

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

MARIA CARLOTA BORBA BRUM

COLONIZAÇÃO DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE APÓS
CONTATO COM PACIENTES COM PNEUMONIA
POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI*

Porto Alegre, 2010

MARIA CARLOTA BORBA BRUM

**COLONIZAÇÃO DE PROFISSIONAIS DE SAÚDE APÓS
CONTATO COM PACIENTES COM PNEUMONIA
POR *PNEUMOCYSTIS JIROVECI***

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Pneumologia, à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas.

Orientador: João Carlos Prolla

Porto Alegre, 2010

Brum, Maria Carlota Borba Brum

A colonização de profissionais de saúde após contato com
pacientes com Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* - Porto
Alegre, 2010

46f.

Dissertação de Mestrado, Programa de Ciências
Pneumológicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

1. Profissionais de saúde. 2. Colonização.
 3. *Pneumocystis jirovecii*
- I. Título.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS= Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

ASD= *Adult and Adolescent Spectrum of Disease Project*

CDC= *Centers for Disease Control and Prevention*

DHPS= diidropteroato sintetase

DPOC= doença pulmonar obstrutiva crônica

DNA= ácido desoxirribonucléico

GOLD= *Global Health Initiative on Obstructive Disease*

HIV= Vírus da Imunodeficiência Humana

ITS= *internal transcribed spacer from nuclear RNA ribosomal gene locus*

mtLSUrRNA= grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial

mtSSUrRNA= pequena subunidade do RNA ribossômico mitocondrial

MTX= metrotexato

PCR: reação em cadeia pela polimerase

PcP= pneumonia pelo *Pneumocystis*

RNA= ácido ribonucléico

SIV= Vírus da Imunodeficiência Símia

SUS= Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

1. Resumo / 6

2. Revisão da literatura / 8

2.1. O fungo denominado *Pneumocystis jirovecii* / 8

2.2. A pneumonia pelo *Pneumocystis* / 11

2.3. A transmissão do *P. jirovecii* por via aérea / 14

2.4. A colonização pelo *P. jirovecii* / 16

2.5. A colonização nos profissionais de saúde / 19

3. Referências bibliográficas da revisão da literatura / 21

4. Justificativa do estudo / 27

5. Objetivos / 28

6. Artigo a ser encaminhado ao *Journal of Infectious Diseases* / 29

7. Conclusões / 41

8. Considerações finais / 42

9. Anexos / 44

9.1. Anexo I: As espécies de *Pneumocystis* / 44

9.2. Anexo II: Genótipos do *P. jirovecii* utilizados na epidemiologia molecular / 45

9.3. Anexo III: Obtenção das amostras e detecção do *P. jirovecii* / 46

1. Resumo

Introdução. A colonização pelo *Pneumocystis jirovecii* foi demonstrada em diversos grupos, como pacientes imunossuprimidos pela infecção do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), pacientes com doenças pulmonares crônicas e gestantes. Alguns estudos têm sugerido que os profissionais de saúde podem tornar-se colonizados após contato com pacientes com a pneumonia por *Pneumocystis* (PcP).

Objetivos. Identificar a colonização pelo *P. jirovecii*, através de técnicas moleculares, em profissionais de saúde que apresentam contato ocupacional com pacientes com PcP no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Verificar a duração desta colonização. Analisar as variáveis clínico-demográficas dos pacientes com PcP que podem estar relacionadas à transmissão do *P. jirovecii* ao profissional de saúde.

Métodos. Foi realizada uma *nested-PCR* para a detecção do *P. jirovecii* no lavado de orofaringe de 27 profissionais expostos a pacientes com PcP (médico; enfermeiro; técnico/auxiliar de enfermagem) e de 36 profissionais administrativos, no período de janeiro a agosto de 2008. As amostras de lavado da orofaringe foram obtidas na primeira, segunda e oitava semana após o contato com um paciente para avaliar o início e a duração da colonização pelo *P. jirovecii*. A *nested-PCR* utilizou os primers pAZ-102-A e pAZ-H no primeiro round e pAZ 102-X e pAZ 102-Y no segundo, para a amplificação da grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA) do microorganismo. Foram coletados os dados clínicos e demográficos dos pacientes com PcP através da revisão dos prontuários médicos.

Resultados. A colonização pelo *P. jirovecii* foi observada em 33,3% (9/27) dos profissionais expostos, com uma duração que variou entre uma a duas semanas após o contato inicial com o paciente. Entre os profissionais não-expostos, foram identificados somente dois colonizados entre 36 indivíduos ($p < 0,05$). Não foi identificada associação entre as características clínicas e demográficas dos pacientes com PcP e a colonização dos profissionais de saúde.

Conclusões: Os profissionais de saúde em contato com os pacientes com PcP apresentaram uma taxa de colonização superior aos indivíduos não expostos. Este achado é sugestivo de uma transmissão nosocomial do microorganismo. Os profissionais de saúde podem constituir importante reservatório e fonte de infecção do fungo a outros pacientes.

2. Revisão da literatura

2.1. O fungo denominado *Pneumocystis jirovecii*

A história do gênero *Pneumocystis* iniciou no Brasil, quando Carlos Chagas (1879-1934) descobriu sua forma cística em 1909. No Instituto Manguinhos do Rio de Janeiro, o pesquisador observou esse achado nos pulmões de cobaias que haviam sido inoculadas com sangue de crianças com tripanossomíase e concluiu erroneamente que se tratava de uma nova forma do *Trypanossoma cruzi* (1).

Em 1910, Antonio Carini (1872-1950), do Instituto Pasteur de São Paulo, identificou cistos semelhantes nos pulmões de *Ratus norvegicus* infectados com *Trypanossoma lewisi* (2). Suspeitando que os cistos pudessem corresponder a um novo microorganismo, Carini enviou amostras deste tecido pulmonar para Charles Louis Alphonse Laveran, do Instituto Pasteur em Paris, que havia recebido o Prêmio Nobel por seus estudos sobre malária em 1907. Dois estudantes franceses do Instituto Pasteur na época, o casal Delanoe, realizaram novos experimentos e concluíram que os cistos pulmonares descritos por Chagas e Carini não se referiam a tripanossomas e sim a uma nova entidade biológica. Em 1912, eles sugeriram o nome *Pneumocystis carinii*: “pneumo” por ter tropismo pelo pulmão, “cystis” por sua forma característica e “carinii” em homenagem a Antonio Carini (3,4).

O *Pneumocystis* foi inicialmente considerado um protozoário, em virtude da semelhança morfológica do microorganismo e da resposta a medicamentos geralmente utilizados para tratar infecções por protozoários. Entretanto, alguns pesquisadores sugeriram que o microorganismo poderia se tratar de um fungo, ainda que não tivesse ergosterol na membrana plasmática e não crescesse em meios de cultura usuais (4). Em 1988, Edman e colaboradores (5) enfim publicaram a análise genética do microorganismo, demonstrando que o mesmo trata-se de um fungo.

Em 1976, Frenkel (6) demonstrou que o *Pneumocystis* encontrado em ratos desencadeava uma resposta antigênica diferente do microorganismo observado em humanos. Esta foi a primeira evidência de que poderiam existir distintas espécies de *Pneumocystis*.

No final da década de 1980, tornou-se evidente que existem espécies de *Pneumocystis* específicas para diferentes hospedeiros, com características genômicas e antigênicas distintas entre os diversos mamíferos. Apesar de quase um século sendo considerado como uma única entidade taxonômica, os dados atuais demonstram claramente que corresponde a um grupo heterogêneo de populações geneticamente isoladas umas das outras, que foram submetidos a processos de adaptação em cada espécie (4).

Cada espécie de *Pneumocystis* passou a ser denominada conforme o seu hospedeiro específico, com marcantes diferenças em relação à morfologia ultraestrutural, proporção das formas cisto e esporo, localização no alvéolo pulmonar, tempo de duplicação in vivo, especificidade do hospedeiro e patogenicidade (7).

O gênero *Pneumocystis* compreende, até o momento, as seguintes espécies: *P. murina* em camundongos (*Mus Musculus*), *P. carinii* e *P. wakefieldiae* em ratos da espécie *R. norvegicus*, *P. oryctolagi* em coelhos e o *P. jirovecii* em humanos. Outros *Pneumocystis* foram identificados em macacos de diversas espécies, em furões, em cavalos, em porcos e em cachorros, mas ainda sem denominação específica. A tabela do Anexo I apresenta a diversidade do gênero *Pneumocystis* e os autores que identificaram cada espécie. A existência de duas espécies para o mesmo hospedeiro é observada somente nos ratos e ambas são específicas deste hospedeiro (7,8).

Assim, hoje está claro que a pneumonia pelo *Pneumocystis* (PcP) não é uma zoonose. O microorganismo que infecta especificamente o homem é hoje chamado *Pneumocystis jirovecii*. Este nome foi proposto por Stringer e Wakefield (9,10) em 2002, em memória ao parasitologista Otto Jirovec, a quem é atribuída a primeira descrição do fungo em humanos.

Atualmente, as técnicas moleculares podem fazer a caracterização genotípica do *P. jirovecii*. A genotipagem do fungo pode colaborar nos estudos sobre a transmissão e a colonização do microorganismo em diferentes populações. As genotipagens mais usadas na epidemiologia molecular do *P. jirovecii* são baseadas na análise das seguintes regiões genômicas: a grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA), a pequena subunidade do RNA ribossômico mitocondrial (mtSSUrRNA), o gene que codifica a enzima diidropteroato sintetase (DHPS) e as *internal transcribed spacer 1* e 2 (11,12,13). A tabela do Anexo II apresenta os genótipos do mais estudados.

2.2. A Pneumonia pelo *Pneumocystis*

Em 1938, foi relatada uma pneumonia de causa desconhecida e que afetava bebês prematuros e crianças mal nutridas. Esta infecção respiratória, denominada pneumonia intersticial de células plasmáticas, atingiu proporções epidêmicas na Europa Central durante a Segunda Guerra Mundial e nos anos subseqüentes (14). Em 1952, Jírovec e colaboradores (9) identificaram o *Pneumocystis* como agente etiológico desta pneumonia, ainda sem tratamento efetivo.

A taxa de mortalidade da pneumonia causada pelo *Pneumocystis* veio a cair drasticamente pelo uso da Pentamidina, cujo efeito sobre o microorganismo foi descoberto em 1958 (15). Nas décadas seguintes, casos esporádicos da chamada pneumonia intersticial de células plasmáticas foram descritos em crianças imunodeficientes e em adultos imunodeprimidos (4).

Masur e colaboradores (16) relataram, em 1981, 11 casos de pneumonia por *Pneumocystis* no período entre 1979 a 1981. Os pacientes apresentavam deficiência de imunidade, demonstrada pela diminuição da contagem dos linfócitos T, embora mantivessem intacta a imunidade humoral. Oito pacientes morreram e três sobreviveram. Naquele momento, ainda não era conhecida a causa desta imunossupressão, mais tarde reconhecida como a infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV).

A seguir, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) tornou-se uma pandemia e o *Pneumocystis* foi o agente que causou pneumonia em cerca de 60% dos pacientes no momento do diagnóstico da síndrome, conforme dados norte-americanos publicados em 1986 (17).

Com a terapia antiretroviral combinada, a partir do ano de 1996, as taxas de PcP passaram a diminuir consideravelmente entre os pacientes com AIDS (18). O *Adult and Adolescent Spectrum of Disease Project*, desenvolvido pelo *Center for Disease*

Control and Prevention, analisou a ocorrência de infecções diversas em sujeitos infectados pelo vírus HIV em 10 cidades norte-americanas e em Porto Rico. Os resultados demonstraram que a prevalência da PcP diminuiu somente 3,4% entre 1992 a 1995, enquanto que no período entre 1996 e 1998 a queda foi de 21,5%. É importante ressaltar que, ainda que a utilização da terapia antiretroviral combinada trouxe um significativo declínio das infecções associadas à AIDS nos países desenvolvidos, a pneumonia por *Pneumocystis* (PcP) ainda é observada como uma das infecções mais comuns no momento do diagnóstico da AIDS nos Estados Unidos. (19)

Nos países em desenvolvimento, especialmente na África, pode ser observado um quadro muito distinto. Nestes países, os relatos sempre indicaram que a incidência da PcP foi suplantada pela da tuberculose como causa de infecção respiratória nos pacientes com AIDS. Recentemente, alguns estudos têm demonstrado um aumento dos casos de PcP entre pacientes infectados pelo HIV, o que pode em parte ser explicado pelo uso de testes diagnósticos mais adequados. Ainda que a análise das taxas de PcP nos países em desenvolvimento seja limitada pela falta de uniformidade na metodologia dos estudos realizados, parece claro que a AIDS e a PcP são sérios problemas de saúde pública nos países em desenvolvimento (20).

No Brasil, utilizando dados do Programa Nacional de Controle da AIDS, Marins e colaboradores (21) analisaram a frequência das infecções oportunistas no período anterior ao uso das drogas antiretrovirais e no período 1995-1996. Em nosso país, a distribuição do Zidovudine iniciou em 1991, a dos inibidores não-análogos da transcriptase reversa em 1993 e a dos inibidores de protease em 1996. Em relação às infecções no momento do diagnóstico da AIDS, o estudo revelou que, em 1995, a tuberculose esteve presente em 35% dos pacientes, enquanto que a PcP esteve em 15%; no ano seguinte, estas taxas foram de 26% e 13%, respectivamente. Os autores

ressaltaram que o uso da quimioprofilaxia contra o *Pneumocystis* é também responsável pelo menor número de casos de PcP.

Atualmente, tem sido relatado um aumento da incidência da PcP entre indivíduos HIV-negativos, como pacientes com câncer, transplantados e portadores de doenças reumatológicas. A imunossupressão, nesses casos, é consequência da própria doença ou de uma terapia agressiva utilizada. Em pacientes oncológicos que não recebem quimioprofilaxia, a taxa de PcP varia de 22% a 45%, conforme o tipo de neoplasia. Entre os transplantados de pulmão, esta frequência chega a ser maior que 25% quando comparado com uma média de 5% a 10% em outros transplantados de órgãos (22). Entre pacientes com enfermidades reumatológicas, a PcP é descrita em 0,4% dos pacientes com artrite reumatóide que são submetidos ao tratamento com Infliximab, um droga que inibe o fator de necrose tumoral (23). Outros estudos tem confirmado a associação entre a PcP e o uso de agentes biológicos no tratamento de doenças reumatológicas (24,25).

2.3. A transmissão do *Pneumocystis jirovecii* por via aérea

Considerava-se que a pneumonia pelo *Pneumocystis* ocorria em pacientes imunossuprimidos através da reativação de uma infecção latente adquirida na infância. Esta hipótese era baseada nos estudos sorológicos que demonstram a presença de anticorpos anti-*Pneumocystis* nos primeiros anos de vida, mostrando que o contato com o microorganismo já é frequente neste período (26).

Entretanto, novos estudos em animais e humanos, alguns dos quais utilizando técnicas de biologia molecular para a caracterização genotípica do fungo, descartaram esta hipótese da infecção latente e comprovaram que a infecção pelo *P. jirovecii* é uma reinfecção exógena, cuja transmissão ocorre por via aérea, de pessoa a pessoa (27,28,29).

Neste sentido, Keely e colaboradores (30, 31) demonstraram que, nos casos de pneumonias recorrentes nos mesmos pacientes, eram encontrados diferentes genótipos ITS 1 e ITS 2 e também diferentes genótipos da mtLSUrRNA. Estes resultados tiveram impacto ao demonstrar que a PcP ocorre por reinfecção.

Schmoldt e colaboradores (32), ao investigarem um grupo de 16 casos de PcP em transplantados renais que não utilizaram profilaxia anti-PcP, observaram que esses indivíduos haviam recebido o transplante no mesmo hospital e frequentavam o mesmo local de internação e ambulatórios. A concordância de quatro genótipos - ITS1, 26S, mt26S e β -tub- do *P. jirovecii* obtido dos pacientes demonstrou que todos tiveram uma infecção pelo mesmo subtipo do microorganismo, indicando a transmissão do fungo entre esses indivíduos. Recentemente, Hauser e colaboradores (33) também obtiveram um achado similar ao analisar a genotipagem do *P. jirovecii* de pacientes transplantados renais que desenvolveram quadros de PcP e que tiveram contato entre si no ambiente hospitalar.

No estudo reportado por Rivero e colaboradores (34) em 2008, foi identificada a transmissão do *Pneumocystis* a partir de idosos, que eram colonizados pelo microorganismo, para uma criança de seis meses que veio a desenvolver PcP. Os idosos eram portadores de artrite reumatóide e bronquite crônica e apresentavam-se colonizados por *P. jirovecii* de mesmo genótipo do isolado na paciente, quando analisadas as regiões da DHPS e da mtLSUrRNA.

A concordância de pelo menos dois genótipos é uma forte evidência de que se trata de um *P. jirovecii* de mesma origem (12,34).

2.4. A colonização pelo *P. jirovecii*

Os métodos de estudo do *Pneumocystis* através Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), de alta sensibilidade, passaram a demonstrar o microorganismo em quantidade não detectada pelos métodos citológicos nos espécimes respiratórios (lavado broncoalveolar, escarro, lavado de orofaringe, material nasofaríngeo coletado por *swab* nasal) de indivíduos que não apresentam o quadro clínico de PcP. Este achado passou a ser descrito como colonização ou estado de portador assintomático pelo *Pneumocystis jirovecii* no ser humano (35).

Diversos estudos relataram a frequente colonização de portadores do vírus HIV pelo *P. jirovecii*. Davis e colaboradores (36) relataram uma prevalência de colonização de 68% entre 172 pacientes avaliados e identificaram, como fatores de risco para a presença do microorganismo, uma contagem de linfócitos CD4 abaixo de 50 cels/ μ l e a ausência de quimioprofilaxia anti-PcP.

Morris e colaboradores (37) observaram uma taxa de 46% de colonização pelo fungo entre 91 pacientes com o vírus HIV e descreveu o tabagismo como um fator de risco para a colonização.

O período de duração da colonização paciente imunossuprimido pode ser prolongado. Como a prevalência de colonização é alta, o grupo de pacientes HIV-positivo pode ser importante como reservatório e fonte de transmissão do *P. jirovecii* para outros indivíduos susceptíveis (38,39).

A imunossupressão pelo uso de corticóides também foi associada à colonização pelo fungo. Maskel e colaboradores (40) detectaram uma taxa de 18% de colonizados em 93 pacientes submetidos à broncoscopia devido a diversas doenças e observaram o uso de corticóide como fator de risco para a colonização pelo *P. jirovecii*. Foi detectada a colonização em 44% dos pacientes que estavam recebendo corticóide e 12% dos que não usaram este tratamento. A associação entre a colonização e o uso

de corticóide também foi demonstrada por Helweg-Larsen e colaboradores (41) ao analisar 367 pacientes com pneumonia bacteriana.

A colonização em adultos portadores de doenças crônicas foi demonstrada em vários estudos, como o realizado por Probst e colaboradores (42), em pacientes portadores de doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), fibrose cística e câncer de pulmão, que apresentaram uma prevalência de de 2,6% a 35%, respectivamente.

Em estudo realizado na Espanha com pacientes com fibrose cística, foi identificada colonização pelo *Pneumocystis* em 21,6% dos pacientes (43). Neste mesmo país, foi observada uma alta taxa de colonização pelo *P. jirovecii* (40,9%) em pacientes com doenças pulmonares crônicas na Espanha. É conhecida uma variação da distribuição geográfica do microorganismo, o que pode explicar diferentes taxas de colonização observadas em estudos de países distintos (44).

Taxas de colonização de 36,7% de colonização em pacientes com DPOC em estágio grave (*Global Health Initiative on Obstructive Lung Disease – GOLD – Estágio IV*) e de 5.3% em fumantes com função pulmonar normal ou DPOC menos grave foram identificadas em estudo com pacientes com doença pulmonar crônica. No estudo, o estágio IV foi um forte preditor da colonização pelo *Pneumocystis*, independente do hábito de fumar (45).

A hipótese atual é que as bactérias, ou outros microorganismos como o *Pneumocystis*, produzem dano aos pulmões, prejudicando a habilidade do sistema respiratório em eliminar a infecção, resultando na sua persistência, estimulando a inflamação crônica e acelerando o declínio da função pulmonar, associado ou não com a presença de exposição ao tabaco. A resposta inflamatória, por sua vez, estimula uma variada resposta dos tecidos incluindo proliferação dos fibroblastos e fibrose peribronquiolar, hiperplasia da mucosa, destruição da matriz extracelular e apoptose das células, levando à perda dos septos alveolares (46).

O grupo dos pacientes reumatológicos também foi alvo de investigação sobre a colonização. Mori e colaboradores (47) investigaram a presença do *P. jirovecii* em amostras de escarro e de lavado broncoalveolar de pacientes com artrite reumatóide, observando uma taxa de 10,9%. Outro estudo observou uma taxa de 25% entre pacientes com doença reumatológica. Como este grupo de pacientes é frequentemente tratado com drogas imunossupressoras, foi proposto que a pesquisa da colonização pelo *P. jirovecii* pode identificar os pacientes de maior risco de desenvolver PcP antes de iniciar o tratamento reumatológico (48).

A alteração da imunidade relacionada à gestação também pode aumentar o risco de colonização pelo *Pneumocystis*. Entre 33 gestantes assintomáticas no terceiro trimestre da gestação, 15% estavam colonizadas, enquanto o *P. jirovecii* não foi detectado em nenhuma de 28 mulheres que não estavam grávidas (49).

Existem evidências que apontam para a existência de uma colonização – provavelmente transitória – no ser humano imunocompetente, que poderia atuar como um reservatório para a transmissão do *P. jirovecii*: a) num modelo experimental que utilizou camundongos, foi demonstrada a transmissão aérea do *P. muris* entre animais imunocompetentes colonizados e imunossuprimidos, os quais vieram a desenvolver pneumonia. Foi demonstrado que o patógeno se multiplica ativamente no pulmão do imunocompetente, mantendo sua infectividade (50); b) uma alta prevalência de anticorpos anti-*Pneumocystis* é observada na população em geral, o que demonstra que os indivíduos são expostos de forma repetida ao microorganismo (51,52); foi descrita a colonização por *P. jirovecii* em 21,5% de indivíduos numa faixa etária específica (indivíduos idosos), através da análise do material coletado pelo lavado de orofaringe e *swab* nasal (53).

2.5. A colonização nos Profissionais de Saúde

Há poucos estudos publicados sobre a colonização de profissionais da saúde pelo *P. jirovecii*, Vargas e colaboradores (54) demonstraram, em estudo publicado em 2000, a colonização de dois profissionais - um médico e uma enfermeira – e da mãe de uma criança de 8 meses, HIV negativo, com quadro de PcP. Foram coletadas amostras de swab nasal destes três expostos e de 30 controles entre outros profissionais do hospital sem exposição ao paciente e sem evidência de imunossupressão. Após amplificação do DNA (mstLrRNA e ITS 1 e 2), foram identificadas amostras positivas para *Pneumocystis* nos profissionais expostos e todas negativas entre os profissionais não expostos, levantando a hipótese de transmissão a partir do paciente com PcP. Não foi avaliada a duração da colonização.

O tema foi também investigado por Miller e colaboradores (55) em 2001, relatando a presença do fungo em profissionais imunocompetentes que trabalhavam em contato próximo com pacientes com PcP. Através da aplicação da PCR em amostras de escarro induzido e aspirado nasal, os autores observaram que os médicos que realizavam broncoscopia em pacientes com PcP encontravam-se colonizados pelo *P. jirovecii*.

Durand-Joly e colaboradores (56) investigaram a presença do fungo no lavado da orofaringe de profissionais de saúde de um Hospital Universitário em Lille, na França, em 2003. Os autores demonstraram que, entre 164 profissionais, 8% (7/90) dos profissionais que trabalhavam com pacientes imunossuprimidos no Setor de Hematologia apresentavam-se colonizados pelo *P. jirovecii*, enquanto que nenhum dos profissionais dos setores de Emergência Pediátrica (0/35) e da Pneumologia (0/39) estava colonizado. Estes resultados sugeriram os que pacientes imunossuprimidos, possivelmente colonizados pelo fungo, transmitiram o microorganismo aos profissionais de saúde. Neste estudo, a duração da colonização foi estudada somente

em quatro profissionais e variou de 3 a 10 semanas e não sendo identificado o paciente fonte que transmitiu o *Pneumocystis* aos profissionais.

Uma questão relevante no estudo da colonização pelo *P. jirovecii* em profissionais de saúde é o fato de que os sujeitos colonizados podem transmitir o patógeno a outros indivíduos, alguns dos quais susceptíveis de desenvolver PcP.

Foi demonstrado por Chabé e colaboradores (41), em modelo animal, que ratos imunocompetentes podem, após tornarem-se colonizados, transmitir o fungo a ratos imunossuprimidos que então desenvolvem o quadro de PcP. Em seres humanos, tem sido descrita a possibilidade de que os indivíduos colonizados possam servir como reservatório do patógeno e transmití-lo para outros (34,35,50). O profissional de saúde poderia, assim, ser um reservatório para o *P. jirovecii* no ambiente hospitalar.

3. Referências bibliográficas da revisão da literatura

- 1- 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.
- 2- Carini A. Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. **Bol Soc de Med e Cir de Sao Paulo** **1910**;18: 204.
- 3- 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.
- 4- Calderon E, Varela-Aguilar J, Medrano-Ortega F, et al. Historical perspective on *Pneumocystis jirovecii* infection. **Protist** **2002**;153:303-310.
- 5- 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.
- 6- Frenkel JK. *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. **National Cancer Institute Monograph** **1976**;43:13-30.
- 7- Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, et al. *Pneumocystis* species: coevolution and pathogenic power. **Infections, Genetics and Evolution** **2008**;8:1-70.
- 8- Wissmann G, Morilla R, Friaza V, Calderón E, et al. El ser humano como reservóio de *Pneumocystis*. **Enferm Infec Microbiol Clin** **2010**;28:38-43.
- 9- Vanêk J, Jírovec O, Lukes J. Interstitial plasma cell pneumonia in infants. **Ann Pediatr** **1953**;180:1–21.
- 10- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, et al. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. **Emerg Infect Dis** **2002**;8:891-896.
- 11- Nevez G; Totet A; Jounieaux V, et al. *Pneumocystis jiroveci* internal transcribed spacer types in patients colonized by fungus and in patients with pneumocystosis from the same french geografic region. **J Clinl Microbiol** **2003**;41:181-186.

- 12- Beard C, Roux P, Nevez G, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. **Emerg Infect Dis** 2004;10:1729-1735.
- 13- 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.
- 14- Ammich O. Über die nichtsyphilitische interstitielle penumonie dès ersten kindsalters. **Virchows Arch Pathol Anat** 1938;302: 539-554.
- 15- Ivady G, Paldy L. Ein neues behandlungsverfahren der interstitiellen plasmazelligen pneumonie fruhgeborener mit funfwertigem stibium und aromatischen diamidenien. **M Schr Kinderheik** 1958;106:10-14.
- 16- Masur H, Michelis MA, Greene JB, et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. **N Engl J Med** 1981; 305:1431-1438.
- 17- Mills J. *Pneumocystis jirovecii* and *Toxoplasma gondii* infections in patients with AIDS. **Rev Infect Dis** 1986;8:1001-1011.
- 18- Morris A; Lundgren Jens D, Masur H, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. **Emerg Infect Dis** 2004;10:1-13
- 19- Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, et al. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. **Clin Infect Dis** 2000;30:5S-14.
- 20- Fisk D T, Meshnick S, Kazanjian PH. *Pneumocystis jirovecii* in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. **Clin Infect Dis** 2003;36:70-78.
- 21- Marins JRP, Jamal LF, Chen SY, et al. Dramatic improvement in survival among adult brazilian AIDS patients. **AIDS** 2003;17:1675-1682.
- 22- Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. **Clin Infect Dis** 2002;34:1098-1107.

- 23- Takeuchi T, Tatsuki Y, Nogami Y, et al. Post-marketing surveillance of the safety profile of infliximab in 5,000 Japanese patients with rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis** 2008;67:189-194.
- 24- Harigai M, Koike R, Miyasaka N. *Pneumocystis* pneumonia associated with infliximab in Japan. **N Engl J Med** 2008;357:1874-1876.
- 25- Kaur N, Mahl TC. *Pneumocystis jiroveci* (*carinii*) pneumonia after infliximab therapy: a review of 84 cases. **Dig Dis Sci** 2007;52:1481-1484.
- 26- 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.
- 27- Beard CB, Carter JL, Keely S P, et al. Genetic variations in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. **Emerg Infect Dis** 2000;6(3):265-272.
- 28- Rabodonirina M, Vanhems P, Couray-Targe S, et al. Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. **Emerg Infect Dis** 2004;10:1766-1773.
- 29- Nevez G; Totet A, Jounieaux V, et al. *Pneumocystis jiroveci* internal transcribed spacer types in patients colonized by fungus and in patients with pneumocystosis from the same french geografic region. **J Clin Microbiol** 2003;41:181-186.
- 30- Keely SP, Stringer JR. Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. **J Clin Microbiol** 1997;33:2745-2747.
- 31- Keely S, Stringer JR. Multi-locus genotype switching in *Pneumocystis carinii* sp. f. hominis: evidence for reinfection. **J Euk Microbiol** 1996;43:50S.

- 32- Schmoldt S, Schuegger R, Wendler T, et al. Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. **J Clin Microbiol** 2008;46:966–971.
- 33- Hauser PM, Fehr T, Mueller NJ. Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among renal transplant recipients. **Transpl Infect Dis** 2009;12:1-10.
- 34- Rivero L, De La Horra C, Montes-Cano M A, et al. *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. **Emerg Infect Dis** 2008;14:1116-1118.
- 35- Huang L, Crothers K, Morris A, et al. *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. **J Euk Microbiol** 2003,suppl: 126S-128S.
- 36- Davis JL, Welsh DA, Beard CB, et al. *Pneumocystis* colonization is common among hospitalized HIV- infected patients with non-*Pneumocystis* pneumonia. **Thorax** 2008;63:329–34.
- 37- Morris A, Kingsley LA, Groner G, et al. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV infected-men. **AIDS** 2004;18:793–8.
- 38- Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE, et al. Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. **J Infect Dis** 2008;187:901–908.
- 39- Nevez G, Raccurt C, Vicent P, et al. Pulmonary colonization with *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus negative patients: assessing risk with blood CD4 T cells counts. **Clin Infect Dis** 1999 1331-133.
- 40- Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. **Thorax** 2003;58:594-7.

- 41- 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.
- 42- Probst M, Ries H, Schmidt-Wieland T. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in patients with chronic lung diseases. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2000;19:644-645.
- 43- 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.
- 44- Calderón E, 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.
- 45- Morris A, Scirba Frank C, Lebedeva IP, et al. Association of chronic obstructive pulmonary disease severity and *Pneumocystis* colonization. **Am J Respir Crit Care Med** 2004;170:408-413.
- 46- Morris A, Scirba FC, Karen A. *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease. **COPD** 2008;5:43-51.
- 47- Mori S, Cho I, Sugimoto M. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in elderly patients with rheumatoid arthritis in Japan: a possible association between colonization and development of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia during low-dose MTX therapy. **Mod Rheumatol** 2008;18:240-246.
- 48- Wissmann G, Morilla R, Martin-Garrido M, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients with infliximab. **Eur J Clin Invest** 2010, epub ahead of print 12 Nov.
- 49- Vargas SL, Ponce CA, Sanchez CA, et al. Pregnancy and asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii*. **Emerg Infect Dis** 2003;5:605–606.

- 50- Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, et al. Immunocompetent host as a reservoir of *Pneumocystis* organism: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2004; 23:89-97.
- 51- Medrano FJ, Respaldiza N, Medrano A, et al. Seroprevalence of *Pneumocystis* human infection in Southern Spain. **J Euk Microbiol** 2003;50:649-650.
- 52- Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano A, et al. 2004. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in spanish children. **Clin Microbiol Infect** 2004;10:1029-1031.
- 53- Vargas SL, Pizarro P, López-Vieyra M, et al. *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory samplig. **Clin Infect Dis** 2010;50:19-21.
- 54- Vargas SL, Ponce CA, Giglioti Fs, et al. Transmission of *Pneumocystis jirovecii* DNA from a patient with *P. jirovecii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. **J Clin Microbiol** 2000;1536-1538.
- 55- Miller RF, Ambrose HE, Wakefield A. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. **J Clin Microbiol** 2001;3877-3882.
- 56- Durand-Joly I, Soula F, Chabé M, et al. Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: a challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. **J Euk Microbiol** 2003;614-615.

4. Justificativa do estudo

A colonização pelo *P. jirovecii* tem sido descrita nos últimos anos e algumas evidências indicam que possa ter importância na transmissão do fungo a indivíduos suscetíveis. Sob este aspecto, a possibilidade de transmissão do patógeno a partir de pacientes com PcP para profissionais de saúde necessita ser avaliada, tendo em vista o risco destes profissionais tornarem-se fontes de infecção no ambiente hospitalar. Até o momento, foram publicados somente três estudos sobre a colonização por *P. jirovecii* em profissionais de saúde expostos a pacientes que apresentam PcP. O estudo aqui apresentado busca trazer dados sobre a colonização pelo *P. jirovecii* em profissionais de saúde expostos a pacientes com PcP atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Os resultados do estudo podem colaborar em futuras estratégias de prevenção da PcP e utiliza técnicas moleculares de detecção do microorganismo 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 Sevilha / Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilha, Espanha.

5. Objetivos

5.1. Objetivo geral

Determinar, através de técnicas moleculares, a transmissão do *P. jirovecii* de pacientes com PcP a profissionais de saúde no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período entre janeiro a agosto de 2008.

5.2. Objetivos secundários

Observar a duração da colonização no profissional de saúde após o contato inicial com o paciente com PcP.

Identificar as variáveis clínicas ou demográficas dos pacientes com PcP que apresentam associação com a transmissão do *P. jirovecii* a um profissional de saúde.

6. Artigo a ser encaminhado ao *Journal of Infectious Diseases*

Journal of Infectious Diseases / **Brief Report**

Title:

Transmission of *Pneumocystis jirovecii* from *Pneumocystis* pneumonia patients to health workers

Running title: *Pneumocystis*, transmission, health care workers, colonization

Authors:

Maria Carlota Borba Brum^{1*}, Gustavo Wissmann¹, Ruben Morilla², Vicente Friaza², Enrique J. Calderon², João Carlos Prolla¹

Affiliations:

¹Pós-graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

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

*Corresponding Author:

Maria Carlota Borba Brum, MD
Rua Ramiro Barcelos 2350
CEP 90035-903
Porto Alegre, Brazil.

Telephone number: 51-33598222

FAX number: 51-39011101

e-mail: mcbrum@hcpa.ufrgs.br

Abstract word counts: 84

Text Word counts: 1869

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, transmission, health care workers, colonization

Abstract

The colonization of health care workers by *Pneumocystis jirovecii* after occupational contact with patients with pneumonia by *Pneumocystis* (PcP) was studied between January and December 2008, at Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Oropharyngeal wash samples from 27 professionals were obtained at the first, second and eighth week following the contact with a patient to evaluate the onset and duration of *P. jirovecii* colonization. Using nested PCR for the mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtLSUrRNA) in oropharyngeal wash, colonization was identified in 33.3% (9/27) of professionals exposed and in 5.55% (2/36) of individuals in the control group ($p < 0.001$). The study suggests that *P. jirovecii* may be transmitted from patients with PcP to health care workers.

Pneumocystis jirovecii causes an opportunistic infection of considerable morbi-mortality among immunosuppressed patients, especially those suffering from Acquired Immunodeficiency Syndrome. The fungus is air-borne, which was demonstrated by studies using molecular techniques (1).

The development of high-sensitivity Polymerase Chain Reaction (PCR) has gone on to show counts of the microorganism that were not detected by cytological and immunohistochemical methods, in respiratory specimens (bronchoalveolar lavage, sputum, oropharyngeal wash, nasopharyngeal material collected by “nasal swab”) from individuals who do not present with a clinical of PcP. This has been defined as colonization, asymptomatic carrier status or subclinical infection by *Pneumocystis jirovecii* in humans (2).

Several groups of patients were analyzed for *P. jirovecii* colonization. The following are highlighted: i) HIV carriers, for which a 68% rate of colonized subjects was identified; ii) patients with chronic obstructive respiratory disease, in which a prevalence of up to 40.5% and association between colonization and disease severity were noted; iii) pregnant women, in which a 15% colonization rate was reported, likely due to the immunity change that occurs during pregnancy; iiiii) individuals subjected to immunosuppressive treatments, such as rheumatological patients using infliximab, an anti-TNF α agent (3).

The colonization of health care workers by *P. jirovecii* has been poorly studied so far. Vargas et al. (4) identified, for the first time, in 2000, the colonization of two professionals – a physician and a nurse – and of a mother of an 8-month-old infant who presented with PcP. The microorganism was detected through nested PCR in the nasopharyngeal aspirate from these individuals.

In 2001, Miller et al. (5) reported the presence of the fungus in immunocompetent professionals who had close contact with patients with PcP. In analyzing induced sputum and nasal aspirate samples through nested PCR, they observed the colonization of professionals who performed respiratory endoscopy on PcP patients.

Durand-Joly et al. (6) identified, in 2003, the presence of the fungus in the oropharyngeal wash from 8% (7/90) of professionals in contact with immunosuppressed patients at the

Hematology Service, while it was not found in any at the Pediatric Emergency and Pneumology Services. These results point out that patients who were immunosuppressed, colonized or even suffering from PcP probably transmitted the microorganism to health care workers.

The present work aims to study the occupational transmission of *P. jirovecii* at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) by investigating: the colonization frequency after the initial contact of a health care provider with a PcP patient; the clinical and demographical characteristics of PcP patients which could favor the transmissibility of the fungus; the duration of a health care provider's colonization after contact with the source patient.

MATERIALS AND METHODS

Oropharyngeal wash samples were collected from three different professional categories that were caring for patients at the time of the PcP diagnosis: physician, nurse, and nurse technician.

The diagnosis of PcP was carried out using the clinical-radiological findings and the presence of *P. jirovecii* in the bronchoalveolar lavage cytology as a routine procedure at HCPA.

During the months of January to August 2008, 27 health care workers exposed to 9 patients with PcP were included (Table 1). Oropharyngeal wash samples from these professionals were obtained at the first, second and eighth week following the contact with a patient to evaluate the onset and duration of *P. jirovecii* colonization.

For the control group, 36 professionals who performed their activities at the HCPA administrative departments, without exposure to any patient, were evaluated. An oropharyngeal wash sample would be collected from four of these individuals whenever a new PcP case was included in the study.

The oropharyngeal wash consists of gargling a saline solution (0.9% physiological serum) for one minute (7). It is a non-invasive clinical specimen, especially used in epidemiological studies.

The exclusion criteria for this study, both for exposed individuals and for non-exposed ones, considered the presence of one or more factors that are associated with *P. jirovecii* colonization or that may make the identification of the fungus difficult: current use of corticoid (systemic or inhaled), or other immunosuppressive therapy; suffering from diabetes mellitus; from chronic obstructive pulmonary disease; carrying or being believed to be at risk of carrying the HIV virus; having previous or current history of cancer; having presented with any respiratory infection (lower or upper respiratory tract) over the six weeks prior to collection, and pregnancy (5).

The following clinical and demographical data were collected from PcP patients: sex, age, year the HIV infection was diagnosed, CD4 lymphocyte counts, HIV viral load, use of antiretroviral drugs, use of chemoprophylaxis with sulfa drug, serum lactate dehydrogenase (LDH) levels, and measurement of partial pressure of oxygen (paO₂) in arterial blood at the time of admission, drugs used in the treatment of PcP, and progression of the patient (recovery vs. death). PcP was defined as a cause of death by using autopsy information or the diagnosis made by the physician.

In the HCPA Molecular Laboratory for Infectious Diseases, the extraction of DNA from the clinical specimens was carried out using the Qlamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA), as recommended by the manufacturer. Next, a nested PCR was performed for the detection of *P. jirovecii*, with the primers pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3') and pAZ102-H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3') in the first amplification and the primers pAZ102-X (5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAGG-3') and pAZ102-Y (5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3') in the second amplification, according to a previously described method (7).

The quantitative variables were compared by the Mann-Whitney test. For comparison of the qualitative variables, Fisher's Exact Test was used. A value of $p < 0.05$ was considered significant. The statistical analysis used the SPSS software version 15.0.

The study was approved by the Research Ethics Committee, at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and the patients and professionals under study agreed to the Free Informed Consent Form.

RESULTS

Of the exposed professionals, 33.33% (9/27) were found to be colonized by *P. jirovecii* at some point during the 8-week observation period (Table 1). In the control group, the microorganism was detected in two (5.55%) individuals ($p < 0.001$).

As regards the duration of colonization in the nine health care workers: four were colonized only at the first week after the initial contact with the PcP patient; four were colonized at the first and second weeks after contact; and one professional was found to be colonized only at the second week (Table 1).

No association was identified between the clinical and demographical characteristics of PcP patients and the colonization of health care workers (Table 2).

All colonized individuals were observed for six months, a period in which they did not show any clinical condition that made them predisposed to colonization by *P. jirovecii*.

DISCUSSION

The colonization of healthy humans by *P. jirovecii* has been recently analyzed. There are different pieces of evidence of this colonization: it has been demonstrated that, in animal models, *Pneumocystis* inhabits the lung of healthy rats (8); the prevalence of anti-*Pneumocystis* antibodies in the general population is high, suggesting a large and repeated exposure to this microorganism (9); colonization was detected in 21.5% of elderly individuals through nested PCR in oropharyngeal wash (10). Thus, the set of findings suggests that the general population may play a key role as a reservoir and infection source of the microorganism, that is, they allow this microorganism to circulate in the human ecosystem. Health care workers comprise a group with specific characteristics that is highly important in this context.

The results of the present study showed that *P. jirovecii* can be significantly detected in oropharyngeal samples from health care workers who had recent occupational contact with PcP patients. The findings suggest, thus, that the microorganism may be transmitted through the air to health professionals.

The colonization observed typically began soon after contact and was transient, being detected until the second week after exposure. This data supports previous evidence that immunocompetent individuals can be colonized and subsequently eliminate the colonization (11).

None of the clinical or demographical variables of PcP patients, including the one related to pneumonia severity, PaO₂, was significantly associated with the colonization of exposed health care workers (Table 2). It has already been observed that the severity of PcP results mainly from the inflammatory response triggered in the host and not from the amount of microorganisms (12). Therefore, it is likely that no association exists between the severity of the infection and the transmissibility of the microorganism.

Recently, Choukri et al. (13) evaluated the propagation of *P. jirovecii* in the surroundings of PcP patients by collecting air and using microorganism-specific real-time PCR. The results showed that *P. jirovecii* was detected in the surroundings of 47.50% (19/40) of PcP patients evaluated and that most positive air samples were those collected at a distance of 1 meter from patients. It was also possible to quantify the DNA of the microorganism, in a range of 7.5×10^3 to 4.5×10^3 copies/m³, at a distance of 1 meter. The findings of this study indicate that *P. jirovecii* is eliminated by the airways of patients with pneumonia. The methods for DNA quantification of the propagated microorganism can be useful for the study of different aspects of the nosocomial transmission of *P. jirovecii*, such as identifying patients at higher risk for transmission and proposing preventive isolation measures.

An important issue in the study of *P. jirovecii* colonization in health care workers is the fact that colonized subjects can transmit the pathogen to other individuals, some of which are susceptible to developing PcP. Chabé et al. (8) demonstrated, in an animal model, that colonized immunocompetent rats can transmit the microorganism to non-colonized rats. In addition, they demonstrated that immunosuppressed rats developed PcP after contact with colonized rats. In humans, Rivero et al. (14) reported the transmission of *P. jirovecii* from a colonized subject to an individual who developed PcP. In this context, the possibility of transmission of *P. jirovecii* to health care workers, who may transmit it to others in a hospital setting, causes PcP to become an important issue among nosocomial infections.

A limitation of this study was its failure to perform the genotyping of *P. jirovecii* detected in patients and colonized individuals. Currently, several genotypes are used for epidemiological purposes, especially the mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtLSUrRNA), the mitochondrial small subunit ribosomal RNA (mtSSUrRNA), and dihydropteroate synthetase (DHPS). The agreement of two genotypes is considered strong evidence that it consists of a *P. jirovecii* sample from the same origin (15). With genotyping, we would have more elements to demonstrate the relationship between the source patient and the respective colonized individual. However, our study could demonstrate a clear temporal association between pneumonia and the transient colonization of exposed professionals.

In brief, our results demonstrated a transient colonization by *P. jirovecii* of health care workers who had close occupational contact with PcP patients. This finding suggests that patients are able to transmit the microorganism to these individuals and that PcP deserves to be studied as a nosocomial infection. The use of *P. jirovecii* genotyping, in further investigations, may contribute with molecular evidence of its transmission. The results of studies on the nosocomial transmission of *P. jirovecii* may help in the development of strategies for preventing PcP in hospital settings.

References:

- 1- Morris A, Lungdren LD, Masur h, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. **Emerg Infect Dis** 2004;10:1713-20.
- 2- Morris A, Wei K, Afshar K, Huang L. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. **J Infect Dis** 2008;197:10-17.
- 3- Wissmann G, Morilla R, Friaza V, et al. El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. **Enferm Infect Microbiol Clin** 2010;28:38-43.
- 4- Vargas SL, Ponce CA, Giglioti F, et al. Transmission of *Pneumocystis jirovecii* DNA from a patient with *P. jirovecii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. **J Clin Microbiol** 2000;38:1536-1538.
- 5- 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;3877-3882.
- 6- Durand-Joly I, Soula F, Chabé M, et al. Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: A challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. **J Euk Microbiol** 2003;50:614S-615S.
- 7- Respaldiza N, Montes-Cano M, Friaza V, et al. Usefulness of oropharyngeal washings for identifying *Pneumocystis jirovecii* carriers. **J Euk Microbiol** 2006;53:S100-S101.
- 8- Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, et al. Immunocompetent host as a reservoir of *Pneumocystis* organism: histological and RT-PCR data demonstrate active replication. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2004;23:89-97.
- 9- Medrano FG, Respaldiza N, Medrano A, et al. Seroprevalence of *Pneumocystis* human infection in Southern Spain. **J Euk Microbiol** 2003;50:649-50.

- 10- Vargas SL, Pizarro P, López-Vieyra M, et al. *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory samplig. **Clin Infec Dis** **2010**;50:19-21.
- 11- Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, et al. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. **Infect Genet Evol** **2008**; 8:1-70.
- 12- Krajicek Bj, Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia: current concepts in pathogenesis, diagnosis and treatment. **Clin Chest Med** **2009**;30:265-78.
- 13- Choukri F, Menotti J, Sarfarti C, et al. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. **Clin Infec Dis** **2010**;51:259-65.
- 14- Rivero L, De La Horra C, Montes-Cano MA, et al. *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. **Emerg Infect Dis** **2008**;14:1116-18.
- 15- Beard CB, Roux P, Nevez G, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. **Emerg Infect Dis** **2004**;10:1729-35.

Table 1: Detection and duration of *Pneumocystis jirovecii* colonization through occupational exposure to *Pneumocystis pneumonia* patients.

PATIENT	CONTACTS	1^a WEEK	2^a WEEK	8^a WEEK
CASE 1 08/01/2008	Nurse	Negative	Negative	Negative
	Physician	negative	Negative	Negative
	Tech. nursing	negative	Negative	negative
CASE 2 23/01/2008	Nurse	positive	Negative	Negative
	Physician	positive	Positive	Negative
	Tech. nursing	positive	Positive	negative
CASE 3 , 18/03/2008	Nurse	negative	Negative	negative
	Physician	positive	Negative	negative
	Tech. nursing	negative	Positive	negative
CASE 4 24/03/2008	Nurse	Negative	Negative	Negative
	Physician	Positive	Positive	Negative
	Tech. nursing	Negative	Negative	Negative
CASE 5 02/04/2008	Nurse	Negative	Negative	Negative
	Physician	Positive	Negative	Negative
	Tech. nursing	Negative	Negative	Negative
CASE 6 05/06/2008	Nurse	Negative	Negative	Negative
	Physician	Negative	Negative	Negative
	Tech. nursing	Negative	Negative	Negative
CASE 7 26/06/2008	Nurse	Negative	Negative	Negative
	Physician	Negative	Negative	Negative
	Tech. nursing	Negative	Negative	Negative
CASE 8 11/08/2008	Nurse	Negative	Negative	Negative
	Physician	Positive	Positive	Negative
	Tech. nursing	Positive	Negative	Negative
CASE 9 22/08/2008	Nurse	Negative	Negative	Negative
	Physician	Negative	Negative	Negative
	Tech. nursing	Negative	Negative	Negative

Table 2. Demographic and clinical characteristics of *Pneumocystis pneumonia* patients according to the colonization of their health care workers.

	Colonized (5)	No colonized (4)	value p
Age, years, mean \pm DP	36 +- 6,4 (29,6-42,4)	36,5+ - 5,9 (30,6-42,4)	0,905 ⁶
Male, n ^o (%)	3 (60%)	2 (40%)	1,000 ⁷
PaO ₂ ¹ , mmHg, mean \pm DP	64,9+- 10,4(54,5-75,3))	63,5 + - 13,8 (49,7-77,3)	0,973 ⁶
LDH ² , U/l, mean \pm DP	843,4 +- 212,9(630,5 -1056,3)	958,2 + - 354,2 (60-1312,4)	0,286 ⁶
CD4 ³ , cels/mm ³ , mean \pm DP	30,8+- 24,4 (6,4-55,2)	28,2 + - 29,2(-1,01-57,4)	1,000 ⁶
Treatment with sulfa, n ^o (%)	0	0	1,000 ⁷
Use ARV ⁴ , n ^o (%)	2 (50%)	2 (50%)	1,000 ⁷
PcP ⁵ prior, n ^o (%)	1 (100%)	0 (0)	1,000 ⁷
Toxoplasmosis prior, n ^o (%)	1(100%)	0 (0)	1,000 ⁷
Diagnosis HIV ⁵ in PcP, n ^o (%)	2 (66,7%)	1 (33,3%)	1,000 ⁷
Use corticoid, n ^o (%)	4 (57,1%)	3 (42,9%)	1,000 ⁷
Death associated with PcP, n ^o (%)	1 (50%)	1(50%)	1,000 ⁷

¹partial pressure of arterial oxygen; ²serum lactic dehydrogenase, ³phenotype CD4 lymphocyte; ⁴antiretroviral; ⁵human immunodeficiency virus; ⁶ Mann-Whitney, ⁷Fisher exact test.

7. Conclusões

Os profissionais de saúde em contato ocupacional com os pacientes com PcP apresentaram uma taxa de colonização pelo *P. jirovecii* superior aos indivíduos não expostos. Entre os profissionais expostos, 33,33% (9/27) apresentaram-se colonizados pelo *P. jirovecii* em algum momento no período de observação de oito semanas. No grupo controle, foi detectado o microorganismo em somente dois (5,55%) indivíduos ($p < 0,05$). A colonização observada teve início geralmente logo após o contato e foi transitória, detectada somente até a segunda semana após a exposição.

A partir de diversos relatos prévios de que os sujeitos colonizados podem transmitir o microorganismo a outros, os profissionais de saúde podem constituir importante reservatório e fonte de infecção do fungo para indivíduos no ambiente hospitalar, inclusive para pacientes susceptíveis de desenvolver um quadro de PcP.

8. Considerações finais

Os estudos sobre o *P. jirovecii* sempre foram limitados pelo fato desse microorganismo não crescer nos meios de cultura *in vitro*. A partir dos métodos de análise do DNA, baseados na Reação em Cadeia pela Polimerase, houve um significativo avanço no conhecimento do *P. jirovecii*.

Atualmente, há evidências de que este microorganismo pode colonizar o ser humano e que um sujeito colonizado pode transmitir o fungo a outros indivíduos. No ambiente hospitalar, a colonização dos profissionais de saúde adquire um grande significado porque pode constituir um reservatório e fonte de infecção de grandes proporções. A infecção pelo *P. jirovecii*, sob este aspecto, merece ser estudada como uma importante infecção nosocomial.

Como estratégia de prevenção da PcP nosocomial podem ser indicadas medidas como isolamento respiratório dos pacientes com pneumonia, vigilância e monitoramento dos profissionais de saúde colonizados pelo fungo, a fim de evitar a sua propagação.

O estudo aqui apresentado é o mais detalhado sobre o tema, entre aqueles encontrados na literatura médica até o momento. A clara identificação do paciente-fonte e dos contatos sugere que ocorreu a transmissão do *P. jirovecii*, que foi detectado através de técnicas moleculares. A colonização detectada foi transitória, entre uma a duas semanas, confirmando achados prévios. Os resultados podem colaborar na elaboração de estratégias de prevenção da PcP no ambiente hospitalar, uma questão até hoje não abordada nas discussões sobre o controle das infecções hospitalares.

A limitação deste estudo foi não ter realizado a caracterização genotípica do *P. jirovecii* encontrado nos pacientes-fonte e nos profissionais colonizados. A tipagem de pelo menos duas regiões genômicas seria uma forte evidência molecular da transmissão do fungo.

Este trabalho está inserido no Grupo de Estudos sobre *Pneumocystis* HCPA/CNPq, que atua em intercâmbio com o Instituto de Biomedicina de Sevilha, Espanha. Diversos projetos sobre a epidemiologia molecular do *P. jirovecii* estão em andamento no Laboratório Molecular de Doenças Infecciosas do HCPA, no qual atualmente estão sendo implantadas as técnicas de genotipagem da diidropteroato sintetase e da grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial do fungo, o que colaborará nos estudos sobre a transmissão do *P. jirovecii*.

9.1. Anexo I

Genótipos do *Pneumocystis* entre diversos mamíferos

	<i>Pneumocystis carinii</i>	<i>Pneumocystis wakefieldiae</i>	<i>Pneumocystis murina</i>	<i>Pneumocystis oryctolagi</i>	<i>Pneumocystis jirovecii</i>	<i>Pneumocystis de primatas</i>	<i>Pneumocystis do furão</i>	<i>Pneumocystis do cavalo</i>	<i>Pneumocystis do suíno</i>	<i>Pneumocystis do cachorro</i>
Hospedeiro	Rato (<i>R. novergicus</i>)	Rato (<i>R. novergicus</i>)	Ratão (<i>Mus musculus</i>)	Coelho (<i>Oryctoalagus cuniculus</i>)	Homem (<i>Homo sapiens</i>)	Macacos de diversas espécies	Furão (<i>Mustela putorius furo</i>)	<i>Equus caballus</i>	<i>Sus scrofa</i>	<i>Canis familiaris</i>
mtLSUrRNA	Cushion,1998	Cushion,1998	Ruan et al,inédito	Wakefield et al,1992	Wakefield et al,1992	Demanche et al,2001	Wakefield et al,1992	Petters et al,1994	Keely et al, 1994	English et al,2001
mtSSUrRNA	Hunter and Wakefield,1996	Hunter and Wakefield,1996	Hunter and Wakefileld,1996	Hunter and Wakefileld,1996	Hunter and Wakefileld,1996	Demanche et al,2001	Hunter and Wakefileld,1996			
ITS	Ortiz-Rivera et al, 1995	Ortiz-Rivera et al, 1995	Keely et al, 2004	Li et al, 1995	Ortiz-Rivera et al, 1995	Hsueh et al,2001				
Arom	Banerji et al, 1993		Banerji et al, 1993	Banerji et al,1995	Banerji et al,1995			Banerji et al,1995		
DHFR	Ma et al, 2001		Ma et al, 2001	Ma et al, 2001	Ma et al, 1999	Ma et al, 1999	Ma et al, 2001			Ma et al, 2001
DHPS	Stedman et AL,1998		Lane et al, 1997	Ma et al, 2001	Ma et al, 1999	Demanche et al,2001	Ma et al, 2001			Ma et al, 2001

Modificado de Aliout-Denis CM, Infection, Genetics and Evolution, 2008

9.2. Anexo II

Genótipos do *Pneumocystis* utilizados na epidemiologia molecular

Gene	Número de genótipos	Referências
mtLsurRNA	6	Keely et al,1993; Latouche et al, 1994,1996,1997; Tsolaki et al, 1998; Wakefield et al, 1994
mtISSrRNA	2	Hunter e Wakefield, 1996; Tsolaki et al,1998;
ITS	1 + 2	Lee et al,1998; Tsolaki et al,1996; Beser et al,2007

Modificado de Aliout-Denis CM, Infection, Genetics and Evolution, 2008

9.3. Anexo III

Obtenção das amostras e detecção do *P. jirovecii*

O lavado de orofaringe é uma amostra que consiste no gargarejo de 10 ml de solução fisiológica por 1 minuto, o qual é coletado em recipiente estéril (1).

A extração do DNA e a detecção do *P. jirovecii* foram realizadas no Laboratório Molecular de Doenças Infecciosas, localizado no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e direcionado ao estudo molecular de doenças infecto-parasitárias.

- Extração do DNA: para a extração foi utilizado um kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit); posteriormente as amostras serão armazenadas a uma temperatura de -20°C .

- Detecção do *P. jirovecii*: a região da Subunidade Maior do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA) foi amplificada através de uma *nested-PCR*. Para a primeira amplificação foram utilizados os *primers* pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3') e pAZ102-H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3'), e para a segunda amplificação os *primers* pAZ102-X (5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAGG-3') e pAZ102-Y (5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3'). Os produtos de ambas reações foram revelados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e as bandas visualizadas através de luz ultravioleta (2).

Referências:

1- Respaldiza N, Montes-Cano MA, Friaza V, Muñoz-Lobato F, Medrano FJ, Varela JM, et al. Usefulness of Oropharyngeal washings for identifying *Pneumocystis jirovecii* carriers. **J Euk Microbiol** 2006;53:100S-101S.

2- Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, et al. Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. **Mol Biochem Parasitol** 1990;43: 69-76.