

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

Rosicler Luzia Brackmann

Estudo da colonização pelo *Pneumocystis jirovecii*
na comunidade atendida pela Unidade Básica de Saúde do Hospital de
Clínicas de Porto Alegre

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, dezembro de 2011

Rosicler Luzia Brackmann

**Estudo da colonização pelo *Pneumocystis jirovecii* na comunidade
atendida pela Unidade Básica de Saúde do Hospital de Clínicas de Porto
Alegre**

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Wissmann Neto
Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla

Porto Alegre, dezembro de 2011

CIP - Catalogação na Publicação

BRACKMANN, Rosicler Luzia

Estudo da colonização pelo *Pneumocystis jirovecii* na comunidade atendida pela Unidade Básica de Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre / Rosicler Luzia Brackmann. -- 2011.
66 f.

Orientador: Gustavo Wissmann Neto.

Co-orientador: João Carlos Prolla.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2011.

1. *Pneumocystis jirovecii*. 2. colonização.
3. reservatório. I. Wissmann Neto, Gustavo, orient.
II. Prolla, João Carlos, co-orient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos

- Aos meus pais Dalila e Bernardo (*in memoriam*), que me passaram seus valores de vida;
- À minha irmã Maristela e minha filha Franciane, pelo afeto e auxílio;
- Ao meu orientador, Prof. Gustavo Wissmann Neto, pelo incentivo e orientação;
- Ao meu co-orientador, Prof. João Carlos Prolla, pela experiência e exemplo;
- A bióloga Isabel Cristina Espindola Cardoso, pela amizade e estímulo;
- Aos colegas da Unidade de Citopatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo apoio e compreensão;
- Aos participantes da equipe de coleta: Altemar Santos Acunha, Alana D. Ranzi, Dayane Fraga, Fernanda Albuquerque, Franciane B. Mendes, Geovana Tavares dos Santos, Wander Cléia dos Santos Oliveira;
- Ao bolsista André Luis Aquino Müller, pelo auxílio nas técnicas de biologia molecular.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS= Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida

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

HAS= hipertensão arterial sistêmica

HCPA= Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIV= Vírus da Imunodeficiência Humana

ITS= *internal transcribed spacer*

mtLSUrRNA= grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial

mtSSUrRNA= pequena subunidade do RNA ribossômico mitocondrial

PCR: reação em cadeia pela polimerase

PcP= pneumonia por *Pneumocystis*

RNA= ácido ribonucléico

TNF- α = fator de necrose tumoral α

SUS= Sistema Único de Saúde

UBS = Unidade Básica de Saúde

SUMÁRIO

1. Resumo / 1

2. Revisão da literatura / 5

2.1. O gênero *Pneumocystis* e a espécie *Pneumocystis jirovecii* / 5

2.2. A pneumonia por *Pneumocystis* / 8

2.3. Aspectos relacionados à transmissão do *P. jirovecii* / 13

2.4. A colonização de determinadas populações pelo *P. jirovecii* / 17

2.5. A colonização pelo *P. jirovecii* ocorre no indivíduo adulto saudável? / 23

2.6. A hipótese do reservatório dinâmico do *P. jirovecii* no ser humano / 25

2.7. Referências bibliográficas / 27

3. Justificativa do estudo / 40

4. Objetivos / 42

5. Artigo a ser encaminhado ao *The Journal of Infectious Diseases* / 43

6. Conclusões / 56

7. Considerações finais / 57

8. Anexos / 59

8.1. Anexo I: Obtenção das amostras e detecção do *P. jirovecii* / 59

8.2. Anexo II: Área geográfica da comunidade atendida pela Unidade Básica de Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre / 60

1. RESUMO

Introdução

O *Pneumocystis jirovecii* causa uma grave infecção oportunista nos pacientes imunossuprimidos. Como o *P. jirovecii* é específico do ser humano, o reservatório deve ser constituído pelos indivíduos que apresentam a pneumonia ou a colonização pelo fungo. A colonização foi estudada somente em grupos específicos (pacientes infectados pelo vírus HIV, pacientes com doenças pulmonares crônicas, crianças com a primoinfecção pelo microorganismo, entre outros) e não foi ainda comprovada a colonização de indivíduos adultos saudáveis na população em geral. A distribuição do reservatório do *P. jirovecii* na comunidade, portanto, não é conhecida.

Objetivos

Estudar a colonização pelo *P. jirovecii* na comunidade da região geográfica de abrangência da Unidade Básica de Saúde (UBS) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Determinar a prevalência da colonização; investigar a associação entre dados clínicos ou demográficos e colonização; verificar se adultos saudáveis são colonizados pelo *P. jirovecii*.

Material e métodos

Foram selecionados aleatoriamente 405 indivíduos que residem na área atendida pela UBS/HCPA. O lavado de orofaringe e os dados clínicos e demográficos foram coletados no decorrer do ano de 2010. A presença do *P. jirovecii* no lavado de orofaringe foi investigada através de uma *nested*-PCR que amplifica a grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA), a qual foi realizada no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA. Os dados obtidos foram submetidos às análises estatísticas univariada e multivariada.

Resultados

A colonização pelo *P. jirovecii* foi observada em 7,7% (31/405) dos indivíduos. A análise estatística univariada demonstrou que a presença do fungo está associada ao tabagismo, à doença respiratória crônica e à idade (as crianças e os idosos apresentam-se mais colonizados que os adultos e adolescentes). Na análise multivariada, o tabagismo e a idade foram variáveis cuja associação com a colonização foi independente. Dentre os indivíduos colonizados, três eram adultos saudáveis.

Conclusões

Uma prevalência de 7,7% (31/405) de colonização entre os indivíduos da população foi identificada. O tabagismo e a idade (crianças e idosos) estão associados à colonização na análise multivariada, o que confirma evidências prévias. Entre os indivíduos colonizados, cerca de 10% (3/31) são pessoas adultas e saudáveis, um grupo que este estudo revela como parte do reservatório do fungo. A prevalência de colonização identificada no estudo, distribuída em diferentes indivíduos da população, sugere que um grande reservatório do *P. jirovecii* é dinâmico e é mantido através da transmissão do fungo entre os habitantes da região.

1. ABSTRACT

Introduction

Pneumocystis jirovecii is the cause of a serious opportunistic infection in immunocompromised patients. As a specifically human microorganism, its reservoir is made up of individuals that have pneumonia or are colonized. Colonization has been studied only in specific groups, such as patients with HIV infection or chronic pulmonary diseases and children with primary infection by this microorganism. Colonization in healthy adults in the general population has not been confirmed. The distribution of the *P. jirovecii* reservoir in the community is, therefore, unknown.

Objectives

To study colonization by *P. jirovecii* in the community of the geographic area of the Primary Health Care Unit of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (UBS/HCPA); to determine the prevalence of colonization; to evaluate the association between clinical or demographic data and colonization; to investigate whether healthy adults are colonized by *P. jirovecii*.

Material and methods

This study randomly enrolled 405 individuals that lived in the geographic area of UBS/HCPA. Oropharyngeal wash specimens and clinical and demographic data were collected along 2010. The presence of *P. jirovecii* in oropharyngeal wash specimens was investigated using nested PCR, which amplifies the mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtLSUrRNA). Tests were conducted in the Experimental Research

Center of HCPA. Univariate and multivariate statistical analyses were used to evaluate the data collected.

Results

Colonization by *P. jirovecii* was found in 7.7% (31/405) of the individuals. Univariate statistical analysis revealed that the presence of the fungus was associated with smoking, chronic respiratory diseases and age; children and older adults were more often colonized than adults and adolescents. In multivariate analysis, only smoking and age were independently associated with colonization. Of the individuals with colonization, three were healthy adults.

Conclusions

The prevalence of colonization among individuals in the population was 7.7% (31/405). Smoking and age (children and older adults) were associated with colonization in multivariate analysis, which confirms previous findings. About 10% (3/31) of all colonized individuals were healthy adults, a group that seems to be part of the reservoir of the fungus. In this study, colonization was distributed among different individuals in the population, which suggests that a large and dynamic reservoir of *P. jirovecii* is kept by fungus transmission between inhabitants of the region.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O gênero *Pneumocystis* e a espécie *Pneumocystis jirovecii*

No ano de 1909, Carlos Chagas fez a primeira descrição de um organismo do gênero *Pneumocystis* no Instituto Manguinhos, Rio de Janeiro. Ao observar a presença de formas císticas nos pulmões de cobaias nas quais havia sido inoculado o sangue de pacientes com tripanossomíase, Chagas concluiu erroneamente que havia encontrado uma nova forma do *Trypanosoma cruzi* (1).

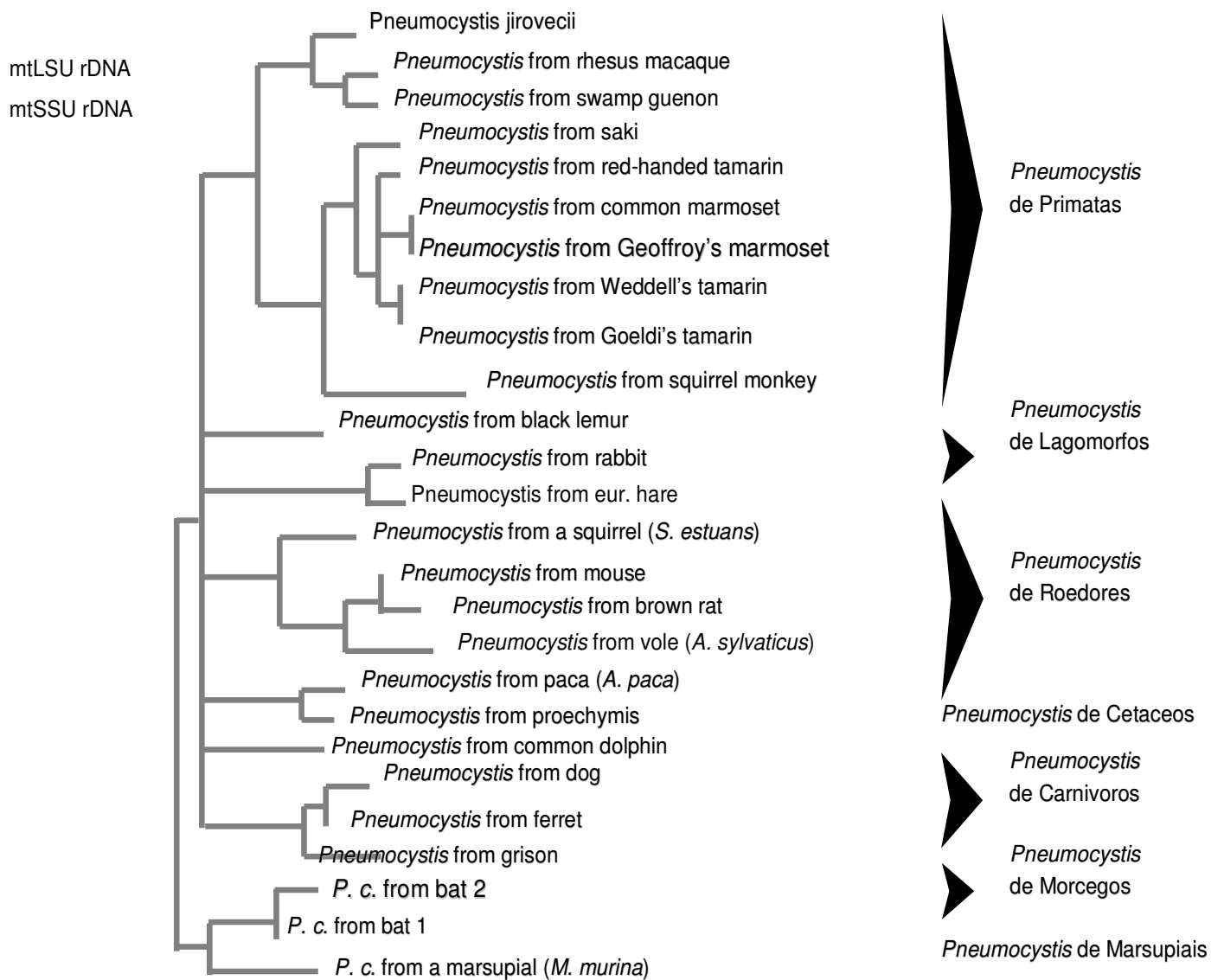
Em 1910, Antônio Carini, do Instituto Pauster de São Paulo, observou os mesmos cistos nos pulmões de ratos infectados pelo *Trypanosoma lewisi*. Em dúvida quanto ao significado dos achados, Carini enviou amostras para análise de Alphonse Laveran, do Instituto Pasteur de Paris. O casal Delanoe, pesquisadores do grupo de Laveran, demonstrou que os cistos relatados por Chagas e Carini estavam relacionados a um novo microorganismo e não a uma forma de tripanossomo. O nome escolhido foi *Pneumocystis carinii*: *Pneumo* graças ao seu tropismo pelo pulmão, *cystis* em referência à sua morfologia e *carinii* em homenagem ao pesquisador Antônio Carini (2,3).

O *Pneumocystis* foi inicialmente classificado como um protozoário devido ao seu aspecto morfológico e à boa resposta a medicações usadas para tratar doenças causadas por protozoários (4). No final dos anos 80, as técnicas de análise do DNA finalmente demonstraram a natureza fúngica do *Pneumocystis*, agora parte da família Pneumocystidaceae (5,6).

O gênero *Pneumocystis* compreende diversas espécies que infectam de forma específica diferentes mamíferos. A espécie que infecta o homem é atualmente denominada *Pneumocystis jirovecii*, em homenagem ao parasitologista tcheco Otto Jiroveci, o primeiro a relatar a pneumonia causada por este microorganismo em humanos. É interessante destacar que, quando a nomenclatura foi revista no ano 2002 a partir de evidências moleculares, houve um consenso para manter o acrônimo PcP (***Pneumocystis pneumonia***) (7).

Outras espécies já foram claramente identificadas: *P. murina* em camundongos (*Mus Musculus*), *P. carinii* e *P. wakefieldiae* em ratos (*R. norvegicus*), *P. oryctolagi* em coelhos (*O. cuniculus*). Diversos microorganismos geneticamente associados ao gênero *Pneumocystis* foram obtidos de outros mamíferos, porém ainda não tem nomenclatura definida. Exemplos: *Pneumocystis* do cão, *Pneumocystis* do cavalo, etc. A impressionante variedade do gênero e a especificidade do microrganismo a um determinado hospedeiro não tem precedentes no Reino Fungi (8). A figura 1 apresenta a árvore filogenética do gênero *Pneumocystis* entre os mamíferos.

Figura 1. Árvore filogenética do gênero *Pneumocystis* entre os mamíferos, de acordo com a análise dos genes da grande e da pequena subunidade do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA e mtSSUrRNA).



Adaptado de Guillot et al, J Euk Microbiol 2001; 47: 113-115.

2.2. A pneumonia por *Pneumocystis* (PcP)

Várias décadas após a sua descoberta, o *Pneumocystis* veio a ser considerado um patógeno importante para o ser humano. Durante a Segunda Guerra Mundial, as crianças desnutridas da Europa foram acometidas, de forma epidêmica, por uma infecção respiratória que recebeu o nome de pneumonia intersticial de células plasmáticas. No início da década de 1950, o parasitologista Otto Jirovec identificou o *Pneumocystis* como o agente causal desta pneumonia (9).

Durante as décadas de 1960-70, houve um crescimento da incidência da pneumonia por *Pneumocystis* (PcP), provavelmente em decorrência do aumento dos casos de pacientes apresentando imunossupressão pelo uso de corticosteróides, tratamentos para câncer e também medicamentos imunossupressores utilizados após transplantes de órgãos. Ainda assim, a PcP era uma infecção incomum (4).

Com o surgimento da Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida (AIDS) associada à infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), observou-se um extraordinário aumento nos casos de PcP. Esta grave pneumonia passou a ser a infecção oportunista mais freqüente no início dos sintomas da AIDS nos países desenvolvidos. Também foi estimado que, nos primeiros anos de ocorrência da AIDS, cerca de 60% dos pacientes acometidos pela infecção pelo HIV apresentaram a PcP em algum momento da evolução da síndrome (10,11).

O quadro clínico típico é insidioso e constituído por dispnéia, tosse seca, febre, infiltrado intersticial bilateral à radiografia do tórax, e poucos achados à ausculta respiratória. A dispnéia é um elemento central na clínica e os valores de PaO₂ (mmHg) no ar ambiente são usados para definir a gravidade da pneumonia: leve- > 82.7; moderada- 60-82.7; grave- < 60. A mortalidade da PcP é de cerca de 10% na maioria dos relatos em países desenvolvidos e também no nosso meio. A primeira opção para profilaxia e tratamento está no composto sulfametoxazol-trimetoprim, nas

doses de 400/80 mg /dia para a profilaxia e 75-100 mg/kg/dia de sulfato e 15-20 mg/kg/dia de trimetoprim para o tratamento (12).

O tratamento da infecção pelo HIV com a terapia antiretroviral combinada trouxe uma redução dramática das infecções oportunistas associadas à AIDS (13). Um estudo de grande magnitude, chamado “*Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease*”, do *Centers for Diseases Control and Prevention*, nos Estados Unidos, demonstrou o declínio na prevalência das infecções oportunistas a partir da utilização do tratamento antiretroviral combinado (uma associação de ao menos três drogas antiretrovirais que incluem dois inibidores da transcriptase reversa análogos dos nucleosídeos e um inibidor não-análogo dos nucleosídeos ou um inibidor da protease). Foi demonstrada uma queda na prevalência da PCP de cerca de 20% ao ano no período de 1996 a 1998 em relação aos anos anteriores. Entretanto, neste estudo a PCP ainda figurou como a infecção oportunista mais comum no momento do diagnóstico da AIDS. Além disto, uma parte significativa dos pacientes desconhecia o diagnóstico da infecção pelo vírus HIV e permanecia susceptível às infecções oportunistas como a PcP (14).

Alguns países em desenvolvimento, especialmente do continente africano, tiveram um contexto claramente distinto, como será citado a seguir.

Ainda que seja reconhecido que a tuberculose pulmonar e as pneumonias bacterianas são as infecções respiratórias associadas à AIDS de maior frequência na África, alguns estudos indicavam inicialmente uma prevalência muito baixa da PcP (15). No ano de 1992, numa série de 53 autópsias de pacientes com AIDS em Adidjan, África Ocidental, a PcP foi a causa dos óbitos em 9% dos casos (16).

Uma extensa revisão sobre o tema demonstrou que a prevalência da PcP variou entre 11-39% das infecções respiratórias associadas à AIDS na África no período de 1986 a 2000 (17). Recentemente, outra revisão sobre a PcP nos países em

desenvolvimento analisou os estudos realizados na África entre 2003 e 2009, os quais apresentaram uma prevalência da PcP entre 29-43% das infecções respiratórias em pacientes infectados pelo HIV. Apesar da dificuldade em comparar alguns resultados devido às diferenças metodológicas das investigações, parece evidente que houve aumento dos casos diagnosticados como PCP entre as infecções respiratórias associadas à AIDS no continente africano entre 2003 e 2009 (18). É possível, segundo alguns autores, que a carência de recursos para o diagnóstico, além de outros fatores, tenha contribuído para as baixas taxas de prevalência da PcP inicialmente relatadas na África (15).

No Brasil, temos o registro de 592.914 casos de AIDS de 1980 a 2010, conforme dados do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil / ano 2010. A AIDS é, portanto, um grave problema de saúde pública em nosso país.

Um estudo publicado em 1993 descreveu o diagnóstico de PcP em 55% de 35 pacientes com AIDS e infecção respiratória que foram atendidos no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo. Neste estudo, a tuberculose foi observada em 41% e a pneumonia por citomegalovírus em 8% (19).

Marins e cols estudaram 2821 pacientes com AIDS de várias regiões brasileiras e descreveram o forte impacto da terapia antiretroviral combinada entre os pacientes infectados pelo HIV no Brasil. Desde 1991, é disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde a zidovudina; desde 1993, outros inibidores da transcriptase reversa e desde 1996 os inibidores da protease. Além de destacar o aumento da sobrevivência dos pacientes a partir de 1996, os autores observaram que a tuberculose foi a doença mais frequente no diagnóstico da síndrome (26%), seguida pela PcP (14%) (20).

Enquanto a prevalência das infecções oportunistas em pacientes com AIDS caiu consideravelmente após a introdução da terapia antiretroviral combinada, tem sido observado o crescimento das taxas de PcP em pacientes que não estão infectados pelo HIV (15).

Foi relatado, já no ano de 2002, um aumento dos casos de PcP em pacientes não infectados pelo HIV. Pacientes com câncer, com doenças reumatológicas ou submetidos a transplantes de órgãos apresentaram taxas crescentes de PcP à medida em que surgiram novos tratamentos agressivos ao sistema imune (21). Uma revisão recente descreveu um aumento na incidência da infecção entre pacientes com doenças do tecido conjuntivo, doenças inflamatórias intestinais e neoplasias hematológicas. Como terapias associadas ao desenvolvimento da PcP, foram destacados os antagonistas do fator de necrose tumoral α e os inibidores da calcineurina (22).

Diversos estudos demonstraram a associação entre o uso dos anticorpos monoclonais contra o fator de necrose tumoral α (anti-TNF- α) e o desenvolvimento de PcP. O TNF- α exerce papel importante na doença inflamatória crônica, porém é um elemento crucial na defesa às infecções. As drogas anti-TNF- α são utilizadas com sucesso no tratamento da Artrite Reumatóide e outras doenças inflamatórias; entretanto, a inibição da cascata inflamatória gera uma debilidade no sistema imune (23).

Uma revisão dos dados do FDA (*Food and Drug Administration, USA*) identificou 84 casos de PcP relacionada ao uso de infliximab, um agente anti-TNF α , entre 1998 e 2003 (24). Outro estudo acompanhou, durante seis meses, 5.000 pacientes que receberam infliximab no tratamento da Artrite Reumatóide. Entre as complicações respiratórias associadas ao infliximab, as mais freqüentes foram: pneumonia bacteriana, tuberculose e PcP (2,2%, 0,3% e 0,4% do total de pacientes) (25).

Por outro lado, a doença inflamatória intestinal pode necessitar um tratamento com mais de um imunossupressor, que pode incluir agentes anti-TNF- α , corticóide e azatioprina, entre outros. Poppers e cols descrevem o alto risco de PcP, especialmente entre pacientes com doença severa ou fulminante e entre os que necessitam tratamento com corticóide ou agentes biológicos por um longo período.

Ainda que sugiram o uso de quimioprofilaxia para a PcP nos casos citados, os autores revelam a necessidade da elaboração de guias de prática clínica para o uso da profilaxia (26).

A PcP em pacientes não infectados pelo vírus HIV apresenta quadro clínico de rápida evolução e uma mortalidade que pode chegar a 40%. Portanto, é importante a avaliação do uso da profilaxia anti-PcP nos pacientes de alto risco para a infecção (27).

Diversas populações, entre as quais os pacientes imunodeprimidos (infectados pelo HIV, em uso de agentes biológicos ou corticóides, entre outros), apresentam-se frequentemente colonizadas pelo *P. jirovecii*, o que será discutido no capítulo 3.1. A detecção da colonização pode ser um dos fatores utilizados para a indicação da profilaxia anti-PcP em indivíduos com doença inflamatória intestinal que apresentam alto risco, assim como em portadores de doenças reumatológicas em uso de infliximab (28,29).

2.3. Aspectos relacionados à transmissão do *Pneumocystis jirovecii*

Por várias décadas, a PcP foi considerada uma zoonose. Acreditava-se que algum mamífero seria o reservatório do *Pneumocystis* e, portanto, a fonte de transmissão para o ser humano. Neste contexto, o rato era o mamífero mais citado como a possível fonte de transmissão do fungo ao homem (30).

As técnicas baseadas na análise do DNA demonstraram, como referido no capítulo 2.1, a existência de um gênero composto por inúmeras espécies que são específicas para um hospedeiro (31,32,33). A espécie que infecta especificamente o ser humano é hoje denominada *P. jirovecii* (7).

Por outro lado, a teoria da reativação de uma infecção latente dominou as discussões sobre a origem da PcP. Acreditava-se que esta pneumonia ocorria a partir da reativação de uma infecção adquirida na infância. Isto era baseado principalmente no fato de que o ser humano tem um contato precoce com o fungo, o que é demonstrado pela alta prevalência de anticorpos anti-*Pneumocystis* na infância (34).

A caracterização genotípica do fungo colaborou nos estudos sobre a transmissão do microorganismo. A concordância de pelo menos dois genótipos é uma forte evidência de que se trata de um *P. jirovecii* de mesma origem (35). Os genótipos mais utilizados nos estudos da epidemiologia molecular do microorganismo estão na Tabela 1. 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), as *internal transcribed spacer 1* e 2 (ITS 1 e 2). A concordância de pelo menos dois genótipos é uma forte evidência de que se trata de um *P. jirovecii* de mesma origem (35). Os genótipos mais utilizados nos estudos da epidemiologia molecular estão na Tabela 1.

Tabela 1. Genótipos utilizados na epidemiologia molecular do *P. jirovecii*.

Gene	Número de genótipos	Referências
mtLSUrRNA	6	Keely et al,1995; Tsolaki et al, 1998; Wakefield et al, 1994.
mtSSrRNA	2	Hunter e Wakefield, 1996; Tsolaki et al,1998.
ITS 1 e 2 do RNA ribossômico	Mais de 30 genótipos de ITS1; 40 genótipos de ITS2.	Lee et al,1998; Tsolaki et al,1996; Beser et al, 2007.
DHPS	4	Lane et al, 1997; Kazanjian et al,1998.

RNA: ácido ribonucléico; ITS: *internal transcribed spacer*; mtLSUrRNA: grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial; mtSSUrRNA: pequena subunidade do RNA ribossômico mitocondrial.

Adaptado de Aliouat-Denis et al, Infect Gen Evol 2008; 8:708-726.

Keely e cols 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 mostraram que as pneumonias recorrentes eram causadas por novas infecções pelo *P. jirovecii* (36).

Wakefield demonstrou, no ano de 1996, a presença no ar ambiente do *Pneumocystis* que infecta o homem, na época ainda chamado *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* (37). A mesma autora apresentou também um caso de provável transmissão da infecção de mãe para filha, no qual o microorganismo observado em

ambas tinha genótipos similares (38).

Beard e cols, ao estudarem a tipagem da mtLSUrRNA e a da DHPS de 191 pacientes com PCP de cinco cidades norte-americanas, encontrou um padrão de genótipos associados ao local do diagnóstico e não ao local do nascimento do paciente. A variação genética demonstrada sugeriu que os casos de infecção pelo *P. jirovecii* são adquiridas de outros seres humanos e não da reativação de infecções adquiridas precocemente na infância (39).

Os relatos de casos agrupados (*clusters*) de PcP entre pacientes hospitalizados foram importantes no estudo da transmissão da infecção. Uma revisão sobre o tema descreveu o relato de treze *clusters* entre os anos de 1968 a 2007, em diferentes populações (AIDS, neoplasias hematológicas e outros tipos de câncer, doenças do tecido conjuntivo e transplante renal). O número de casos dos *clusters* estudados variou entre 3 e 22 pacientes (40). Recentemente, outros quatro *clusters* em hospitais foram identificados, todos entre transplantados renais (41-44). A susceptibilidade deste grupo específico pareceu estar nos critérios para o uso da profilaxia anti-PcP, os quais não eram uniformes. A *European Renal Association* recomenda um período de quatro meses de profilaxia após o transplante; a *American Society of Transplantation* indica a profilaxia por 6 a 12 meses. A tendência atual, na maioria dos países, é de estender a profilaxia até 12 meses (45)

Um experimento tornou-se um marco nas investigações sobre a transmissão do *P. jirovecii*. Choukri e cols identificaram, de forma quantitativa, o microorganismo exalado pelo paciente com PcP no quarto de internação hospitalar. Os autores coletaram, em meio líquido apropriado, o DNA do *P. jirovecii* exalado pelo paciente com PcP nas distâncias de 1, 3, 5 e 8 metros. Os resultados foram surpreendentes e detectaram o DNA do *P. jirovecii* em 80% das coletas feitas a 1 metro e em 70% das coletas feitas a 3 metros do paciente (46). Os mesmos autores conduziram a seguir um experimento num modelo animal, no qual quantificaram o DNA do *P. carinii* no

pulmão de ratos com pneumonia e o DNA captado no ar que circundava os animais. Os resultados mostraram uma forte associação entre a carga de DNA nos pulmões dos ratos e os níveis observados no ar (47).

A partir das evidências de que o microorganismo é transmitido por via aérea no ambiente hospitalar, o *Center for Disease Control and Prevention (CDC/USA)* recomenda no momento que: “Pacientes hospitalizados com PcP devem receber precauções padrão e não devem ser internados no mesmo quarto de outros pacientes imunossuprimidos devido à possível transmissão (do *P. jirovecii*) de pessoa a pessoa” (48). O controle da PcP como infecção nosocomial é de estudo recente e não há consenso, entre os pesquisadores, sobre a necessidade do isolamento respiratório desses pacientes (49).

Outro aspecto relevante no tema em questão é o de que um indivíduo simplesmente colonizado pode transmitir o *P. jirovecii* a outro. Num modelo experimental que utilizou camundongos, foi demonstrada a transmissão aérea do *Pneumocystis muris* de animais imunocompetentes colonizados para imunossuprimidos, os quais vieram a desenvolver pneumonia (50). Em 2008, Calderón e cols relataram o caso de PcP numa criança cuja fonte de contágio do *P. jirovecii* foram seus avós. Os genótipos (DHPS e mtLSUrRNA) do microorganismo que colonizava os avós, portadores de DPOC e Artrite Reumatóide, eram iguais aos genótipos observados no *P. jirovecii* isolado da criança (51).

Um indivíduo pode estar colonizado por um microorganismo com mutações na enzima DHPS associadas à resistência às sulfas. Se ocorrer a transmissão do *P. jirovecii* com genótipo mutante da DHPS para um imunossuprimido, este poderá desenvolver um quadro de PcP com algum grau de resistência ao tratamento com sulfonamidas (52).

2.4. A colonização de determinadas populações pelo *P. jirovecii*

A introdução de técnicas altamente sensíveis para a detecção do *P. jirovecii*, como a Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), permitiu observar que o microorganismo pode estar presente nos pulmões de indivíduos sem quadro clínico ou radiológico de PcP. Este achado tem sido denominado de colonização (53,54).

Algumas populações foram estudadas quanto à colonização pelo *P. jirovecii*. Pacientes infectados pelo HIV e os imunodeprimidos por outras causas, portadores de doença pulmonar crônica, profissionais da saúde e gestantes já foram analisados. Indivíduos de faixas etárias específicas, como crianças e idosos, também foram estudados. Os estudos a seguir descrevem os principais achados sobre a colonização nesses grupos.

A colonização é freqüente em pacientes com a infecção pelo HIV. Entre 172 pacientes infectados pelo vírus que necessitaram internação hospitalar uma prevalência 68% de colonização foi observada e além a contagem de CD4 < 50 cels/mm³ e a ausência de quimioprofilaxia anti-PcP foram identificados como fatores de risco (55).

Noutro estudo que incluiu 91 pacientes infectados pelo HIV, o tabagismo e a cidade de residência foram associados à colonização, encontrada em 46% dos casos (56). A associação com a cidade de residência poderia ser explicada pelo clima, que parece influenciar a frequência do fungo em determinadas regiões (57).

Não está claramente definida a duração de uma colonização num paciente infectado pelo HIV. Wakefield e cols demonstraram, ao analisar amostras consecutivas de determinados pacientes, que o período de colonização pode chegar próximo de 10 meses nos portadores do vírus HIV. Os autores ressaltam que a alta prevalência da colonização e um período de colonização possivelmente longo tornam essa população

uma fonte importante de contágio do microorganismo para outros indivíduos (58).

Outro grupo mais estudado quanto à colonização pelo *P. jirovecii* é o das doenças pulmonares crônicas. A primeira publicação sobre o tema, no periódico *The Lancet*, em 1996, relatava a presença do fungo no escarro de alguns pacientes com DPOC (59). Posteriormente, uma alta prevalência de colonização (40,5%) pôde ser demonstrada nesses pacientes (60).

Em macacos portadores do vírus da imunodeficiência símia, a colonização por *Pneumocystis* provoca inflamação das vias aéreas, com aumento das citocinas pró-inflamatórias e neutrófilos no lavado broncoalveolar, assim como uma deterioração da função pulmonar (61,62). No ser humano, a colonização também está associada à inflamação e à queda da função pulmonar (63). 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 pacientes com doença pulmonar crônica (64).

Um aspecto interessante destacado por Sivam e cols é o de que, quando analisados os pulmões de indivíduos colonizados, o *P. jirovecii* é mais frequentemente encontrado nos lobos inferiores. Num pequeno grupo de oito pacientes com DPOC colonizados, o microorganismo foi observado nos lobos inferiores em 46,4% dos casos e nos lobos superiores em 21,4%. Este achado pode resultar da melhor ventilação nas regiões pulmonares inferiores, porém outros estudos são necessários para compreender a questão. Os autores ressaltam que diferenças na colonização das regiões pulmonares poderiam afetar a sensibilidade de métodos de detecção do *P. jirovecii*, dependendo do espécime clínico utilizado (65).

Diferentes prevalências de colonização na Fibrose Cística foram observadas em estudos realizados em diferentes regiões: 1,3% em Brest, França (66); 7,4% em Munique, Alemanha (67); 21,5% em Sevilha, Espanha (68); 38,2% em Porto Alegre,

Brasil (69). Entre os fatores discutidos para explicar as diferentes taxas encontradas, destacam-se os aspectos relacionados ao clima. É provável que exista uma variação geográfica da frequência da colonização/infecção pelo *P. jirovecii* devido ao clima. Estudos prévios demonstravam uma incidência máxima de PcP nos meses de inverno (70,71). Recentemente, Sing e cols revelaram um padrão climático oposto, no qual a incidência de PcP é maior nos meses de calor (57). De maneira interessante, a taxa de colonização observada em Porto Alegre, Brasil, não é estatisticamente diferente da encontrada em Sevilha, Espanha. A temperatura média anual de ambas as cidades é próxima aos 18^o C (69).

A colonização pelo *P. jirovecii* pode, portanto, ocorrer em pacientes com Fibrose Cística em diferentes regiões e não é um achado isolado em determinada cidade ou hospital. Novos estudos poderão definir o papel do *P. jirovecii* na história natural da Fibrose Cística, como já estudado no DPOC. Além disto, deve ser lembrado que a alta prevalência da colonização torna esta população uma fonte significativa para o contágio de indivíduos susceptíveis (72).

Além de pacientes com DPOC e Fibrose Cística, a colonização pelo microorganismo foi relatada em pacientes com doenças intersticiais pulmonares num único estudo que demonstrou uma prevalência de 37,8% nas pneumonias intersticiais idiopáticas e de 19,8% na sarcoidose (73).

Até o momento, a colonização pelo *P. jirovecii* em doenças respiratórias crônicas foi analisada somente na DPOC, na Fibrose Cística e num único estudo sobre doenças intersticiais. Não há nenhuma publicação que avalie a colonização em outros grupos importantes como pacientes com Asma Brônquica, bronquiectasias ou rinite alérgica.

Entre os indivíduos cuja imunodepressão não está associada à infecção pelo vírus HIV, algumas pesquisas foram especialmente dirigidas aos pacientes em tratamento com drogas imunossupressoras. Neste contexto, Helweg-Larsen e cols

demonstraram, ao analisar 367 pacientes com pneumonia bacteriana, que 75% dos 16 colonizados estavam em uso de corticóide, enquanto somente 13% dos não colonizados faziam tratamento com o fármaco (75). Maskell e cols, por sua vez, observaram que, dentre 93 pacientes submetidos à coleta do lavado broncoalveolar por causas diversas, aqueles em tratamento com no mínimo 20 mg/dia de prednisolona tiveram 5.9 vezes mais chances de serem colonizados (76).

Como apresentado no capítulo 2.2, houve um aumento na incidência da PcP associada ao uso de imunossupressores, entre os quais os fármacos anti-TNF α tiveram lugar de destaque. Como um indivíduo colonizado está sob risco de desenvolver um quadro de PcP (54), a colonização nos pacientes que recebem este tratamento deve ser estudada. Neste sentido, Wissmann e cols relataram a colonização em 29% de 62 pacientes com Artrite Reumatóide, Artrite Psoriática e Espondilite Anquilosante que vinham em uso de infliximab. Após análise multivariada dos dados clínicos e demográficos, a colonização pelo *P. jirovecii* foi associada ao tempo de uso de infliximab e ao uso concomitante de corticóide (76). É possível que um dos dados úteis para avaliar a indicação de quimioprofilaxia anti-PcP nos pacientes tratados com infliximab seja a detecção da colonização pelo microorganismo através de técnicas moleculares (28).

Os profissionais de saúde, em virtude da sua importância numa possível transmissão intra-hospitalar do *P. jirovecii*, foram investigados quanto à colonização pelo fungo. Miller e cols observaram a presença do microorganismo 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 relataram a colonização em profissionais que realizavam a broncoscopia em pacientes com PcP (77).

Durand-Joly e colaboradores investigaram a presença do fungo no lavado da orofaringe de profissionais de saúde de um Hospital Universitário na França.

Os autores demonstraram que 8% (7/90) dos profissionais que trabalhavam com pacientes imunossuprimidos no Setor de Hematologia apresentavam-se colonizados pelo *P. jirovecii*. Os resultados sugeriram que pacientes imunossuprimidos, colonizados ou com PcP, transmitiram o microorganismo aos profissionais de saúde. Neste estudo, a duração da colonização foi estudada somente em quatro profissionais e teve uma variação de 3 a 10 semanas. O estudo não analisou a relação entre um paciente-fonte (colonizado ou com PcP) e o profissional colonizado (78).

Uma dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-graduação em Ciências Pneumológicas / UFRGS e cujos dados encontram-se sob revisão no periódico *Infection Control and Hospital Epidemiology* demonstrou uma colonização transitória pelo *P. jirovecii* em 33,3% (9/27) dos profissionais expostos aos pacientes com PcP. Os achados indicam que novos estudos sobre a colonização dos profissionais de saúde e a transmissão intrahospitalar do *P. jirovecii* poderão ter importância na prevenção da PcP em pacientes hospitalizados que estão imunodeprimidos.

O *P. jirovecii* pode ser detectado de forma significativa em duas faixas etárias específicas: crianças e idosos. A primoinfecção pelo fungo é comum na infância, o que é demonstrado pela soroprevalência observada em crianças. O estudo clássico de Meuwissen e cols, publicado em 1977, descreveu que quase 100% das crianças já haviam tido um contato provavelmente assintomático com o fungo, pois tinham anticorpos específicos (34). Posteriormente, vários autores confirmaram a alta soroprevalência na infância. Vargas e cols observaram 85% de anticorpos em crianças de somente 20 meses (79). Respaldiza e cols identificaram uma prevalência de soroconversão de 52% aos 6 anos e de 66% aos 10 anos de idade (80).

As taxas de detecção do *P. jirovecii* são invariavelmente altas na infância, como Vargas e cols também demonstraram ao descrever 32% de colonização em 74

crianças (79). Numa determinada criança, pode ser difícil diferenciar se há a primoinfecção ou uma nova aquisição / colonização do fungo. De qualquer modo, a magnitude desta população deve significar um grande reservatório do microorganismo no ser humano (53,54).

Os indivíduos idosos também foram estudados de forma específica quanto à colonização pelo *P. jirovecii*. Através de *nested-PCR* no lavado de orofaringe e no aspirado nasofaríngeo, o fungo foi detectado em 21,5% de 110 indivíduos com mais de 65 anos. A diminuição da imunidade celular que acompanha o processo de envelhecimento humano poderia favorecer a colonização. Esta susceptibilidade pode ser importante na avaliação de um paciente específico com mais de 65 anos, assim como pode constituir uma fonte comum de infecção para outros indivíduos (81).

2.5. A colonização pelo *P. jirovecii* ocorre no indivíduo adulto saudável?

Não existem, na literatura médica, estudos que demonstrem a colonização pelo *P. jirovecii* de sujeitos adultos que não tem nenhuma doença crônica. Entretanto, as evidências citadas a seguir apontam para a existência desta colonização – provavelmente transitória – no ser humano adulto saudável.

a) Num modelo experimental que utilizou camundongos, foi demonstrada a transmissão aérea do *Pneumocystis 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* foi observada na população em geral. Esta prevalência aumenta com a faixa etária, o que demonstra que os indivíduos adultos são expostos de forma repetida ao microorganismo, favorecendo a hipótese da colonização, possivelmente transitória, na população em geral (82);

c) Alguns estudos, já citados no capítulo anterior, utilizaram técnicas moleculares e demonstraram a colonização transitória de profissionais de saúde saudáveis, os quais tiveram contato com pacientes com PcP (77,78).

d) Um estudo intitulado “*Pneumocystis jirovecii* in general population”, publicado no ano de 2005, apresentou uma taxa de 20% de colonizados entre 50 indivíduos saudáveis. Porém, os indivíduos avaliados neste estudo trabalhavam dentro de um Hospital e, portanto, estavam provavelmente mais expostos ao *P. jirovecii* (83).

e) Foi descrita uma surpreendente prevalência do *P. jirovecii* nos pulmões de 77 indivíduos num estudo de autópsias após morte violenta no Chile. Através de *nested-PCR* para o mtLSUrRNA, os autores observaram que de 54,9% dos casos, dos

quais não há dados clínicos, eram positivos (84). Ainda que estes resultados sejam controversos e necessitem confirmação a partir de outras investigações (85), é possível algumas pessoas híginas estivessem no grupo colonizado.

A colonização em adultos saudáveis, portanto, é um tema que não foi definido até o momento. Entretanto, a espécie denominada *P. jirovecii* é específica do ser humano e vive somente nos alvéolos pulmonares, onde tem uma boa adaptação que foi aprimorada ao longo de uma co-evolução homem/fungo. Como já demonstrado em animais, é provável que a manutenção de um reservatório da espécie dependa da sua adaptação não só em indivíduos enfermos, mas também em saudáveis (8).

Os estudos priorizaram a pesquisa do *P. jirovecii* em populações com determinadas doenças. Não há nenhum relato de alguma investigação de base populacional que apresente a colonização pelo *P. jirovecii* na comunidade, na qual há indivíduos de faixas etárias distintas e condições de saúde diversas, inclusive os saudáveis.

O conhecimento sobre a presença do *P. jirovecii* entre adultos saudáveis traria informações importantes para avaliar as medidas de prevenção da PcP. Como a transmissão do microorganismo ocorre por via aérea, de pessoa a pessoa, as estratégias de prevenção da infecção dependem de dados sobre o reservatório e possíveis fontes de contágio (53,54).

2.6. A hipótese do reservatório dinâmico do *P. jirovecii* no ser humano

O *P. jirovecii* é bem adaptado ao alvéolo pulmonar, único local onde foi observada sua multiplicação. Assim, todas as pesquisas sobre o tema indicam que o reservatório deste microorganismo está no pulmão do ser humano (8,49).

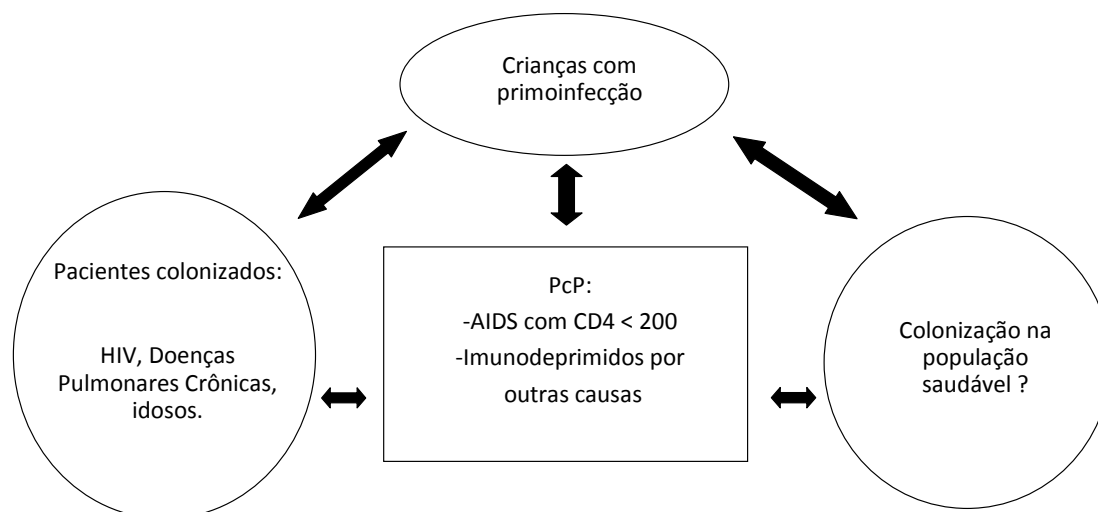
Cabe ressaltar que, apesar do DNA do *Pneumocystis* ter sido encontrado na água e no ar, os resultados obtidos através da epidemiologia molecular do microorganismo não confirmaram a existência de um reservatório do fungo no ambiente. (37,86).

Como descrito anteriormente, determinadas populações (pacientes imunodeprimidos pela infecção do vírus HIV ou outras causas, portadores de doenças pulmonares crônicas, profissionais da saúde, crianças e idosos) apresentam-se frequentemente colonizadas pelo *P. jirovecii* (54).

Hoje está comprovado que o *P. jirovecii* é transmitido por via aérea, de pessoa a pessoa. Como a presença do microorganismo após a PcP ou na colonização é limitada (58,87), a hipótese atual é de que o reservatório do *P. jirovecii* é mantido através da transmissão contínua entre os seres humanos infectados ou colonizados (53). A figura 2 apresenta o provável reservatório dinâmico do *P. jirovecii* no ser humano.

Vários estudos apresentaram resultados que favorecem esta hipótese. Podemos destacar a pesquisa de Totet e cols, que identificaram os mesmos genótipos (ITS e DHPS) no *P. jirovecii* isolado de diferentes populações – pacientes com PcP, crianças e pacientes colonizados – da mesma região geográfica. Estes resultados sugerem que as referidas populações transmitiam o microorganismo entre si (88). Noutro estudo, os mesmo autores encontraram genótipos similares da DHPS no *P. jirovecii* isolado em crianças em casos de PcP, concluindo que há transmissão do microorganismo entre as diferentes populações (89).

Figura 2. Hipótese do reservatório dinâmico do *P. jirovecii* no ser humano.



Adaptado de Peterson JC, Cushion M. Curr Opin Microbiol 2005; 8: 393-8

Há uma importante interrogação na Figura 2. Não está definido se a população dos indivíduos adultos saudáveis pode ser colonizada pelo *P. jirovecii*. Se esta população fizer parte do reservatório, a presença do microorganismo no ser humano passa a ser significativamente mais ampla. Como comentado previamente, os estudos foram, até o momento, dirigidos à pesquisa do *P. jirovecii* em determinados grupos. Não há nenhum dado gerado a partir de investigações de base populacional que apresente a colonização pelo *P. jirovecii* numa comunidade, analisando em conjunto os indivíduos doentes ou saudáveis que podem fazer parte do reservatório e ser uma potencial fonte de contágio do microorganismo.

2.7. Referências bibliográficas da revisão da literatura

- 1- Chagas C 1909. Nova tripanozomíase humana. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1911; 1: 159-181.
- 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 E. Sur les rapports des kystes de carinii du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. **CR Acad Sci** 1912 ; 155: 658–660.
- 4- Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, et al. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* 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- Eriksson OE. *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals, referred to a new family and order (Pneumocystidaceae, Pneumocystidales, Ascomycota). **Systema Ascomycetum** 1994; 13: 165-180.
- 7- Stringer JR, Beard CB, Miller RF, et al. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. **Emerg Infect Dis** 2002; 8: 891–896.
- 8- Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, et al. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. **Infect Genet Evol** 2008; 8:708-726.
- 9- Vanêk J, Jírovec O, Lukes J. Interstitial plasmacell pneumonia in infants. **Ann Pediatr** 1953; 180: 1–21.

- 10- Mills J. *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* infections in patients with AIDS. **Rev Infect Dis** 1986; 8:1001–1011.
- 11- Walzer PD, Perl DP, Krogstad DJ, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia in the United States. Epidemiologic, diagnostic, and clinical features. **Ann Intern Med** 1974; 80:83–93.
- 12- Calderón EJ, Gutierrez-Rivero S, Durand-Joly I, et al. **Expert Rev Anti Infect Ther** 2010; 8: 683–701.
- 13- Detels R, Tarwater P, Phair JP, et al. Effectiveness of potent antiretroviral therapies on the incidence of opportunistic infections before and after AIDS diagnosis. **AIDS** 2001; 15:347-355.
- 14- 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 (suppl 1):S5–S14.
- 15- Morris A, Lundgren JD, Masur H, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. **Emerg Infect Dis** 2004; 10:1713-1720.
- 16- Abouya YL, Beaumel A, Lucas S, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia. An uncommon cause of death in African patients with acquired immunodeficiency syndrome. **Am Rev Respir Dis** 1992; 145:617-620.
- 17- Fisk DT, Meshnick S, Kazanjian PH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. **Clin Infect Dis** 2003; 36:70-78.

- 18- De Armas Rodriguez, Wissmann G, Müller AL, et al *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in developing countries. **Parasite** 2011; 18: 219-228.
- 19- Weimberg A, Duarte MI. Respiratory complications in Brazilian patients infected with human immunodeficiency virus. **Rev Inst Med Trop São Paulo** 1993; 35: 129-190.
- 20- Marins JR, Jamal LF, Chen SY, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. **AIDS** 2003; 17:1675-1682.
- 21- Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without acquired immunodeficiency syndrome. **Clin Infect Dis** 2002; 34: 1098–1107.
- 22- Reid AB, Chen SC, Worth LJ. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients: new risks and diagnostic tools. **Curr Opin Infect Dis** 2011; 24:534–544.
- 23- Koike R, Takeuchi T, Eguchi K, et al. Update on the Japanese guidelines for the use of infliximab and etanercept in rheumatoid arthritis. **Mod Rheum** 2007; 17:451-458.
- 24- Kaur N, Mahl TC. *Pneumocystis jirovecii* (*carinii*) pneumonia after infliximab therapy: a review of 84 cases. **Dig Dis Sci** 2007; 52:1481-1484.

- 25- 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.
- 26- Poppers DM, Scherl EJ. Prophylaxis against *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory bowel disease: toward a standard of care. **Inflamm Bowel Dis 2008**; 14:106–113.
- 27- Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* Pneumonia. **N Engl J Med 2004**; 350:2487-2498.
- 28- Wissmann G, Martin-Garrido I, Varela JM, et al. Identification of *Pneumocystis* colonization in patients treated with infliximab. **Ann Rheum Dis 2008**; eletter feb 4.
- 29- Wissmann G, Varela JM, Calderón EJ. Prevention of *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory bowel disease based on the detection of colonization. **Inflamm Bowel Dis 2008**; 14:1751-1752.
- 30- Frenkel JK. *Pneumocystis* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. **National Cancer Institute Monograph 1976**; 43:13-30.
- 31- Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, et al. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. **Mol Biochem Parasitol 1991**; 45:183-184.

- 32- Banerji S, Lugli EB, Miller RF, et al. Analysis of genetic diversity at the *arom* locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. **J Eukaryot Microbiol** **1995**; 42:675-679.
- 33- Denis CM, Mazars E, Guyot K, et al. Genetic divergence at the *SODA* locus of six different *formae speciales* of *Pneumocystis carinii*. **Med Mycol** **2000**; 38:289-300.
- 34- 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.
- 35- Beard C, Roux P, Nevez G, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis* pneumonia. **Emerg Infect Dis** **2004**; 10: 1729-1735.
- 36- 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.
- 37- Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. **J Clin Microbiol** **1996**; 34:1754-1759.

- 38- Miller RF, Ambrose HE, Novelli V, Wakefield AE. Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* infection. **J Clin Microbiol** 2002; 40:1555-1557.
- 39- Beard CB, Carter JL, Keely SP, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. **Emerg Infect Dis** 2000; 6:265-272.
- 40- Nevez G, Chabé M, Rabodonirina M, et al. Nosocomial *Pneumocystis jirovecii* infections. **Parasite** 2008; 15:359-365.
- 41- 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.
- 42- Yasaki H, Yasaki H, Uchida K, et al. Outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in renal transplant recipients: *P. jirovecii* is contagious to the susceptible host. **Transplantation** 2009; 88:380-385.
- 43- Arichi N, Kishikawa H, Mitsui Y, et al. Cluster outbreak of *Pneumocystis* pneumonia among kidney transplant patients within a single center. **Transpl Proc** 2009; 41: 170-172.
- 44- Gianella S, Haerberli L, Joos B, et al. Molecular evidence of interhuman transmission in an outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia among renal transplant recipients. **Transpl Infect Dis** 2010; 12:1-10.

- 45-Goto N, Oka S. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplantation. **Transpl Infect Dis.** 2011; 13:551-558.
- 46-Choukri F, Menotti J, Sarfati C, et al. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. **Clin Infect Dis** 2010; 51:259-265
- 47-Choukri F, Aliouat EM,² Jean Menotti J,¹ Anne Totet, et al. Dynamics of *Pneumocystis carinii*: Air Shedding During Experimental Pneumocystosis. **J Infect Dis** 2011; 203:1333–1336.
- 48-Siegel, JD, Rhinehart, E, Jackson, M, et al. Guideline for isolation precautions: Preventing transmission of infectious agents in healthcare settings, June 2007. <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>
- 49-Wissmann G, Morilla R, Friaza V, et al. El ser humano como reservóio de *Pneumocystis*. **Enferm Infec Microbiol Clin** 2010; 28: 38-43.
- 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-Rivero L, de la Horra C, Montes-Cano MA, et al. *Pneumocystis jirovecii* transmission from immunocompetent carriers to infant. **Emerg Infect Dis** 2008; 14: 1116-1118.

- 52- Crothers K, Huang L, Morris A, et al. *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutations in patients with *Pneumocystis* pneumonia who are newly diagnosed with HIV infection. **J Eukaryot Microbiol** 2003; 50(Suppl):S609–S10.
- 53- Peterson JC, Cushion MT. *Pneumocystis*: Not just pneumonia. **Curr Opin Microbiol** 2005; 8:393–398.
- 54- Morris A, Wei K, Afshar K, et al. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. **J Infect Dis** 2008; 197:10–17.
- 55- Davis JL, Welsh DA, Beard CB, et al. *Pneumocystis* colonization is common among hospitalized HIV-infected patients with non-*Pneumocystis* pneumonia. **Thorax** 2008; 63: 329–334.
- 56- Morris A, Kingsley LA, Groner G, et al. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV infected-men. **AIDS** 2004; 18:793–798.
- 57- Sing A, Schmoltdt S, Laubender RP, et al. Seasonal variation of *Pneumocystis jirovecii* infections: analysis of underlying climatic factors. **Clin Microbiol Infect** 2009; 15: 957 – 960.
- 58- Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE, et al. Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in human immunodeficiency virus-infected patients. **J Infect Dis** 2003; 187:901–908.

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

60- 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.

61- Patil SP, Board KF, Lebedeval P, et al. Immune responses to *Pneumocystis* colonization and infection in a simian model of AIDS. **J Eukaryot Microbiol** **2003**; 50(Suppl):661S–662S.

62- Norris KA, Morris A, Patil S, et al. *Pneumocystis* colonization, airways inflammation and pulmonary decline function in acquired immunodeficiency syndrome. **Immunol Res** **2006**; 36:175–187.

63- Morris A, Scirba FC, Karen A. *Pneumocystis*: a novel pathogen in chronic obstructive pulmonary disease. **COPD** **2008**; 5:43-51.

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

65- Sivam S, Scirba FC, Lucht LA. Distribution of *Pneumocystis jirovecii* in lungs from colonized COPD patients. **Diagn Microbiol Infect Dis** **2011**;71:24-28.

66- Gal SL, Héry-Arnaud G, Ramel S, et al. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. **Scand J Infect Dis** 2010; 42: 225-227.

67- 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: 2717-2718.

68-Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, et al. Prevalence of colonization and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. **Clin Microbiol Infect** 2005; 11: 1012-1015.

69- Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. **Med Mycol** 2011 [Epub ahead of print].

70- Varela JM, Regordán C, Medrano FJ, et al. Climatic factors and *Pneumocystis jirovecii* infections in southern Spain. **Clin Microbiol Infect** 2004; 10:770-772.

71- Lubis N, Baylis D, Short A, et al. Prospective cohort study showing changes in the monthly incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Postgrad Med** 2003; 79:164-166.

72- Calderon EJ, Friaza V, Dapena FJ, et al. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis. **Med Mycol** 2010; 48 (Suppl1): S17-S21.

73- Vidal S, De La Horra C, Martín J, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonisation in patients with interstitial lung disease. **Clin Microbiol Infect** 2006;12:231–235.

74- 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.

75- Maskell NA, Waine DJ, Lindley A, et al. Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jirovecii* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. **Thorax** 2003; 58:594 -597.

76- Wissmann G, Morilla R, Martin-Garrido I, et al. *Pneumocystis jirovecii* colonization in patients treated with infliximab. **Eur J Clin Invest** 2011; 41: 343–348.

77- 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; 39:3877-3882.

78- 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.

79- 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.

80- Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, et al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. **Clin Microbiol Infect** 2004; 10:1029 – 1031.

81- Vargas SL, Pizarro P, López-Vieyra M. *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. **Clin Infect Dis** 2010; 50:e19-21.

82- Medrano FJ, Respaldiza N, Medrano A, et al. Seroprevalence of *Pneumocystis* human infection in Southern Spain. **J Eukaryot Microbiol** 2003; 50:649-650.

83- Medrano FJ, Montes-Cano MA, Conde M, et al. *Pneumocystis jirovecii* in general population. **Emerg Infect Dis** 2005; 11:245-250.

84- Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, et al. *Pneumocystis* colonization is highly prevalent in the autopsied lungs of the general population. **Clin Infect Dis** 2010; 50:347–353.

85- Calderón EJ. *Pneumocystis* Infection: Seeing beyond the tip of the iceberg. **Clin Infect Dis** 2010; 50:354–356.

86- Casanova-Cardiel L, Leibowitz MJ. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. **J Eukaryot Microbiol** 1997; 44:28.

87- Vargas S.L, Hughes WT, Wakefield AE, et al. Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. **J Infect Dis** 1995; 172:506–510.

88- Totet A, Duwat H, Magois E, et al. Similar genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in different forms of *Pneumocystis* infection. **Microbiology** 2004; 150:1173–1178.

89- Totet A, Latouche S, Lacube P, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteorate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. **Emerg Infect Dis** 2004; 10:667–673.

3. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A PcP é uma infecção oportunista grave em pacientes infectados pelo vírus HIV e pacientes com imunossupressão por outras causas. A partir da introdução da terapia antiviral combinada para o tratamento da infecção pelo HIV, foi registrada uma queda na incidência da PcP nesta população. Entretanto, um número crescente de casos tem sido observado em outras populações: pacientes com câncer, doenças reumatológicas e submetidos ao transplante de órgãos, entre outros.

O *P. jirovecii* é uma espécie específica do ser humano. Está documentado que o *P. jirovecii* está bem adaptado ao alvéolo pulmonar, único local onde é verificada sua multiplicação. Assim, o reservatório deve estar no próprio homem, ou seja, nos pacientes com PcP e nos indivíduos colonizados pelo fungo.

A transmissão do microorganismo ocorre por via aérea, de pessoa a pessoa. Está documentado que tanto os pacientes com PcP como os sujeitos simplesmente colonizados são capazes de transmitir o *P. jirovecii*.

A colonização já foi relatada em alguns grupos específicos, como os pacientes infectados pelo HIV, os portadores de algumas doenças respiratórias crônicas e os pacientes em uso de imunossupressores. Entretanto, não é conhecida a distribuição da colonização na comunidade. A colonização em pessoas adultas saudáveis, por exemplo, necessita ser analisada, já que isto aumentaria o reservatório de forma significativa.

Não há nenhum relato, até o momento, sobre a colonização pelo *P. jirovecii* na comunidade. A partir disto, o presente estudo busca investigar a presença do fungo entre os 5.216 habitantes da comunidade atendida pela Unidade Básica de Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), numa área geográfica específica no bairro Santa Cecília, Porto Alegre. O projeto foi aprovado, sob protocolo 09-118, pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA.

O conhecimento do reservatório e fonte de infecção do *P. jirovecii* na população em geral deve ter impacto nas futuras estratégias de prevenção da PcP em indivíduos susceptíveis.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Estudar a colonização pelo *P. jirovecii* na comunidade que reside na área geográfica atendida pela Unidade Básica de Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Determinar a prevalência da colonização na comunidade;
- 4.2.2. Investigar a existência de alguma associação entre os dados demográficos e da história clínica dos indivíduos e a colonização pelo *P. jirovecii*;
- 4.2.3. Estudar a colonização entre pessoas adultas saudáveis da população.

**5. ARTIGO A SER ENVIADO AO *THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES*
(BRIEF REPORT)**

Title:

***Pneumocystis jirovecii* colonization in a Southern Brazilian general population**

Running title: *P. jirovecii* colonization in a Brazilian population

Authors:

Brackmann RL^{1,2*}, Müller AL², Prolla JC^{1,2}, Wissmann G^{1,2}.

Affiliations:

¹Postgraduate Program in Respiratory Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

²*Pneumocystis* Study Group, Infectious Diseases Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

*Corresponding author:

Rosicler L. Brackmann, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, Brazil.

Telephone number: 55-51-33588329. Fax number: 55-51-39011101

Abstract word count: 96

Text word count: 1951

Keywords: *Pneumocystis jirovecii*, colonization, reservoir

Abstract

Pneumocystis jirovecii colonization was studied in a Southern Brazilian general population. Using nested-PCR for the mitochondrial large subunit ribosomal RNA (mtLSUrRNA) in oropharyngeal wash samples, colonization was identified in 31 out of 405 (7.7%) individuals in the geographic area of a Primary Healthcare Unit. In a multivariate regression model, smoking and age groups (children and elderly individuals) were independently associated with *P. jirovecii* colonization. Moreover, healthy adults were also colonized by the fungus. The results suggest that the high rate of *P. jirovecii* colonization maintains a significant reservoir and source of infection in the general population.

Pneumocystis jirovecii, previously known as *Pneumocystis carinii*, is the cause of one of the most important opportunistic infections among patients with the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) or immunodeficiency due to other conditions (1).

Molecular techniques based on the polymerase chain reaction (PCR) have demonstrated that *P. jirovecii* is present in respiratory specimens of individuals that do not have clinical or radiological signs of *Pneumocystis* pneumonia (PcP). The epidemiology and clinical significance of this phenomenon, called colonization, have not been fully explained (2).

Previous studies reported on the colonization by *P. jirovecii* in some populations. Among patients infected with Human Immunodeficiency Virus (HIV), the prevalence of colonization by this fungus reaches 68%. Colonization has been found in 41% of the patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), as well as in other specific groups: immunocompromised non-HIV-infected patients, healthcare professionals and pregnant women (3).

In analyses according to age groups, this microorganism has been frequently found in respiratory samples of children and older individuals. These groups seem to have characteristics that may explain colonization, such as primary infection by *P. jirovecii* in the first years of life and decreased cell immunity in older adults (4,5).

Studies about *P. jirovecii* colonization have focused on certain populations, and little is known about that in the general population. Moreover, little is known about colonization in healthy adults (4). Evidence shows that colonized individuals and PcP patients may be the reservoir and a source of infection of *P. jirovecii*, but the reservoir in the general population is not clearly demonstrated (6).

This study assessed the prevalence of *P. jirovecii* colonization in a community, identified clinical and demographic data associated with colonization and investigated whether there is colonization among healthy adults.

Material and Methods

This study was conducted in the geographical area of the Primary Healthcare Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. This Unit has been established in a building other than that of HCPA to provide primary health care to 5,126 individuals living in this area of the city of Porto Alegre.

This cross-sectional study collected data about oropharyngeal wash specimens and clinical and demographic characteristics of 405 individuals randomly selected in this population.

Inclusion criteria were: (a) selection by random sampling; (b) informed consent; (c) possibility to collect oropharyngeal wash specimen. Children younger than 5 years were excluded because of the impossibility to collect the oropharyngeal wash specimen.

The following clinical and demographic data were collected according to the surveys used by the Brazilian Ministry of Health for the epidemiological analysis of a population (7): sex, age, weight, height, education, family income, smoking and alcohol abuse. Participants also reported on any of the following diagnosis: cardiovascular diseases, chronic respiratory diseases, cancer, and diabetes mellitus. Information about the use of corticosteroids, azithromycin or sulfa drugs were also collected. In addition, participants were asked about a contact with the hospital environment.

The use of corticosteroids was classified as use of any dose of the drug via oral, spray or nasal application in the six months before the collection of the clinical specimen. Family income was estimated in number of minimum wages per month at the time of the study. Contact with the hospital environment was defined as any hospitalization or stay with a hospitalized patient for more than 24 h in the last six months. Alcohol abuse was as consumption of four or more doses (woman) or five or more doses (man) of alcoholic beverages in the last 30 days, considering a dose of alcoholic beverage as one shot of distilled alcoholic beverage, one can of beer or one

cup of wine. Obesity was positive for individuals that had a body mass index (BMI) of 30 or greater, calculated according to weight and height. The diagnoses reported by participants were grouped as follows: COPD, cystic fibrosis, asthma and bronchiectasias formed the group of chronic respiratory diseases; hypertension, coronary heart disease, heart failure, dyslipidemia and cerebrovascular diseases were included in the group of cardiovascular diseases (7).

Oropharyngeal wash specimens were collected in the participants' homes; participants rinsed their mouth with 10 ml of saline solution for 1 minute, as previously described (8).

DNA extraction and *P. jirovecii* detection were conducted in the Laboratory of Infectious Diseases of the Research Center of HCPA. *P. jirovecii* detection was carried out by analyzing oropharyngeal samples with nested PCR amplification of the mtLSUrRNA gene of *Pneumocystis*. After samples digestion with proteinase K at 56°C, DNA was extracted from the samples using a commercial kit (QIAamp DNA mini kit; Qiagen, Hilden, Germany) and the gene encoding the mtLSUrRNA was amplified. A two-step protocol was used for nested PCR (9). Briefly, in the first amplification round, the external primers pAZ102-E (5'-GAT GGC TGT TTC CAA GCC CA-3') and pAZ102-H (5'-GTG TAC GTT GCA AAG TAC TC-3') were used. This step yielded a 346 bp fragment. The second round of amplification used the primers pAZ102-X (5'-GTG AAA TAC AAA TCG GAC TAG G-3') and pAZ102-Y (5'-TCA CTT AAT ATT AAT TGG GGA GC-3') and yielded a 260 bp product. Both rounds included 40 cycles of amplification. The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel containing ethidium bromide, and the bands were visualized under UV light. To prevent false positive results due to contamination, pipette tips with filters were used at all stages. DNA extraction, preparation of the reaction mixture, PCR amplification, and detection were performed in different areas of the laboratory. In addition, a positive control was

included in each reaction. To detect any cross-contamination, all PCR steps were performed with a negative control of sterile water. All experiments were repeated at least twice.

Statistical analysis was performed using the SPSS 15.0 (SPSS, Chicago, IL). The Student *t* test, a chi-square test with Yates correction and the Fisher exact test were used to compare the characteristics of colonized and non-colonized cases. When age was analyzed as a categorical variable, the Pearson chi-square test was used to compare the different age groups. The level of significance was set at $p < 0.05$. Finally, those variables that had $p < 0.20$ were included in multivariate analysis.

This study was approved by the ethics committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Results

The study included 405 individuals (189 males and 216 females; median age 35.9 years, range 5-90 years). Eighty-three (20.5%) and 64 (15.8%) individuals reported cardiovascular and chronic respiratory diseases, respectively. Information on diagnosis of diabetes mellitus was obtained from 20 (4.9%), diagnosis of cancer was related by 18 (4.4%), and obesity was found in 46 individuals (11.4%). Smoking was reported by 58 participants (14.3%), and alcohol abuse was described by 57 (14.1%). Data presenting a low family income were collected from 51 (12.6%). Contact with hospital environment occurred in 13 (3.7%) cases. As to the use of anti-*Pneumocystis* drugs and corticosteroid, 15 (3.7%) reported a treatment with sulfa or azitromycin, and 22 (5.4%) individuals had a treatment with corticosteroid in the last 6 months.

P. jirovecii colonization was detected in 31 out of 405 individuals (7.7%).

Table 1 shows the clinical and demographic data of the 405 individuals assessed, according to the presence of *P. jirovecii* colonization. Univariate statistical analysis demonstrated significant associations between colonization and chronic

respiratory disease, and between colonization and smoking.

When age is taken as a categorical variable, the frequency of colonization in childhood (<12 years) adolescents/adults (12-59 years) and elderly (≥60 years) are, respectively, 6/46 (14.3%), 16/313 (5.1%), and 9/50 (18.0%). Statistical analysis using Pearson chi-square showed that childhood and old age are associated with colonization.

In a multivariate model, only smoking and age groups (children and elderly individuals) remained independently associated with *P. jirovecii* colonization (Table 2).

Discussion

This was the first study to evaluate the prevalence of *P. jirovecii* colonization among individuals living in a certain geographic region. Using nested-PCR for mtLSUrRNA to analyze oropharyngeal wash specimens, we found colonization in 7.7% of the individuals randomly selected in the catchment area of the Primary Healthcare Unit of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Statistically significant associations by univariate analysis were found between colonization and chronic respiratory diseases, smoking and specific age groups (children and older individuals). Multivariate analyses revealed that the variables smoking and age groups of children and older persons were independently associated with colonization. These results are compatible with those reported in previous studies, which described the association between these variables and colonization.

Several authors found an association between some chronic respiratory diseases, particularly COPD, and *P. jirovecii*. Morris et al. found that colonization by this fungus results in inflammation of the airways and deterioration of the pulmonary function, and described colonization rates of 36.7% among patients with severe COPD (stage IV, Global Health Initiative on Obstructive Lung Disease [*GOLD*]) and 5.3% among individuals with normal pulmonary function or less severe COPD (10).

Univariate analysis in our study confirmed the association between chronic respiratory diseases and colonization. In multivariate analysis, this variable was not found as independent. It is possible that this statistical result occurred because smoking is a frequent cause of an important percentage of chronic respiratory diseases.

Colonization by *P. jirovecii* was more frequent in two specific age groups: children and elderly individuals. This finding confirms previous analyses conducted separately in each group. High rates of *P. jirovecii* detection in childhood have been reported, reaching 32%, which may indicate primary infection or recolonization. This population plays a role as an important reservoir and source of contamination by this microorganism (4). In this respect, Totet et al. identified the same *P. jirovecii* genotype in children and patients with PcP in the same geographic region, which indicates that there is transmission between these groups (11). Colonization by *P. jirovecii* has also been specifically investigated among older adults. This fungus was detected in 21.5% of 110 individuals older than 65 years, which suggests that the decrease in cell immunity because of ageing may favor colonization (5).

Another risk factor of colonization, clearly identified in our study, was smoking. In 2004, the prevalence of colonization and its risk factors were investigated in a group of 91 patients with HIV infection. In addition to a 42% prevalence rate of *P. jirovecii* detection, smoking appeared as a risk factor for colonization among these patients (12).

Of the 31 individuals in which colonization was identified in our study, 3 were adults that did not refer any type of disease. This finding confirms previous evidence that suggest that the reservoir of *P. jirovecii* in human beings is widely distributed in the community, even among healthy individuals: (i) a high prevalence of anti-*Pneumocystis* antibodies is found in the general population, and this rate increases with age, even among healthy individuals (13); and (ii) an experimental study with mice reported on

the colonization of *P. muris* among healthy animals, which were able to transmit the microorganism to other animals (14). Our study found that healthy adults accounted for 10% of all individuals colonized in the community, which may represent a significant part of the reservoir of *P. jirovecii*.

This study found a 7.7% prevalence of colonization among the individuals living in the geographic area of a primary healthcare unit in Porto Alegre, Brazil. *P. jirovecii* was found in healthy people or those who reported illness, and different age groups. This distribution of colonization in the general population suggests that the reservoir of the fungus in human beings is probably maintained by transmission from individuals that are colonized.

Molecular studies have provided a significant advance in our understanding of *P. jirovecii*. Knowledge about the potential sources of microorganism transmission in the general population may be used in establishing future strategies to prevent PcP among susceptible individuals.

References

- 1- Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* Pneumonia. **N Engl J Med** 2004; 350:2487-2498.
- 2- Morris A, Wei K, Afshar K, et al. Epidemiology and clinical significance of *Pneumocystis* colonization. **J Infect Dis** 2008; 197:10–17.
- 3- Wissmann G, Morilla R, Friaiza V, et al. El ser humano como reservóio de *Pneumocystis*. **Enferm Infec Microbiol Clin** 2010; 28: 38-43.
- 4- Peterson JC, Cushion MT. *Pneumocystis*: Not just pneumonia. **Curr Opin Microbiol** 2005; 8:393–398.
- 5- Vargas SL, Pizarro P, López-Vieyra M. *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory

- sampling. **Clin Infect Dis** 2010; 50:e19-21.
- 6- Aliouat-Denis CM, Chabé M, Demanche C, et al. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. **Infect Genet Evol** 2008; 8:708-726.
 - 7- Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde do Brasil, 2010.
 - 8- Respaldiza N, Montes-Cano MA, Friaza V, et al. Usefulness of oropharyngeal washings for identifying *Pneumocystis jirovecii* carriers. **J Eukaryot Microbiol** 2006; 53:100S-101S.
 - 9- Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, et al. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. **Med Mycol** 2011 [Epub ahead of print].
 - 10- Morris A, Scirba FC, Lebedeva IP, et al. Association of chronic obstructive pulmonary diseases severity and *Pneumocystis* colonization. *Am J Crit Respir Care Med* 2004;170 : 408–413.
 - 11- Totet A, Latouche S, Lacube P, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteorate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. **Emerg Infect Dis** 2004; 10:667–673.
 - 12- Morris A, Kingsley LA, Groner G, et al. Prevalence and clinical predictors of *Pneumocystis* colonization among HIV infected-men. **AIDS** 2004; 18:793–798.
 - 13- Medrano FJ, Respaldiza N, Medrano A, et al. Seroprevalence of *Pneumocystis* human infection in Southern Spain. **J Eukaryot Microbiol** 2003; 50:649-650.

14- 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.

Table 1. Clinical and demographic data of 405 individuals from the general population, according to *P. jirovecii* colonization: univariate analysis.

Characteristic	Colonized individuals	Noncolonized individuals	P-value
	n=31	n=374	
Male sex, no. (%)	14 (45.2)	175 (46.8)	0.999 ¹
Age, mean years ± SD (range)	39.4 ± 25.7 (5-84)	35.6 ± 18.9 (5-90)	0.427 ²
Cardiovascular diseases, no. (%)	5 (16.1)	78 (20.9)	0.693 ¹
Chronic respiratory diseases, no. (%)	11 (35.5)	53 (14.2)	0.004 ^{1*}
Diabetes mellitus, no. (%)	1 (3.2)	19 (5.1)	0.999 ³
Cancer, no. (%)	1 (3.2)	17 (4.5)	0.999 ³
Smoking, no. (%)	10 (32.3)	48 (12.8)	0.007 ^{1*}
Alcohol abuse, no (%)	3 (9.7)	54 (14.4)	0.598 ³
Low family income, no. (%)	5 (16.1)	46 (12.3)	0.571 ³
Previous sulfa or azithromycin use, no. (%)	1 (3.2)	14 (3.7)	0.999 ³
Previous corticosteroid use, no. (%)	4 (12.9)	18 (4.8)	0.077 ³
Obesity, no. (%)	5 (16.1)	41 (11.0)	0.377 ³
Contact with hospital environment, no. (%)	2 (6.5)	11 (2.9)	0.262 ³

¹chi-square test with Yates correction; ²Student *t* test; ³Fischer exact test; *statistically significant.

Table 2. Associations with *P. jirovecii* colonization in 405 individuals from general population: multivariate regression analysis.

Characteristic	Total no (%)	Colonized individuals no (%)	Prevalence ratio (CI 95%)	Adjusted prevalence ratio (CI 95%)
Chronic respiratory disease				
Yes				
No	64 (15.8)	11 (17.2)	2.93 (1.48; 5.82)	1.95 (0.77; 4.93)
	341 (84.2)	20 (5.9)	1.0	1.0
Smoking				
Yes	58 (14.3)	10 (17.2)	2.85 (1.42; 5.74)	3.08 (1.37; 6.95)*
No	347 (85.7)	21 (6.1)	1.0	1.0
Corticosteroid use				
Yes	22 (5.4)	4 (18.2)	2.57 (0.99; 6.72)	1.71 (0.45;6.52)
No	383 (94.6)	27 (7.0)	1.0	1.0
Age, years				
5-11	42 (10.4)	6 (14.3)	3.52 (1.65; 7.53)	3.13 (1.46; 6.72)*
12-59	313 (77.3)	16 (5.1)	1.0	1.0
≥ 60	50 (12.3)	9 (18.0)	2.80 (1.16; 6.75)	3.91 (1.56; 9.80)*

* statistically significant.

6. CONCLUSÕES

Uma prevalência de colonização pelo *P. jirovecii* de 7,7% foi observada entre os habitantes da área geográfica atendida pela Unidade Básica de Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

A presença do *P. jirovecii* foi obtida através de uma *nested*-PCR que amplifica a mtLSUrRNA no lavado orofaríngeo. Os resultados confirmaram a utilidade deste espécime clínico não-invasivo em estudos epidemiológicos.

Entre os dados clínicos e demográficos coletados, o tabagismo e duas faixas etárias (crianças e idosos) foram identificados, após análise estatística multivariada, como variáveis associadas à colonização. Estudos prévios já relataram altas taxas de colonização nestes grupos, o que foi agora confirmado dentro da população geral.

Nosso estudo demonstrou que os adultos saudáveis podem ser colonizados pelo fungo. A colonização entre estes indivíduos aumenta a distribuição do reservatório do *P. jirovecii* na comunidade.

Um grande reservatório do *P. jirovecii* foi demonstrado na população estudada. A colonização ocorre em indivíduos que referiram doenças ou não, de diferentes faixas etárias, o que sugere que o reservatório é dinâmico, ou seja, mantido pela transmissão do fungo entre os indivíduos da comunidade.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este foi o primeiro projeto que buscou compreender o reservatório do *P. jirovecii* através de um estudo sobre a colonização pelo fungo numa comunidade. A prevalência observada de 7,7% demonstra que a presença do *P. jirovecii* é freqüente na população em geral.

Nossos resultados identificaram a colonização em indivíduos que se referiram saudáveis ou doentes, de várias faixas etárias (especialmente em crianças e idosos). A associação da colonização, após análise multivariada, com as faixas etárias de crianças e idosos e com o tabagismo confirma algumas evidências prévias. O tabagismo destaca-se novamente pelos seus efeitos nocivos à saúde humana.

A transmissão do *P. jirovecii* por via aérea, de pessoa a pessoa, está bem documentada. Os pacientes com PcP e os sujeitos colonizados são fonte de infecção do fungo. Nossos resultados indicam uma ampla distribuição do fungo na comunidade e favorecem a idéia de um reservatório dinâmico do *P. jirovecii*, no qual os indivíduos transmitem o fungo entre si e mantêm a microorganismo na população.

Nosso estudo teve algumas limitações, ao adotar um modelo utilizado pelo Ministério da Saúde para a investigação de uma comunidade. Uma das limitações é o agrupamento de doenças cardiovasculares e respiratórias crônicas, a partir do qual não é possível conhecer adequadamente algumas variáveis que são isoladamente importantes nos estudos sobre o *P. jirovecii*, como a DPOC.

Outro achado que pode indicar uma limitação do inquérito utilizado é a ausência de uma associação estatisticamente significativa entre o uso de corticóide e a colonização. Esta associação foi descrita por vários autores. Como a variável do nosso estudo foi o “uso de corticóide nos últimos seis meses”, é possível que muitos indivíduos não pudessem recordar este tratamento.

Entretanto, nosso estudo gerou um banco de dados extenso. Um aprendizado

que este projeto proporcionou foi a necessidade de gerar, num estudo de base populacional, um banco de dados atualizado e livre de inconsistências, à disposição para diferentes análises na comunidade estudada.

O estudo desta Dissertação esteve inserido na linha de pesquisa em epidemiologia molecular do *P. jirovecii*, em desenvolvimento há três anos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Nosso grupo de trabalho está localizado no Centro de Pesquisa Experimental do HCPA e contribuiu, neste período, com dados sobre a colonização pelo *P. jirovecii* na Fibrose Cística, nos profissionais de saúde e em pacientes imunossuprimidos. De forma gradual, temos implementado as técnicas de detecção, amplificação (*nested*-PCR e RT-PCR) e genotipagem (DHPS, mtLSUrRNA e mtSSUrRNA). Agora estamos vinculados à Rede Iberoamericana sobre Pneumocistose, mantida pelo *Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo (CYTED)*, o que ampliará a colaboração com outros grupos.

Alguns pesquisadores consideram que as medidas do *Centers for Disease Control and Prevention, CDC / USA*, descritas no capítulo 2.3, estão defasadas frente às evidências que o estudo molecular do *P. jirovecii* trouxe nos últimos anos. Esperamos que a compreensão de um reservatório que é distribuído amplamente na população traga dados úteis para as medidas de prevenção da infecção ao nível hospitalar e de saúde coletiva.

A provável manutenção do reservatório na população através da transmissão entre os indivíduos, além dos aspectos em discussão sobre as recomendações do *CDC*, estimulou nosso grupo a planejar dois projetos para o ano de 2012, vinculados ao HCPA e ao PPG em Ciências Pneumológicas / UFRGS: a) o estudo da transmissão do *P. jirovecii* a partir de pacientes com PcP para outros indivíduos no mesmo quarto hospitalar; b) o estudo da transmissão nosocomial do *P. jirovecii* a partir de pacientes colonizados.

8. ANEXOS

8.1. Anexo I

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 Especial de Doenças Infecciosas, localizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e direcionado ao estudo molecular de doenças infecto-parasitárias.

- Extração do DNA: foi utilizado um kit comercial (QIAamp DNA Mini Kit); posteriormente as amostras são 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, et al. Usefulness of Oropharyngeal washings for identifying *Pneumocystis jirovecii* carriers. **J Euk Microbiol** 2006; 3:100S-101S.
- 2- Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, et al. Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. *Mol Biochem Parasitol* 1990; 43: 69-76.

8.2. Anexo II: Área geográfica da comunidade atendida pela Unidade Básica de Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre

