols no ano de 2005, possivelmente pela diferença no espécime clínico analisado: nossa pesquisa utilizou amostras de lavado broncoalveolar enquanto o estudo anterior foi realizado em amostras de escarro ou lavado de orofaringe dos pacientes.

A grande porcentagem de indivíduos colonizados demonstra a significativa presença do *P. jirovecii* nesta população. É fundamental que estudos com maior número de pacientes busquem avaliar a associação entre a colonização e o curso clínico da Fibrose Cística, como já realizado em algumas pesquisas sobre o microorganismo na Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica. Na série de 34 casos aqui analisada, não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa entre as variáveis clínico-demográficas e a colonização.

Os resultados da predominância dos genótipos 1 e 3 da região mtLSUrRNA do *P. jirovecii* confirmaram os achados observados em dois estudos prévios. A análise desta região do DNA, que já vinha sendo referida como de utilidade na análise da distribuição geográfica do microorganismo, traz agora evidências de que determinados genótipos possam estar mais adaptados para colonizar pacientes com determinadas doenças. Novos estudos certamente são necessários neste tópico específico.

A realização deste estudo esteve integrada à colaboração acadêmica existente entre o grupo de estudos sobre *Pneumocystis* do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e o grupo coordenado pelo Prof. Enrique Calderón no Hospital



Universitário Virgen del Rocío, Universidade de Sevilla, Espanha. Esta colaboração permitiu o aprendizado das técnicas moleculares descritas, que são parte da tecnologia agora introduzida no nosso meio e que serão aplicadas em novos projetos sobre a epidemiologia molecular do *P. jirovecii*.