

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

André Luís Aquino Müller

**PRESENÇA DA MUTAÇÃO NO GENE DA DIIDROPTEROATO SINTETASE DO
PNEUMOCYSTIS JIROVECII EM PACIENTES COM A SÍNDROME DA
IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA NO BRASIL**

Porto Alegre

2018

André Luís Aquino Müller

**PRESENÇA DA MUTAÇÃO NO GENE DA DIIDROPTEROATO SINTETASE DO
PNEUMOCYSTIS JIROVECII EM PACIENTES COM A SÍNDROME DA
IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA NO BRASIL**

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

Orientadora: Prof.^a Marli Maria Knorst

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Wissmann Neto

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Müller, André Luís Aquino

Presença da mutação no gene da Diidropteroato sintetase do *Pneumocystis Jirovecii* em pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida no Brasil / André Luís Aquino Müller. -- 2018.

55 f.

Orientadora: Marli Maria Knorst.

Coorientador: Gustavo Wissmann Neto.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. *Pneumocystis Jirovecii*. 2. Pneumonia por *Pneumocystis Jirovecii*. 3. Diidropteroato sintetase. 4. síndrome da imunodeficiência adquirida. I. Knorst, Marli Maria, orient. II. Wissmann Neto, Gustavo, coorient. III. Título.

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

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 09 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 11 |
| 2.1. <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 11 |
| 2.2. Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 12 |
| 2.2.1 Epidemiologia | 12 |
| 2.2.2 Achados clínicos e laboratoriais na Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 13 |
| 2.2.3 Diagnóstico na Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 14 |
| 2.2.4 Tratamento da Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 15 |
| 2.2.5 Profilaxia da Pneumonia por <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 17 |
| 2.3. Diagnóstico molecular do <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 18 |
| 2.4. As mutações do <i>Pneumocystis jirovecii</i> | 19 |
| 3. JUSTIFICATIVA..... | 24 |
| 4. OBJETIVO | 25 |
| 4.1. Objetivo geral..... | 25 |
| 4.2. Objetivos secundários | 25 |
| 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA | 26 |
| 6. ARTIGO CIENTÍFICO | 31 |
| 7. CONCLUSÕES | 51 |
| 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 52 |
| 9. ANEXOS | 53 |

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS= *Acquired immunodeficiency syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Humana Adquirida)

CYB = *Cytochrome B* (Citocromo B)

DHPS= Dihydropteroate synthetase (diidropteroato sintetase)

DNA= Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)

HCPA= Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HIV= Vírus da Imunodeficiência Humana

ITS= *Internal transcribed spacer* (espaçador interno transcrito)

mtLSUrRNA= Mitochondrial large subunit ribosomal RNA (grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial)

mtSSUrRNA= Mitochondrial small subunit rRNA (pequena subunidade do RNA ribossômico mitocondrial)

PCR= Polymerase Chain Reaction (reação em cadeia pela polimerase)

PCP= Pneumonia por *Pneumocystis*

RNA= Ribonucleic acid (ácido ribonucleico)

SOD = Superoxide dismutase (Soda Locus)

SMX-TMT = Sulfametoxazol – trimetoprima

TMP-SMX = Trimethoprim-sulfamethoxazole

LISTA DE TABELAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 Genótipos mais utilizados na epidemiologia molecular do *P. jirovecii*.20

Tabela 2 Genótipos do DHPS utilizados na epidemiologia molecular do *P. jirovecii*.22

ARTIGO

Tabela 1 Características dos 18 casos com SIDA e PCP50

RESUMO

Introdução: O *Pneumocystis jirovecii* pode causar uma pneumonia grave (PCP) em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). A principal opção para tratamento da PCP e para sua profilaxia é a sulfa. A presença de uma mutação no gene da diidropteroato sintase (DHPS) do *P. jirovecii* pode gerar uma resistência ao fármaco. **Objetivo:** O objetivo do estudo foi avaliar a presença da mutação DHPS e a mortalidade em pacientes com PCP e SIDA. **Métodos:** Foram estudadas 18 amostras de lavado bronco alveolar de pacientes adultos (idade ≥ 18 anos) com PCP e SIDA no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil) entre janeiro de 2016 e dezembro de 2017. A extração do DNA do fungo foi realizada com o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit*. Após foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *Primers* do gene DHPS do *P. jirovecii*. A purificação do produto de PCR foi realizada pelo método enzimático (EXOSAP) e o sequenciamento utilizando o equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). **Resultados:** Dez pacientes tinham diagnóstico prévio de SIDA, 5 estavam recebendo terapia antirretroviral e um realizava quimioprofilaxia para PCP. A amplificação do DNA foi positiva para o DHPS em 16 das 18 amostras. Em 15 amostras a PCR apresentou o chamado “padrão selvagem” na tipagem molecular do *P. jirovecii* no *locus* da DHPS, ou seja, ausência de mutação. Padrão duplo mutante, isto é, mutação nos códons 55 e 57 foi detectado em um paciente (6,25%), que não havia recebido profilaxia para PCP. Dois pacientes morreram na internação, um destes tinha a mutação. **Conclusões:** Os resultados sugerem que as mutações DHPS ainda são raras no Brasil; entretanto, as mesmas precisam ser continuamente monitoradas, uma vez a mutação pode estar associada à resistência ao TMT-SMT. A mortalidade por PCP foi significativa.

Palavras-chaves: *Pneumocystis jirovecii*, SIDA, mutação DHPS.

ABSTRACT

Background: Pneumocystosis is an opportunistic infection caused by the single-cell fungus *Pneumocystis jirovecii*, which mainly affects patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), causing severe pneumonia (PCP). The combination of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) is the main option for the treatment and prophylaxis of PCP. The presence of a mutation in the dihydropteroate synthase (DHPS) gene of *P. jirovecii* can lead to drug resistance. **Aim:** The objective of this study was to evaluate the presence of the DHPS mutation and mortality in patients diagnosed with PCP and AIDS. **Methods:** Eighteen samples of bronchoalveolar lavage were collected from adult patients (age ≥ 18 years) from the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (Rio Grande do Sul, Brazil) between January 2016 and December 2017. Clinical data were collected from the electronic medical records. In order to evaluate the mutation, after performing the polymerase chain reaction (PCR) with DHPS gene primers of *P. jirovecii*, the DNA of the fungus was extracted using the PureLink™ Genomic DNA Kit. The PCR product was purified using the enzymatic method (EXOSAP) prior to sequencing using the ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). **Results:** Ten patients had been previously diagnosed with AIDS, five were receiving antiretroviral therapy and one had undergone chemoprophylaxis for PCP. DNA amplification was positive for DHPS in 16 of the 18 samples. In 15 samples the PCR showed the so-called "wild pattern" in the molecular typing of *P. jirovecii* at the DHPS locus, that is, absence of mutation. Double mutation at codons 55 and 57 was detected in one patient (6.25%), who had not received prophylaxis for PCP. Two patients died in hospital, one of them had the DHPS double mutation. **Conclusion:** The results suggest that DHPS mutations are still rare in Brazil; however, continuous monitoring is necessary since they may be associated with increased resistance of *P. jirovecii* to SMT - TMT. PCP mortality was significant.

Key-words: *Pneumocystis jirovecii*, AIDS, DHPS mutation.

1. INTRODUÇÃO

O *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) causa uma infecção grave em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) com uma contagem de CD4 < 200 células/ μ mol (1,2), (sem tratamento antirretroviral ou profilaxia apropriada) ou imunossuprimidos por outras causas, como pacientes receptores de transplante de medula óssea ou órgãos sólidos, pacientes com câncer (especialmente neoplasias hematológicas), e aqueles recebendo corticosteroides, quimioterapia e outras medicações imunossupressivas (2).

A genotipagem do *P. Jirovecii* é útil para conhecer a epidemiologia deste fungo que infecta o ser humano. Os métodos de genotipagem são baseados na amplificação de DNA (PCR) seguida do sequenciamento direto do produto amplificado (3). As mutações mais comuns no gene diidropteroato sintetase (DHPS) ocorrem no códon 55 (Treonina para Alanina) e no códon 57 (Prolina para Serina) e a presença dessas mutações pode ser a causa de resistência a fármaco (4). Os genótipos DHPS foram classificados como: Tipo selvagem: nenhuma mutação observada; DHPS mutante 55: mutação única na posição 165 (Treonina/Alanina); DHPS mutante 57: mutação única na posição 171 (Prolina/Serina); DHPS mutante 55-57: mutação dupla na posição 165-171 (5).

A presença de mutação no gene da diidropteroato sintetase foi pouco estudada no nosso meio. Um estudo avaliou 70 pacientes com pneumonia por *P. jirovecii* em Porto Alegre, Brazil de 1997 a 2004 não evidenciou a presença de mutação no gene DHPS (6). No nosso conhecimento, não há publicações posteriores que tenham demonstrado a presença da mutação no gene da DHPS do *P. jirovecii* no nosso meio. Além da busca de um maior conhecimento sobre a epidemiologia da infecção

pelo *P. jirovecii*, é importante monitorar a ocorrência das mutações na diidropteroato sintetase do *P. jirovecii* assim como estudar se as mesmas estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana do patógeno ao sulfametoxazol-trimetoprima (SMX -TMP).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. *Pneumocystis jirovecii*

A história do espécime *Pneumocystis* começou no Brasil em 1909, quando Carlos Chagas, do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, descobriu sua forma cística nos pulmões de cobaias. Entretanto, este pesquisador concluiu erroneamente que se tratava de uma fase do ciclo de vida do *Trypanossoma cruzi* (7). Em 1910, um pesquisador italiano chamado Antônio Carini, erradicado em São Paulo, identificou o mesmo agente em pulmões de rato (8). Em 1912, no Instituto Pasteur de Paris, França, foi demonstrado que os cistos visualizados nos pulmões de ratos correspondiam a um novo patógeno. Os pesquisadores Delanoe e Delanoe o denominaram de *Pneumocystis carinii* ("pneumo" pelo tropismo pelo pulmão, "cystis" por sua forma característica e "carinii" para homenagear Antônio Carini) (9).

O *Pneumocystis* foi inicialmente considerado um protozoário, em virtude da semelhança morfológica do microrganismo e da resposta a medicamentos comumente utilizados para tratar infecções por protozoários. No entanto, alguns pesquisadores sugeriram que o microrganismo poderia se tratar de um fungo, ainda que não tivesse ergosterol na membrana plasmática e não crescesse em meios de cultura usuais (10).

Em 1988, a análise genética do microrganismo pôde confirmar que o mesmo se tratava de um fungo. Além disto, estudos moleculares observaram que existem espécies de *Pneumocystis* específicas para diferentes mamíferos, com características genômicas e antigênicas distintas. Cada espécie de *Pneumocystis* passou a ser denominada conforme o seu hospedeiro específico (10).

O gênero *Pneumocystis* abrange as seguintes espécies já identificadas: *P. murina* em camundongos, *Pneumocystis carinii* e *Pneumocystis wakefieldiae* em

ratos e *Pneumocystis oryctolagi* em coelhos. A espécie que infecta os seres humanos é hoje denominada *P. jirovecii*. Outros microorganismos que pertencem ao gênero *Pneumocystis* foram identificados em macacos, furões, cavalos, porcos e cachorros, mas sem denominação específica (11).

2.2. Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

2.2.1 Epidemiologia

O *P. jirovecii* é um patógeno oportunista. Em pacientes imunossuprimidos ele causa a pneumonia por *Pneumocystis* (PCP) (12). A primeira descrição da PCP foi feita em 1952 pelo parasitologista Otto Jirovec, que identificou o *Pneumocystis* como agente etiológico da PCP em crianças desnutridas (13). Poucos casos foram relatados nas décadas seguintes, até que a SIDA se tornou uma pandemia e o *P. jirovecii* causou pneumonia em cerca de 60% dos pacientes no momento do diagnóstico desta síndrome, conforme dados norte-americanos (14).

Com a utilização da terapia antiretroviral combinada, a partir do ano de 1996, as taxas de PCP passaram a diminuir consideravelmente entre os pacientes com SIDA nos países desenvolvidos. Entretanto, a PCP ainda é comumente observada nos países onde as medicações antiretrovirais não estão disponíveis (15).

Diversos estudos mostram, por outro lado, um aumento da incidência da PCP entre indivíduos sem o vírus da imunodeficiência humana (HIV-negativos), isto é, pacientes recebendo substâncias imunossupressivas. Entre os grupos de risco estão pacientes com câncer, principalmente neoplasias hematológicas, receptores de transplante de órgãos sólidos ou transplante de medula óssea, usuários de corticosteroides e portadores de doenças reumatológicas (16,17,18).

Segundo uma estimativa recente, cerca de 500.000 casos de pneumonia por *P. jirovecii* (PCP) ocorrem anualmente no mundo (19). A prevalência de PCP no Brasil é de 2,1 por 100.000 habitantes, sendo de 4,7 por 100.00 em portadores de SIDA com contagem de CD4 < que 350 (20).

Nos pacientes portadores do HIV a mortalidade por PCP varia de 10 a 30% e pode ser maior se o diagnóstico é retardado (21) e em pacientes sem terapia antirretroviral ou que suspenderam a mesma (22,23). Nos pacientes imunossuprimidos não infectados pelo HIV a mortalidade é de 35 a 50% (24,25 26, 27,28).

2.2.2 Achados clínicos e laboratoriais na Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

As manifestações clínicas da PCP se caracterizam pela presença de febre (80 a 100 %), tosse geralmente seca (95 %), dispnea (95 %) e taquipneia (60 %) que progridem em dias a semanas (29). Em imunodeprimidos sem infecção pelo HIV o quadro clínico pode ser mais fulminante. Outros sintomas que podem estar presentes são fadiga, calafrios, dor torácica e perda de peso. Cerca de 5 a 10% dos pacientes são assintomáticos. Em pacientes com HIV o risco de PCP aumenta quando há redução da contagem de CD4, a maioria dos casos ocorrendo quando a mesma está abaixo de 200 células/ml (30), em pacientes sem tratamento antirretroviral ou profilaxia adequada.

Entre as alterações laboratoriais que acompanham a PCP está a hipoxemia. Um aumento do gradiente alvéolo-arterial de oxigênio ocorre em mais de 90% dos pacientes, que varia de leve (gradiente alvéolo-arterial de oxigênio < 35 mm Hg) a grave (gradiente alvéolo-arterial de oxigênio > 45 mm Hg) (31). Outro achado é o

aumento do nível da desidrogenase láctica (DHL), que também tem um significado prognóstico (32). PCP é altamente improvável, se o paciente apresentar uma difusão pulmonar por monóxido de carbono normal. Por outro lado, níveis plasmáticos > 80 pg/ml de 1-3-Beta-d-glucano, um componente da parede celular do *P. jirovecii*, são observados na PCP (33).

A radiografia de tórax pode ser inicialmente normal em até um quarto dos pacientes com PCP. O achado radiográfico mais frequente é a presença de infiltrado alveolar ou intersticial bilateral difuso (34). Achados menos frequentes são cistos, nódulos e derrame pleural. A tomografia computadorizada de alta resolução tem sensibilidade e especificidade maiores que a radiografia de tórax para detectar achados compatíveis com PCP.

2.2.3. Diagnóstico da Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

Uma vez que o *P. jirovecii* não cresce em cultura, o fungo pode ser identificado no material obtido na indução do escarro induzido com solução hipertônica nebulizada ou em lavado broncoalveolar obtido por fibrobroncoscopia. A imunofluorescência usando fluoresceína é a coloração de escolha para identificação do fungo. Nos últimos anos, a reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada para identificar o *P. jirovecii* no lavado broncoalveolar. Uma das desvantagens do método é que ele é incapaz de distinguir colonização de doença ativa (35). Em situações específicas, procedimentos mais invasivos como biópsia transbrônquica ou transtorácica, ou biópsia pulmonar a céu aberto podem ser necessárias para obter material para confirmação diagnóstica.

2.2.4 Tratamento da Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

Fatores como a presença de alergia à sulfa, situações que impactam na administração oral ou absorção dos medicamentos (candidíase oral e esofágica ou diarreia), assim como a gravidade da PCP são considerados na decisão terapêutica. A PCP é considerada leve quando o gradiente alvéolo arterial de oxigênio (AAO₂) é < 35 mmHg e/ou a pressão parcial de oxigênio arterial é ≥ 70 mmHg, moderada com gradiente AAO₂ ≥ 35 e < 45 mmHg e/ou com pressão parcial de oxigênio arterial ≥ 60 e < 70 mmHg, e grave com gradiente AAO₂ > 45 mmHg e/ou com pressão parcial de oxigênio arterial < 60 mmHg (36).

A combinação de sulfametoxazol - trimetoprima (SMX -TMP) é a opção terapêutica de primeira linha no tratamento da PCP (37). O TMT é um inibidor da diidropteroato redutase e o SMT é um inibidor da DHPS sintetase. O SMX -TMP tem boa biodisponibilidade, tem eficácia comprovada e baixo custo no tratamento da PcP (38). A duração do tratamento da PCP deve ser de 21 dias (37). O SMX -TMP para tratar PCP é indicado independente da gravidade da doença, podendo a via intravenosa ser necessária até a estabilização clínica do paciente. Estudos em PCP grave demonstraram a superioridade do SMX -TMP em comparação com esquemas alternativos (39,40,41,42,43). Em casos de PCP moderada a grave é recomendado o uso concomitante de corticosteroides (37). Embora os dados sobre o efeito do corticosteroide na PCP em pacientes sem infecção pelo HIV sejam limitados, considerando a grande intensidade da reação inflamatória nos pulmões afetados pelo *P. jirovecii*, o seu uso tem sido recomendado (44).

Pacientes que não demonstram melhora da dispneia, taquipneia e hipoxemia após 4 a 8 dias podem ser considerados como falha terapêutica (45). Entre as possibilidades para a não resposta estão a gravidade da doença no momento do

diagnóstico ou outra infecção concomitante não identificada. Outra possibilidade a ser considerada está o desenvolvimento de alguma mutação associada à resistência à sulfa; entretanto, o impacto clínico da resistência medicamentosa ainda não está estabelecido (46,47).

Reações adversas ao SMT-TMT são frequentes em pacientes tratados com PCP e variam em intensidade (48). Os efeitos adversos mais comuns são intolerância gastrointestinal, fotossensibilidade, reações cutâneas e febre, que podem se acompanhar de leucopenia, hiperpotassemia, e alterações laboratoriais compatíveis com insuficiência renal ou hepática (49). Na presença de *rash* cutâneo e/ ou febre persistente por mais de 5 dias, neutrofilia (< 500 células/mm³), hipotensão, ou hiperpotassemia intratável ou febre e quadro sugestivo de Influenza o tratamento deve ser prontamente suspenso (50).

Para pacientes com reações adversas leves ao SMT - TMT a primeira opção seria tentar uma dessensibilização, uma vez que este é o tratamento com melhor eficácia na pneumocistose. Entre as terapias alternativas para pacientes com PCP que não toleram o SMT - TMT estão a dapsona-TMT, a dapsona-pirimetamina, clindamicina-primaquina e a pentamidina intravenosa (37, 38).

Após o término do tratamento, os pacientes com PCP devem receber tratamento com baixa dose de SMT-TMT para prevenir a recorrência da infecção (profilaxia secundária) em esquema terapêutico semelhante ao da profilaxia primária. Em pacientes com infecção pelo HIV o risco de desenvolver PCP recorrente sem profilaxia secundária é de 60 a 70% por ano em pacientes sem tratamento antiretroviral (30). Em pacientes que não estão em uso de antiretrovirais no momento do diagnóstico da PCP, recomenda-se que o mesmo seja iniciado nas

primeiras duas semanas, de preferência tão logo o paciente esteja estabilizado com o tratamento para PCP (45).

2.2.5 Profilaxia da Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*

O SMT - TMT é o medicamento de primeira linha na profilaxia da PCP. Na impossibilidade do uso da primeira linha, esquemas alternativos com dapsona (com ou sem pirimetamina), atovaquona, ou pentamidina em aerossol podem ser considerados. A profilaxia deve ser continuada enquanto o fator de risco para PCP estiver presente (51, 52, 53) e está associada a uma redução de 85% na ocorrência de PCP comparada com a ausência de terapia ou uso de profilaxia com fluoroquinolona, que é inativa contra o *Pneumocystis* (relative risk [RR] 0.15, 95% CI 0.04-0.62) (54).

A profilaxia primária de PCP para pacientes com SIDA é recomendada na presença de contagem CD4 < 200 células/ μ L, candidíase orofaríngea, contagem de CD4 < 14%, CD4 entre 200 e 250 células/ μ L quando a monitorização frequente das células CD4 (a cada três meses) não é possível ou ainda em indivíduo com uma doença definidora de SIDA que não iniciou tratamento antiretroviral ou que não estão virologicamente suprimidos em um regime antiretroviral (45).

Diversos consensos estão disponíveis para orientar a profilaxia da PCP em pacientes com câncer, incluindo os receptores de transplante de células-tronco hematopoiéticas e de transplante de órgãos sólidos (23,51,52,55).

Apesar de sua eficácia comprovada, vários estudos relataram falha na profilaxia ou tratamento com SMX -TMP quando a mutação está presente (4).

O uso do SMX -TMP inibe seletivamente a síntese de folato diminuindo consideravelmente a frequência de PCP. Uma das enzimas envolvidas na síntese do

ácido fólico é a DHPS (4,56,57). A outra enzima envolvida na síntese de ácido fólico é dihidrofolato redutase (DHFR), que é codificada em um gene separado. As mutações DHPS e DHFR foram documentadas como o mecanismo pelo qual a sulfa pode sofrer resistência. Além disso, a maioria dos estudos mostrou associação entre o uso crônico de fármacos administrados como profilaxia e a presença de mutações DHPS, sugerindo que a pressão de seleção de medicamentos é o mecanismo pelo qual ocorre um aumento de DHPS mutantes em *P. jirovecii* (56, 57).

A implicação clínica da presença de mutações no DHPS em pacientes tratados com SMT - TMT não está estabelecida. Os dados sobre a correlação entre mutações DHPS e mortalidade por PCP são insuficientes e os achados de estudos retrospectivos são conflitantes. Pode-se dizer que a velocidade de resposta ao tratamento com sulfa pode estar comprometida em pacientes com PCP e que apresentem mutações no DHPS (37,56).

2.3. Diagnóstico molecular do *Pneumocystis jirovecii*

O *P. jirovecii* não cresce em meios de cultura convencionais. Por isso, somente após a introdução da biologia molecular foi possível avançar no conhecimento deste microorganismo (58).

Acreditava-se que a PCP ocorria em pacientes imunossuprimidos através da reativação de uma infecção latente adquirida na infância. Esta ideia era baseada nos estudos sorológicos que demonstravam a presença de anticorpos anti-*Pneumocystis* nos primeiros anos de vida, indicando que o contato com o microorganismo já era frequente neste período (59). Entretanto, novos estudos em animais e humanos, utilizando técnicas de biologia molecular, descartaram a hipótese da infecção latente

e comprovaram que a PCP é uma reinfecção exógena, na qual a transmissão do *P. jirovecii* ocorre por via aérea, de pessoa a pessoa (60).

A genotipagem, que caracteriza geneticamente o *P. jirovecii* é usada para estudar os mecanismos de transmissão do *P. jirovecii* (Beard C 2004). Esse método é baseado na amplificação de DNA (PCR) seguida do sequenciamento direto do produto amplificado (62).

Um estudo investigou um grupo de 16 casos de PCP em pacientes transplantados renais que utilizavam as mesmas dependências no hospital; a concordância de genótipos 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. Novos estudos são necessários para definir, com auxílio das técnicas de genotipagem, os diversos aspectos envolvidos na infecção por *P. jirovecii* (63).

2.4. As mutações do *Pneumocystis jirovecii*

A diversidade genética do *P. jirovecii* foi observada pela primeira vez na grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial (mtLSUrRNA), na qual polimorfismos de base única foram detectados em três posições de nucleotídeos, embora apenas polimorfismos dos nucleotídeos das posições 85 e 248 são rotineiramente relatados e permitem a classificação de seis genótipos deste locus. Na pequena subunidade do RNA ribossômico mitocondrial (mtSSUrRNA), podem ser encontrados três diferentes genótipos, identificados pelo polimorfismo nas posições 160 e 196 do gene (3). Assim, os genótipos da mtLSUrRNA são distribuídos nos seguintes genótipos: 1 (85C/248C), 2 (85A/248C), 3 (85T/248C), 4 (85C/248T) e 5

(85A/248T). Os genótipos da mtSSUrRNA são: 1 (160C/196T), 2 (160A/196G) e 3 (160A/196T) (62).

A caracterização genotípica da mtLSUrRNA e mtSSUrRNA do *P. jirovecii* apresenta variação geográfica. A análise dos genótipos da região mtLSUrRNA deste fungo na Espanha demonstrou a seguinte frequência: 42% do genótipo 3 (85T/248C), 36 % do genótipo 1 (85C/248C), 15% do genótipo 2 (85A/248C), e 6% genótipos mistos demonstrado na tabela 1 (64).

Em estudo realizado em Cuba, a detecção da mtLSUrRNA e da mtSSUrRNA demonstrou o genótipo combinado (85T/248C / 160A/196T) em 13 de 16 pacientes (81,3%) (62).

Os genótipos mais utilizados nos estudos da epidemiologia molecular estão na Tabela 1.

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

| Gene | Genótipos | Posição dos Nucleotídeos |
|------------------|------------------|---------------------------------|
| mt LSU rRNA gene | 1 | 85C/248C |
| mt LSU rRNA gene | 2 | 85A/248C |
| mt LSU rRNA gene | 3 | 85T/248C |
| mt LSU rRNA gene | 4 | 85C/248T |
| mt LSU rRNA gene | 5 | 85A/248T |
| mt LSU rRNA gene | Misto (1 & 2) | 85C/248C e 85A/248C |
| mt LSU rRNA gene | Misto (2 & 3) | 85A/248C e 85T/248C |
| mt LSU rRNA gene | Misto (4 & 5) | 85C/248T e 85A/248T |
| mt SSU rRNA gene | 1 | 160C/196T |
| mt SSU rRNA gene | 2 | 160A/196G |
| mt SSU rRNA gene | 3 | 160A/196T |
| mt SSU rRNA gene | Misto (2 & 3) | 160A/196G e 160A/196T |

RNA: ácido ribonucléico; mtLSUrRNA: grande subunidade do RNA ribossômico mitocondrial; mtSSUrRNA: pequena subunidade do RNA ribossômico mitocondrial; DHPS: diidropteroato sintetase. Adaptado de De Armas Y. et al, 2012.

Outros genótipos, também podem ser usados para investigar a epidemiologia do microrganismo, e, são obtidos através da análise das seguintes regiões genômicas: *internal transcribed spacer* (ITS 1 e 2), citocromo B (CYB), superóxido dismutase (SOD) e o gene que codifica a enzima diidropteroato sintetase (DHPS). A concordância dos genótipos pode revelar que um *P. jirovecii* isolado de indivíduos distintos, trata-se geneticamente do mesmo microrganismo (61). A utilização de um método de sequenciamento multilocus (MLST) permite a genotipagem molecular do *P. jirovecii* em mais de um locus e é considerado muito útil para a investigação epidemiológica do fungo. Este método fornece alto poder discriminatório, para as investigações dos casos agrupados de PCP (65).

As mutações mais comuns no gene DHPS ocorrem no códon 55 (treonina/alanina) e no códon 57 (prolina/serina), sendo que a presença dessas mutações pode ser a causa da resistência a fármaco (4). Os genótipos DHPS foram classificados como: Tipo selvagem: nenhuma mutação observada; DHPS mutante códon 55: mutação única na posição 165 (Thr55Ala); DHPS mutante códon 57: mutação única na posição 171 (Pro57Ser); DHPS mutante códon 55-57: mutação dupla na posição (165 + 171) demonstrada na tabela 2 (5).

A frequência de genótipos de *P. jirovecii* observados em estudo do DHPS: diidropteroato sintetase estão na Tabela 2.

Tabela 2 Genótipos do DHPS utilizados na epidemiologia molecular do *Pneumocystis jirovecii*.

| Lócus | Identidade de nucleotídeo (códon) | Genótipo | Frequência dos genótipos nº (%) |
|-------|--|---------------|---------------------------------|
| DHPS | 165(55) A (Thr)/171(57) C (Pro) | 1 | 13 (82) |
| | 165(55) G (Ala)/171(57) C (Pro) | 2 | 1 (6) |
| | 165(55) A (Thr)/171(57) T (Ser) | 3 | 1 (6) |
| | 165(55) A/G (Thr/Ala) 171(57) C/T (Pro) | Misto (1 e 4) | 1 (6) |

DHPS: diidropteroato sintetase.

Adaptado de Monroy-Vaca EX. et al, 2014.

As mutações DHPS e DHFR foram documentadas como o mecanismo pelo qual a sulfa sofre resistência. A maior parte dos estudos mostrou associação entre o uso crônico de fármacos administrados como profilaxia e a presença de mutações DHPS, sugerindo que a pressão de seleção de medicamentos é o mecanismo pelo qual ocorre um aumento de DHPS mutantes em *P. jirovecii* (56, 57).

Hauser et al. pesquisou as mutações do gene da DHPS em 394 pacientes de 3 cidades europeias e encontraram uma prevalência de 20%. Segundo os autores, a ausência de medidas para prevenir a disseminação do *Pneumocystis jirovecii* assim como uma profilaxia subótima estariam associadas com o aumento na prevalência das cepas mutantes (66).

A PCP em pacientes transplantados renais sem uso de profilaxia, ocorreu em 0,6 a 14% dos pacientes com uma taxa de mortalidade de até 49%, demonstrando que a PCP continua a ser um problema e requer medidas de prevenção e profilaxia (67). Da mesma forma, o acompanhamento contínuo da evolução das cepas mutantes de *P. jirovecii* em populações suscetíveis é importante, uma vez que pode ajudar a esclarecer os mecanismos envolvidos na resistência ao fármaco sulfa e as implicações clínicas (57).

As mutações no gene DHPS do *P. jirovecii* relacionadas com a resistência ao SMX-TMP estão aumentando, sendo detectadas em 76% de espécimes de pacientes expostos à profilaxia com sulfá em comparação com 23% dos espécimes de pacientes não expostos. Entretanto, o papel da resistência associada com as mutações do gene DHPS no resultado do tratamento da PCP continua controverso (37).

Provavelmente hospitais e clínicas ambulatoriais serão relevantes para a seleção de *Pneumocystis* mutantes, uma vez que os pacientes tratados cronicamente com SMX podem acumular genótipos mutantes e ser um reservatório para a transmissão de cepas de *P. Jirovecii* resistentes (56).

Deste modo, é importante acompanhar e conhecer a prevalência de cepas mutantes de *P. Jirovecii* nas diferentes instituições de saúde que tratam pacientes em risco para ou que apresentem o diagnóstico de PCP.

3. JUSTIFICATIVA

A PCP ocorre com frequência em pacientes com imunossupressão, principalmente em indivíduos com SIDA. Por outro lado, as mutações do DHPS causam preocupação uma vez que podem estar associadas com a diminuição da eficácia das sulfamidas, a principal ferramenta terapêutica disponível para tratar a pneumonia por *P. jirovecii*. Em estudo prévio publicado em 2006 (6), que avaliou a prevalência de mutações do gene DHPS em pacientes com SIDA e PCP atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, nenhum caso da mutação foi identificado.

As evidências na literatura demonstram que é importante a monitorização e a detecção de cepas mutantes do *P. jirovecii*. Do mesmo modo é necessário identificar o cenário clínico no qual as mutações ocorrem uma vez que estas informações podem ser úteis para programar políticas de controle de infecção, assim como servir de marco inicial para futuras avaliações sobre o impacto destas políticas no cuidado dos pacientes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Pesquisar a presença da mutação no gene da enzima Diidropteroato sintetase do *P. jirovecii* em amostras de lavado bronco alveolar (LBA) de pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida que apresentaram pneumonia por este fungo, entre janeiro de 2016 e dezembro de 2017, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

4.2. Objetivos secundários

- 1) Estudar se a presença de mutações da região genômicas da enzima diidropteroato sintetase do *P. jirovecii* tem relação com profilaxia prévia com SMT-TMT.
- 2) Estudar se a presença de mutações da região genômicas da enzima diidropteroato sintetase do *P. jirovecii* tem relação com o curso clínico da PCP e com a mortalidade em pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida e pneumonia por *P. jirovecii*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Gill MJ, Read R. *Pneumocystis carinii*: A review of an important opportunistic pathogen in AIDS. **Can J Infect Dis.** **1991**; 2(1): 12–18.
- 2- Salzer HJF, Schäfer G, Hoenigl M, Günther G, Hoffmann C, et al. Clinical, Diagnostic, and Treatment Disparities between HIV-Infected and Non-HIV-Infected Immunocompromised Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. **Respiration** **2018**; 10: 1-14.
- 3- De Armas Rodriguez Y, Wissmann G, Müller AL, Pederiva MA, Brum MC, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in developing countries. **Parasite** **2011**; 18: 219-228.
- 4- Suárez I, Roderus L, Van Gumpel E, Jung N, Lehmann C, et al. Low prevalence of DHFR and DHPS mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains obtained from a German cohort. **Infection** **2017**; 45(3): 341-347.
- 5- Montesinos I, Delforge ML, Ajjaham F, Brancart F, Hites M, et al. Evaluation of a new commercial real-time PCR assay for diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and identification of dihydropteroate synthase (DHPS) mutations. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** **2017**; 87: 32-36.
- 6- Wissmann G, Alvarez-Martinez M, Meshnick S, Dihel ARS, Prolla JC. Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. **J Eukaryot Microbiol** **2006**; 53(4): 305–307.
- 7- Chagas C 1909. Nova tripanozomíaze humana. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **1911**; 1: 159-181.
- 8- Carini A. Formas de eschizogonia do Trypanosoma lewisi. **Bulletin de l'Institut Pasteur** **1910**; tIX:973-978.
- 9- 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.
- 10- Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrero V, Respaldiza-Salas N, et al. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. **Protist** **2002**; 153: 303–310.
- 11- Wissmann G, Morilla R, Friaiza V, Calderón E, Varela JM. El ser humano como reservóio de Pneumocystis. **Enferm Infec Microbiol Clin** **2010**; 28: 38-43.
- 12- Thomas CF, Limper AH. Pneumocystis Pneumonia. **N Engl J Med** **2004**; 350: 2487-2498.
- 13- Vanêk J, Jírovec O, Lukes J. Interstitial plasmacell pneumonia in infants. **Ann Pediatr** **1953**; 180: 1–21.
- 14- Mills J. *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* infections in patients with AIDS. **Rev Infect Dis** **1986**; 8: 1001–1011.
- 15- Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, et al. Current epidemiology of Pneumocystis pneumonia. **Emerg Infect Dis** **2004**; 10: 1713-1720.

- 16-Takeuchi T, Tatsuki Y, Nogami Y, Ishiguro N, Tanaka 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.
- 17-Tasaka S, Tokuda H. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. **J. Infect. Chemother** 2012; 18: 793–806.
- 18-Bienvenu AL, Traore K, Plekhanova I, Bouchrik M, Bossard C, Picot S. Pneumocystis pneumonia suspected cases in 604 non-HIV and HIV patients. **Int. J. Infect. Dis.** 2016; 46: 11–17.
- 19-Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. **J. Fungi** 2017; v. 3, 57: 1-29.
- 20-Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, et al. Association With The LIFE Program. The burden of serious human fungal infections in Brazil. **Mycoses** 2016; 59: 145–150.
- 21-Limper AH, Adenis A, Le T, Harrison TS. Fungal infections in HIV/AIDS. **Lancet Infect. Dis.** 2017; 17(11): 334-343.
- 22-Krajicek BJ, Thomas CF, Limper AH. Pneumocystis Pneumonia: Current Concepts in Pathogenesis, Diagnosis, and Treatment. **Clin. Chest Med.** 2009; 30: 265–278.
- 23-Cooley L, Dendle C, Wolf J, Teh BW, Chen SC. et al. Consensus guidelines for diagnosis, prophylaxis and management of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological and solid malignancies, 2014. **Intern. Med. J.** 2014; 44: 1350–1363.
- 24-Kovacs JA, Hiemenz JW, Macher AM, Stover D, Murray HW, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. **Ann Intern Med** 1984; v. 100, n. 5: 663-671.
- 25-Yale SH, Limper AH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. **Mayo Clin Proc** 1996; 71(1): 5-13.
- 26-Mansharamani NG, Garland R, Delaney D, Koziel H. Management and outcome patterns for adult *Pneumocystis carinii* pneumonia, 1985 to 1995: comparison of HIV-associated cases to other immunocompromised states. **Chest** 2000; 118: 704-11.
- 27-Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. **Clin Infect Dis** 2002; 34: 1098-107.
- 28-Ward MM, Donald F. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with connective tissue diseases: the role of hospital experience in diagnosis and mortality. **Arthritis Rheum** 1999; 42(4): 780-9.
- 29-Kales CP, Murren JR, Torres RA, Crocco JA. Early predictors of in-hospital mortality for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. **Arch Intern Med** 1987; 147: 1413-7.
- 30-Stansell JD, Osmond DH, Charlebois E, LaVange L, Wallace JM, et al. Predictors of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. **Am J Respir Crit Care Med** 1997; 155(1): 60-6.

- 31-Miller RF, Huang L, Walzer PD. *Pneumocystis* pneumonia associated with human immunodeficiency virus. **Clin Chest Med** 2013; 34: 229-241.
- 32-Zaman MK, White DA. Serum lactate dehydrogenase levels and *Pneumocystis carinii* pneumonia. Diagnostic and prognostic significance. **Am Rev Respir Dis** 1988; Apr. 137(4): 796-800.
- 33-Sax PE, Komarow L, Finkelman MA, Grant PM, Andersen J, et al. Blood (1->3)-beta-D-glucan as a diagnostic test for HIV-related *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. **Clin Infect Dis** 2011; 53:197-202.
- 34-De Lorenzo LJ, Huang CT, Maguire GP, Stone DJ. Roentgenographic patterns of *Pneumocystis carinii* pneumonia in 104 patients with AIDS. **Chest** 1987; 91: 323-327.
- 35-Huang L, Cattamanchi A, Davis JL, Boon SD, Kovacs J, et al. HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia. **Proc Am Thorac Soc** 2011; 8: 294-300.
- 36-Catherinot E, Lanternier F, Bougnoux ME, Lecuit M, Couderc LJ, Lortholary O. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. **Infect Dis Clin N Am** 2010; 24(1): 107–138.
- 37-Huang YS, Yang JJ, Lee NY, Chen GJ, ko WC, et al. Treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: a review. **Expert Review Of Anti-infective Therapy** 2017; 15(9): 873-892.
- 38-De Vos FY, Gijtenbeek JM, Bleeker-Rover CP, Van Herpen CM. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia prophylaxis during temozolomide treatment for high-grade gliomas. **Critical Reviews In Oncology/hematology** 2013; 85: 373-382.
- 39-Wharton JM, Coleman DL, Wofsy CB, Luce JM, Blumenfeld W, et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole or pentamidine for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A prospective randomized trial. **Ann Intern Med** 1986; 105(1): 37-44.
- 40-Sattler FR, Cowan R, Nielsen DM, Ruskin J. Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with pentamidine for treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A prospective, noncrossover study. **Ann Intern Med** 1988; 109(4): 280-7.
- 41-Klein NC, Duncanson FP, Lenox TH, Forszpaniak C, Sherer CB, et al. Trimethoprim-sulfamethoxazole versus pentamidine for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients: results of a large prospective randomized treatment trial. **AIDS** 1992; 6(3): 301-5.
- 42-Noskin GA, Murphy RL, Black JR, Phair JP. Salvage therapy with clindamycin/primaquine for *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Clin Infect Dis** 1992; 14(1): 183-8.
- 43-Smego RA Jr, Nagar S, Maloba B, Popara M. A meta-analysis of salvage therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Arch Intern Med** 2001; 161(12): 1529-33.
- 44-Mahindra AK, Grossman SA. Pneumonia por *Pneumocystis carinii* em pacientes HIV negativos com tumores cerebrais primários. **J Neurooncol** 2003; 63 (3): 263-70.
- 45-Panel on Opportunistic Infections in HIV-Infected Adults and Adolescents. Guidelines for the prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: Recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association of the

- Infectious Diseases Society of America. http://aidsinfo.nih.gov/contentfiles/lvguidelines/adult_oi.pdf (Accessed on May 10, 2018).
- 46-Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, et al. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. **J. Infect. Dis.** **2000**; 182: 551–557.
 - 47-Navin TR, Beard CB, Huang L, del Río C, Lee S, et al. Effect of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P. carinii* pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study. **Lancet** **2001**; 358: 545–549.
 - 48-Medina I, Mills J, Leoung G, Hopewell PC, Lee B, et al. Oral therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A controlled trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus trimethoprim-dapsone. **N Engl J Med** **1990**; 323(12): 776-82.
 - 49-Gordin FM, Simon GL, Wofsy CB, Mills J. Adverse reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. **Ann Intern Med** **1984**; 100(4): 495-9.
 - 50-Bayard PJ, Berger TG, Jacobson MA. Drug hypersensitivity reactions and human immunodeficiency virus disease. **J Acquir Immune Defic Syndr** **1992**; 5(12): 1237-57.
 - 51-National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Clinical Practice Guidelines in Oncology. Prevention and treatment of cancer-related infections. Version 2.2014. <http://www.nccn.org> (Accessed on May 10, 2018).
 - 52-Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. **Biol Blood Marrow Transplant** **2009**; 15(10): 1143-238.
 - 53-Huang L, Morris A, Limper AH, Beck JM. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP). **Proc Am Thorac Soc** **2006**; 3: 655-64.
 - 54-Stern A, Green H, Paul M, Vidal L, Leibovici L. Prophylaxis for Pneumocystis pneumonia (PCP) in non-HIV immunocompromised patients. **Cochrane Database Syst Rev** **2014**; 1(10): CD005590.
 - 55-Martin SI, Fishman JA, AST Infectious Diseases Community of Practice. Pneumocystis pneumonia in solid organ transplantation. **Am J Transplant** **2013**; 13 Suppl 4: 272-9.
 - 56-Ponce CA, Chabé M, George C, Cárdenas A, Durán L, et al. High Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* Dihydropteroate Synthase Gene Mutations in Patients with a First Episode of Pneumocystis Pneumonia in Santiago, Chile, and Clinical Response to Trimethoprim-Sulfamethoxazole Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** **2017**; 61(2): e01290-16.
 - 57-Monroy-Vaca EX, De Armas Y, Illnait-Zaragozí MT, Toraño G, Diaz R, et al. Prevalence and Genotype Distribution of *Pneumocystis jirovecii* in Cuban Infants and

- Toddlers with Whooping Cough. **Journal of Clinical Microbiology** 2014; 51(1): 45–51.
- 58- Calderón EJ, Gutierrez-Rivero S, Durand-Joly I, Del-Cas E. **Expert Rev Anti Infect Ther** 2010; 8: 683–701.
- 59- Meuwissen JH, Tauber I, Leeuwenberg AD, Beckers PJ, Sieben M. Parasitologic and serologic observation of infection with *Pneumocystis carinii* in humans. **J Infect Dis** 1977; 136: 43-49.
- 60- Nevez G, Totet A, Jounieaux V, Dei-Cas E, Raccurt C. *Pneumocystis jirovecii* 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.
- 61- Beard C, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. **Emerg Infect Dis** 2004; 10: 1729-1735.
- 62- De Armas Y, Friaiza V, Capó V, Durand-Joly I, Govín A, et al. Low genetic diversity of *Pneumocystis jirovecii* among Cuban population based on two-locus mitochondrial typing. **Med Mycol** 2012; 50(4): 417-20.
- 63- Schmoldt S, Schuhegger R, Wendler T, Huber I, Söllner H, et al. Molecular evidence of nosocomial *Pneumocystis jirovecii* transmission among 16 patients after kidney transplantation. **J Clin Microbiol** 2008; 46: 966–971.
- 64- Montes-Cano MA, De La Horra C, Dapena Fj, Mateos I, Friaiza V, et al. Dynamic colonization by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. **Clin Microbiol Infect** 2007; 13: 1008-1011.
- 65- Maitte C, Leterrier M, Le pape P, Miegerville M, Morio F. Multilocus sequence typing of *Pneumocystis jirovecii* from clinical samples: how many and which loci should be used? **J Clin Microbiol.** 2013; Sep 51 (9): 2843-9.
- 66- Hauser PM, Nahimana A, Taffe P, Weber R, Francioli P, et al. Interhuman transmission as a potential key parameter for geographical variation in the prevalence of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutations. **Clin Infect Dis.** 2010; Aug 51 (4): 28-33.
- 67- Nevez G, Le Gal S, Noel N, Wynckel A, Huguenin, et al. Investigation of nosocomial pneumocystis infections: usefulness of longitudinal screening of epidemic and post-epidemic pneumocystis genotypes. **Journal Of Hospital Infection** 2017; doi: 10.1016/j.jhin.2017.09.015. 1-14.

6. ARTIGO CIENTÍFICO

Presença de mutação no gene da diidropteroato sintase do *Pneumocystis jirovecii* em pacientes brasileiros com síndrome de imunodeficiência adquirida.

Müller AL^{1,2}, Wissmann G^{1,2}, Knorst MM¹.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Pneumológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

² Grupo de Estudos do *Pneumocystis*, Doenças Infecciosas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

Endereço para correspondência:

André L. A. Müller, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903, Porto Alegre, Brasil.

Resumo

Introdução: O *Pneumocystis jirovecii* pode causar uma pneumonia grave (PCP) em pacientes com síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA). A principal opção para tratamento da PCP e para sua profilaxia é a sulfa. A presença de uma mutação no gene da diidropteroato sintase (DHPS) do *P. jirovecii* pode gerar uma resistência ao fármaco. **Objetivo:** O objetivo do estudo foi avaliar a presença da mutação DHPS do *Pneumocystis* e a mortalidade em pacientes com PCP e SIDA. **Métodos:** Foram estudadas 18 amostras de lavado bronco alveolar de pacientes adultos (idade ≥ 18 anos) com PCP e SIDA no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brazil), coletadas prospectivamente entre janeiro de 2016 e dezembro de 2017. A extração do DNA do fungo foi realizada com o *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit*. Após foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR) com os *Primers* do gene DHPS do *P. jirovecii*. A purificação do produto de PCR foi realizada pelo método enzimático (EXOSAP) e o sequenciamento utilizando o equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). **Resultados:** Dez pacientes tinham diagnóstico prévio de SIDA, 5 estavam recebendo terapia antirretroviral e um realizava quimioprofilaxia para PCP. A amplificação do DNA foi positiva para o DHPS em 16 das 18 amostras. Em 15 amostras a PCR apresentou o chamado “padrão selvagem” na tipagem molecular do *P. jirovecii* no *locus* da DHPS, ou seja, ausência de mutação. Padrão duplo mutante, isto é, mutação nos códons 55 e 57 foi detectado em um paciente (6,25%), que não havia recebido profilaxia para PCP. Dois pacientes morreram na internação, um destes tinha a mutação. **Conclusões:** Os resultados sugerem que as mutações DHPS ainda são raras no Brasil; entretanto, as mesmas precisam ser continuamente monitoradas, uma vez a mutação pode estar associada à resistência ao TMT-SMT. A mortalidade por PCP foi significativa.

Palavras-chaves: *Pneumocystis jirovecii*, SIDA, mutação DHPS.

Abstract

Background: Pneumocystosis is an opportunistic infection caused by the single-cell fungus *Pneumocystis jirovecii*, which mainly affects patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), causing severe pneumonia (PCP). The combination of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) is the main option for the treatment and prophylaxis of PCP. The presence of a mutation in the dihydropteroate synthase (DHPS) gene of *P. jirovecii* can lead to drug resistance. **Aim:** The objective of this study was to evaluate the presence of the DHPS mutation and mortality in patients diagnosed with PCP and AIDS. **Methods:** Eighteen samples of bronchoalveolar lavage were collected from adult patients (age ≥ 18 years) from the *Hospital de Clínicas de Porto Alegre* (Rio Grande do Sul, Brazil) between January 2016 and December 2017. Clinical data were collected from the electronic medical records. In order to evaluate the mutation, after performing the polymerase chain reaction (PCR) with DHPS gene primers of *P. jirovecii*, the DNA of the fungus was extracted using the PureLink™ Genomic DNA Kit. The PCR product was purified using the enzymatic method (EXOSAP) prior to sequencing using the ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). **Results:** Ten patients had been previously diagnosed with AIDS, five were receiving antiretroviral therapy and one had undergone chemoprophylaxis for PCP. DNA amplification was positive for DHPS in 16 of the 18 samples. In 15 samples the PCR showed the so-called "wild pattern" in the molecular typing of *P. jirovecii* at the DHPS locus, that is, absence of mutation. Double mutation at codons 55 and 57 was detected in one patient (6.25%), who had not received prophylaxis for PCP. Two patients died in hospital, one of them had the DHPS double mutation. **Conclusions:** The results suggest that DHPS mutations are still rare in Brazil; however, continuous monitoring is necessary since they may be associated with increased resistance of *P. jirovecii* to SMT - TMT. PCP mortality was significant.

Key-words: *Pneumocystis jirovecii*, AIDS, DHPS mutation.

Introdução

O *Pneumocystis jirovecii* (*P. jirovecii*) é um fungo atípico¹ e oportunista², que exibe tropismo pulmonar e causa uma pneumonia grave em pacientes com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA)³. SIDA é um importante problema de saúde pública no Brasil. Num estudo com 35 pacientes soro positivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) com sintomas respiratórios, a PCP foi a doença mais frequentemente identificada (55%)⁴. Outro estudo detectou pneumocistose em 27% de 250 pacientes com SIDA, os quais morreram de insuficiência respiratória aguda no sudeste do Brasil⁵. O diagnóstico de pneumonia por *P. jirovecii* (PCP) baseia-se em manifestações clínicas e radiológicas em combinação com evidências microbiológica⁶.

Um aumento significativo nas taxas de PCP foi descrito em pacientes infectados pelo HIV mundialmente, principalmente nos casos que não receberam profilaxia para a doença^{7,8}. A incidência global de PCP estimada no contexto do Programa LIFE foi de $5,79 \pm 10,96$ casos por 100.000. A maioria dos casos (102.955, 77%) foram relatados na África, seguidos pela América (10%), Europa (7%) e Ásia (6%)⁹. No Brasil, estima-se que a PCP ocorra em 4,7% dos pacientes com SIDA e linfócitos T CD4 < 350 células/mm³¹⁰.

A terapia medicamentosa utilizada tanto para profilaxia como para o tratamento da PCP é a combinação dos medicamentos sulfametoxazol-trimetoprima (SMT-TMT)¹¹. As sulfonamidas inibem a DHPS, uma das enzimas essenciais na via de síntese de folato¹². Ainda é motivo de discussão se polimorfismos na região alvo de atuação do SMT-TMT, isto é, mutações na codificação do gene da DHPS e da dihidrofolato redutase (DHFR) do *P. jirovecii* causam resistência à sulfa e podem resultar em falha no tratamento¹³. Adicionalmente, há controvérsias se a presença

da mutação no gene DHPS do *Pneumocystis* está associada com má evolução clínica e aumento de mortalidade. Um estudo demonstrou um risco três vezes mais elevado de morte por pneumonia nos portadores de mutação no gene DHPS do *P. jirovecii*¹⁴, enquanto que outros estudos não corroboraram estes achados^{15,16}.

O objetivo deste estudo foi pesquisar a presença de mutação no gene da enzima DHPS do *P. jirovecii*, e a evolução clínica em pacientes com SIDA que apresentaram pneumonia por este fungo no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Material e métodos

Amostras e dados clínicos

De um total de 21 espécimes de lavado broncoalveolar (LBA) de pacientes adultos (idade ≥ 18 anos) imunossuprimidos com PCP coletados sequencialmente, no período de janeiro de 2016 a dezembro de 2017, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Rio Grande do Sul, Brasil), 18 eram de pacientes com SIDA. Somente pacientes com SIDA foram incluídos neste estudo. As amostras de LBA foram coletadas no primeiro dia de internação e processadas conforme rotina e técnica descritas previamente¹⁷. Todas as amostras foram positivas para a presença de *P. jirovecii* em exame citológico com coloração de Giemsa, confirmada pelo método de coloração de prata Grocott.

Os dados clínicos e demográficos foram obtidos por meio de revisão dos prontuários. Os seguintes dados foram coletados: idade, gênero, presença de tabagismo ativo, diagnóstico prévio de SIDA, diagnóstico prévio de PCP, realização de quimioprofilaxia para PCP nos últimos 3 meses, uso de terapia antirretroviral, tratamento para PCP, uso de corticosteroide na internação atual, presença de outras

comorbidades, contagem absoluta de células CD4 (células por microlitro); níveis de desidrogenase láctica (DHL), oxigenação, evolução hospitalar (alta hospitalar ou óbito).

Pesquisa da mutação do gene DHPS do *P. jirovecii*

Todos os testes de biologia molecular foram realizados no Laboratório Especial de Doenças Infecciosas, localizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Extração de DNA

A extração do DNA do *P. jirovecii* foi realizada utilizando o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, conforme o seu protocolo, apenas sendo adaptada a temperatura a 55°C e o tempo da proteinase K, a fim de aumentar a eficiência da extração.

PCR

A detecção do *P. jirovecii* foi realizada através da amplificação do gene DHPS, utilizando os *primers* DHPS3 (5' GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AATC 3') e DHPS4 (5' GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC 3') (25). A PCR foi realizada com 5,0 µL de tampão (10x), 2,0 µL de MgCl₂ (50mM), 1,0 µL de solução dNTPs (ATP, TTP, CTP e GTP; 10mM), 1,0 µL dos *primers* DHPS3 e DHPS4 (10pmol/µl), 34,9 µL de H₂O, 0,1 µL de Platinum Taq DNA Polymease. Foi adicionado 5µL de DNA ao volume final de 50 µL da reação de PCR. Para amplificação foi utilizado o *Applied Biosystems Veriti* (Thermal Cycler | Thermo Fisher Scientific) com o seguinte programa: desnaturação inicial de 4 minutos a

95°C, com cinco ciclos de desnaturação de 30 segundos a 95°C, anelamento de 30 segundos a 72°C, com decréscimo de – 1°C por ciclo, e de extensão de 20 segundos a 72°C. Após 35 ciclos de desnaturação de 30 segundos a 95°C, anelamento de 30 segundos a 62°C, e extensão de 20 segundos a 72°C e extensão final de 4 minutos a 72°C. O produto da reação foi verificado a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose na concentração de 2% e, conforme esperado, foi revelado o fragmento de tamanho de 370 pb na presença do transluminador com luz ultravioleta. Foram utilizados controles positivos e negativos em todas as reações de PCR, para reduzir a chance de resultados falsos.

Análise da mutação do gene da DHPS

A análise de mutações no gene da DHPS (códon 55/57) foi realizada usando enzimas de restrição. Os produtos da reação da PCR foram divididos em três alíquotas, sendo a primeira usada para identificar a presença de genótipos sem a mutação no códon 55, através da digestão por 2 horas a 37 °C, utilizando a enzima *Accl* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). A segunda alíquota foi usada para identificar a presença de mutações no códon 57, utilizando a enzima *HaeIII* (Roche Diagnostics, Alemanha). A última alíquota, que apresentava uma banda de 370 pb, a qual não é cortada pelo uso de enzimas, foi utilizada como prova da amplificação do gene da DHPS¹². A amostra do tipo selvagem, que não contém a mutação no códon 55, é digerida com *Accl*, sendo que duas bandas de DNA aparecem com o tamanho de fragmento em 229 e 141 pb. Já quando a mutação está presente, apenas uma banda aparece com fragmento de 370 pb. Da mesma forma, com *HaeIII*, aparecem duas bandas em 221 e 149 pb em amostras do tipo selvagem, sem mutação no códon 57, e apenas uma banda de 370 pb aparece, se a mutação está presente⁷.

Purificação

A purificação do produto de PCR foi realizada pelo método enzimático, utilizando 0,5 µL Exonuclease I (*Exo I*) e 0,5 µL Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP), para digerir o excesso de *primers* e nucleotídeos provenientes da PCR.

Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado utilizando o equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Os produtos de PCR foram marcados utilizando-se 5,0 pmol do *primer* DHPS3 5' GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AATC -3' e 1 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 min seguida de 35 ciclos de 96°C por 15 seg, 50°C por 15 seg e 60°C por 4 min. Após marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com *BigDye XTerminator Purification Kit* (Applied Biosystems) e eletroinjetadas no analisador genético. A análise dos dados gerados pela plataforma de sequenciamento foi realizada com o software FinchTV 1.4.0.

Análise estatística

Para análise estatística dos dados foi utilizado o software *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 18.0. Os dados são apresentados como número e percentagem ou média e desvio-padrão. O teste t de Student para amostras independentes e o teste de probabilidade exato de Fisher foram utilizados para

comparar variáveis de indivíduos com amplificação do DNA e sequenciamento positivo para o gene DHPS do *P. jirovecii* com as variáveis de indivíduos cuja PCR/DHPS foi negativa. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

Dezoito pacientes com HIV e PCP foram estudados. Os dados clínicos e laboratoriais dos 18 pacientes são mostrados na Tabela 1. Os dados individuais dos 18 casos são apresentados nas Tabelas 1 e 2 do anexo 1. Em oito casos (44,4%) o diagnóstico de SIDA foi feito concomitantemente ao diagnóstico da PCP. Dos 10 pacientes com diagnóstico prévio de SIDA, apenas 5 estavam recebendo terapia antirretroviral (mediana da contagem de células T CD4⁺ foi < 33 células/ μ l) e apenas um estava recebendo profilaxia para PCP. Nenhum dos pacientes havia tido PCP previamente. A carga viral variou de 49 a 7.880.138 cópias/mL e a contagem de células T CD4⁺ de 3 a 113 células/ μ l. Em todos os pacientes a PCP foi tratada com SMT+TMT, sendo que em um paciente a terapia foi trocada para primaquina e clindamicina por efeitos adversos. A maioria dos pacientes recebeu tratamento adjuvante com corticosteroide para a PCP.

Em 16 das 18 amostras (88,9%) de DNA de pacientes com PCP e SIDA foi possível amplificar e sequenciar o *locus* da DHPS. Os dois casos nos quais a amplificação no *locus* da DHPS não foi obtida tinham diagnóstico de SIDA e não estavam realizando quimioprofilaxia com SMT-TMT para PCP. Não houve diferença entre as características clínicas dos pacientes nos quais foi amplificado o gene DHPS e os dois casos em que esta amplificação não foi possível ($p > 0,05$). Uma mutação dupla no locus DHPS, isto é, substituição da treonina pela alanina na

posição 55 e da prolina pela serina na posição 57 foi identificada em uma das amostras. O restante dos casos apresentou o chamado “padrão selvagem” na genotipagem do *P. jirovecii* no *locus* da DHPS, ou seja, o padrão de aminoácidos treonina na posição 55 e prolina na posição 57 da enzima. Este padrão representa ausência de mutação.

Dois dos 18 pacientes morreram durante a internação hospitalar. Em ambos os pacientes os diagnósticos de PCP e SIDA foram realizados durante a internação hospitalar e nenhum dos pacientes havia feito profilaxia com SMT-TMT. Um dos pacientes que morreu em decorrência da PCP apresentava a dupla mutação DHPS, foi tratado inicialmente com SMT-TMT, sendo esta combinação substituída por primaquina e clindamicina devido à efeitos adversos.

Discussão

No presente estudo, analisamos 18 amostras de lavado bronco alveolar de pacientes com PCP e SIDA atendidos sequencialmente no Hospital de Clínicas de Porto Alegre de janeiro de 2016 a dezembro de 2017. A amplificação do gene DHPS a partir da extração do DNA do *P. jirovecii* foi realizada em 16 das 18 amostras estudados (89%). A presença de dupla mutação no gene DHPS foi observada em um dos 16 casos em que a amplificação do DNA foi possível (6,3%) e dois pacientes (11,1%) morreram. A prevalência de mutações no gene DHPS havia sido estudada previamente na nossa instituição. Em 70 espécimes de lavado bronco alveolar de pacientes portadores de PCP e SIDA, coletados entre 1997 e 2004, nenhuma mutação havia sido identificada¹⁸. No nosso conhecimento o presente estudo é o primeiro relatando mutação no gene DHPS no Brasil e nosso resultado mostra que

houve um aumento na prevalência da mutação no nosso meio nas últimas duas décadas.

A prevalência de mutação observada em nosso estudo de 6,3% foi superior à reportada na Itália (0%)¹⁹, na Suécia (0%)²⁰, na Alemanha (1,4%)¹⁶ e na Espanha (3,7%)⁵, semelhante à relatada em Portugal (7%)²¹ e inferior à relatada recentemente na China (12%)²², Chile (48%)²³ e África do Sul (56%)²⁴. Alta prevalência de mutação DHPS já havia sido observada há mais de duas décadas em alguns países como a França (36%)²⁵, USA (68 e 69%)^{26,27}, UK (36%)²⁸ e Japão²⁹.

O aumento na prevalência das mutações DHPS parece estar associado com a pressão seletiva que a sulfa exerce sobre o *Pneumocystis*³⁰, uma vez que o gene DHPS geralmente apresenta mutações em regiões altamente preservadas em pacientes com PCP previamente expostos à sulfa^{27,31}. A exposição de pacientes com SIDA ou portadores de outras imunossupressões à sulfa tem aumentado nos últimos anos, uma vez que a combinação medicamentosa SMT-TMT é a primeira opção tanto para a profilaxia quanto para o tratamento da PCP. A sulfa age interferindo na síntese do folato¹⁵. A baixa prevalência da mutação DHPS observada em nosso estudo parece indicar que, em nosso país, houve uma menor pressão seletiva da sulfa sobre o *P. jirovecii*, em comparação com os países desenvolvidos, onde a prevalência de mutações é mais alta. Por outro lado, o aumento da prevalência de mutações no gene DHPS tem gerado um questionamento sobre um aumento de resistência à sulfa^{15, 32}. Um aumento de reações adversas à sulfa foi observado em pacientes com a mutação DHPS²³, e este foi o motivo de mudança de tratamento para PCP no paciente com a mutação no nosso estudo.

O paciente com mutação DHPS no nosso estudo não tinha diagnóstico prévio de SIDA, não havia recebido profilaxia com SMT-TMT e provavelmente adquiriu o *Pneumocystis* por via inalatória, após contato com um indivíduo colonizado ou portador de PCP. Tanto estudos realizados com animais como em humanos favorecem um modelo de transmissão inalatória do *P. jirovecii*. A exposição de animais “de teste” a animais colonizados por *Pneumocystis* causa colonização nos animais saudáveis ou doença nos animais imunossuprimidos^{33,34}. Em outro estudo, que avaliou a diversidade genética do *P. jirovecii* em 12 centros na Europa, foi observado que em centros que utilizaram máscara facial nos casos diagnosticados com PCP a percentagem de diferentes cepas de *Pneumocystis* caiu de 70% para 36 a 42% após a intervenção, reforçando o modelo de transmissão inalatória do fungo³⁵. Considerando as altas taxas de mutação DHPS em alguns países e a via de transmissão inalatória, estudos avaliando o impacto de medidas que visem reduzir a disseminação do *Pneumocystis* podem ser de grande utilidade para reduzir a transmissão da doença.

A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* ainda é uma causa importante de morbidade e mortalidade entre pacientes com SIDA. A PCP foi a segunda infecção mais frequente identificada em necropsias de pacientes com HIV no Brasil (27%) só sendo superada pela pneumonia bacteriana⁵. Dois pacientes com PCP e HIV na nossa série de 18 casos morreram (11,1%), mortalidade comparável à de 15% descrita por Alvarez-Martinez *et al.* [2008]¹⁵ (15%) e de 13,5% relatada por Walzer *et al.* [2008]³⁶. A mortalidade por PCP em pacientes com HIV varia de 10 a 30% e pode ser maior se o diagnóstico é retardado e em pacientes sem terapia antirretroviral ou que suspenderam a mesma³⁷. Nos pacientes imunossuprimidos não infectados pelo HIV a mortalidade por PCP é ainda maior, atingindo até 50%²³. Dos dezoito

pacientes da nossa série apenas um estava recebendo profilaxia para PCP. Nenhum dos dois pacientes que evoluíram a óbito estava recebendo terapia antirretroviral ou profilaxia para PCP e um deles apresentava dupla mutação DHPS.

Dados sobre a relação entre a presença da mutação no gene DHPS e a mortalidade associada à PCP ainda são escassos. Alguns estudos demonstraram não haver relação entre a presença da mutação e mortalidade^{15,16,23}. Um estudo que avaliou fatores prognósticos relacionados com a mortalidade em 207 pacientes com HIV e PCP observou uma mortalidade geral de 15% e de 80% em pacientes que necessitaram de internação na unidade de terapia intensiva e uso de ventilação mecânica. Nenhum dos pacientes que morreram tinham a mutação DHPS e o principal fator relacionado com a mortalidade foi a presença de insuficiência respiratória na admissão hospitalar¹⁵.

O nosso estudo tem limitações relacionadas com o tamanho amostral reduzido. Por outro lado, ele tem um aspecto positivo por demonstrar pela primeira vez a presença de mutação DHPS no Brasil num paciente sem exposição prévia à sulfa.

Em conclusão, os resultados de nosso estudo sugerem que as mutações DHPS aumentaram no nosso meio, mas ainda permanecem baixa; entretanto, as mesmas precisam ser continuamente monitoradas, uma vez a mutação pode estar associada à resistência ao TMT-SMT. A mortalidade por PCP em pacientes com SIDA foi significativa.

Referências

1. Calderón EJ, Gutiérrez-Rivero S, Durand-Joly I, Dei-Cas E. Pneumocystis infection in humans: Diagnosis and treatment. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2010;8:683–701.
2. Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs J a, Unnasch TR, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1729–35.
3. Thomas Jr CF, Limper AH. *Pneumocystis pneumonia*. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:2487.
4. Weinberg A, Duarte MI. Respiratory complications in Brazilian patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med Trop* 1993;35(2):129-39.
5. Soeiro M, Hovnanian AL, Parra ER, Canzian M, Capelozzi VL. Post-mortem histological pulmonary analysis in patients with HIV/AIDS. *Clinics.* 2008;63:497–502.
6. de Armas Y, Wissmann G, Muller AL, Brum MC, Brackmann RL, Neumocystis Countries JPID. *Pneumocystis jirovecii Pneumonia in Developing Countries. Parasite.* 2011;18:219–28.
7. Mane A, Gujar P, Chandra J, Lokhande R, Dhamgaye T, Ghorpade S, et al. *Pneumocystis jirovecii Infection and the Associated Dihydropteroate Synthase (DHPS) and Dihydrofolate Reductase (DHFR) Mutations in HIV-Positive Individuals from Pune, India. Mycopathologia.* 2015;179:141–5.

8. Esteves F, Gaspar J, Marques T, Leite R, Antunes F, Mansinho K, Matos O. Identification of relevant single-nucleotide polymorphisms in *Pneumocystis jirovecii*: relationship with clinical data. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16(7):878-84.
9. Bongomin F, Gago S, Oladete RO, Denning DW. Global and multi-National prevalence of fungal diseases - estimate precision. *J Fungi*. 2017; 3(4): 57.
10. Giacomazzi J, Baethgen L, Carneiro LC, Millington MA, Denning DW, Colombo AL, Pasqualotto AC. Association with the LIFE program. The burden of serious human fungal infections in Brazil. *Mycoses* 2016, 59:145–150.
11. Wissmann G, Morilla R, Friaza V, Calderón E, Varela JM. El ser humano como reservorio de *Pneumocystis*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin*. 2010;28:38–43.
12. Jarboui MA, Sellami A, Sellami H, Cheikhrouhou F, Makni F, Ayadi A. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains isolated from immunocompromised patients. *Pathol. Biol*. 2011;59:222–5.
13. Huang L, Crothers K, Atzori C, Benfield T, Miller R, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10:1721-8.
14. Helweg-Larsen J, Benfield TL, Eugen-Olsen J, Lundgren JD, Lundgren B. Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *Lancet*. 1999; 354:1347–51.
15. Alvarez-Martínez MJ, Moreno A, Miró JM, Valls ME, Rivas P V., de Lazzari E, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in Spanish HIV-infected patients in the combined antiretroviral therapy era: prevalence of dihydropteroate synthase

mutations and prognostic factors of mortality. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008;62:34–43.

16. Suárez I, Roderus L, van Gumpel E, Jung N, Lehmann C, Fätkenheuer G, et al. Low prevalence of DHFR and DHPS mutations in *Pneumocystis jirovecii* strains obtained from a German cohort. *Infection.* 2017;45:341–7.

17. Tregnago R, Xavier, RG, Pereira, RP, Prolla JC. The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by cytologic evaluation of Papanicolaou- and Leishman-stained bronchoalveolar specimens in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Cytopathology.* 1993; 4:77–84.

18. Wissmann G, Alvarez-Martinez M, Meshnick S, Dihel ARS, Prolla JC. Absence of dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients. *J Eukaryot Microbiol.* 2006;53(4): 305–7.

19. Dimonte S, Berrilli F, D'Orazi C, D'Alfonso R, Placco F, et al. Molecular analysis based on mtLSU-rRNA and DHPS sequences of *Pneumocystis jirovecii* from immunocompromised and immunocompetent patients in Italy. *Infection, Genetics and Evolution.* 14 (2013) 68–72.

20. Beser J, Dini L, Botero-Kleiven S, Krabbe M, Lindh J, Hagblom. Absence of dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from Swedish patients. *Medical Mycology.* 2012;50:320–3.

21. Esteves F, Montes-Cano MA, de la Horra C, Calderón EJ, Antunes F, Matos O. *Pneumocystis jirovecii* multilocus genotyping profiles in patients from Portugal and Spain. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14:356–362.

22. Deng X, Zhuo L, Lan Y, Dai Z, Chen WS, Cai W, *et al.* Mutational analysis of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase and dihydrofolate reductase genes in HIV-infected patients in China. *J Clin Microbiol.* 2014;52:4017–9.
23. Ponce C, Chabé M, George C, Cardenas A, Durán L, *et al.* High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* mutations in patients with a first episode of *Pneumocystis* Pneumonia in Trimethoprim-Sulfamethoxazole Therapy. 2017;61:1–10.
24. Dini L, du Plessis M, Frean J, Fernandez V. High Prevalence of Dihydropteroate Synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* isolated from patients with *Pneumocystis* Pneumonia in South Africa. *J Clin Microbiology.* 2010;48:2016-21.
25. Nahimana A, Rabodonirina M, Helweg-Larsen J, Meneau I, Francoli P, Bille J, Hauser PM. Sulfa resistance and dihydropteroate synthase mutants in recurrent *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9:864–7.
26. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, *et al.* Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from diferente geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis.* 2000; 6:265–277.
27. Huang L, Beard CB, Creasman J, Levy D, Duchin JS, Lee S, *et al.* Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis.* 2000; 182:1192–8.
28. Miller RF, Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE. Genotypes of *pneumocystis jiroveci* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47:3979–81.

29. Takahashi T, Hosoya N, Endo T, Nakamura T, Sakashita H, Kimura K, et al. Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulphonamide therapy. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:3161–4.
30. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis.* 1997; 175:482–5.
31. Kazanjian P, Armstrong W, Hossler PA, Burman W, Richardson J, Lee CH, et al. *Pneumocystis carinii* mutations are associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis.* 2000; 182:551–7.
32. Tyagi AK, Mirdha BR, Luthra K, Guleria R, Mohan A, Singh UB, et al. *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase (DHPS) genotypes in non-HIV-immunocompromised patients: A tertiary care reference health centre study. *Med Mycol.* 2011;49:167–71.
33. An CL, Gigliotti F, Harmsen AG. Exposure of immunocompetent adult mice to *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* by cohousing: growth of *P. carinii* f. sp. *Muris* and host immune response. *Infect Immun.* 2003;71(4):2065–70.
34. Gigliotti F, Harmsen AG, Wright TW. Characterization of transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *muris* through immunocompetent BALB/c mice. *Infect Immun.* 2003;71(7):3852–6.
35. Alanio A, Gits-Muselli M, Guigue N, Desnos-Ollivier M, Calderon EJ, et al. Diversity of *Pneumocystis jirovecii* across Europe: A multicentre observational study, *EBioMedicine* 22 (2017) 155–63.

36. Walzer PD, Evans HE, Copas AJ, Edwards SG, Grant AD, Miller RF. Early predictors of mortality from *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in HIV-infected patients: 1985–2006. *Clin Infect Dis* 2008; 46:625–33.
37. Limper AH, Adenis A, Le T, Harrison TS. Fungal infections in HIV/AIDS *Lancet Infect Dis*. 2017;17(11):e334-e43.

Tabela 1. Características dos 18 casos com SIDA e PCP

| Características | Média |
|---|-------------------------|
| Idade, anos, média ± DP (mínimo-máximo) | 41,3 ± 11,7 (20-71) |
| Sexo | |
| Feminino, n° (%) | 12 (66,7) |
| Masculino, n° (%) | 5 (33,3) |
| Tabagistas, n° (%) | 7 (38,9) |
| Cancer, n° (%) | 0 (0) |
| Toxoplasmose prévia, n° (%) | 0 (0) |
| Diagnóstico de HIV, n° (%) | |
| Prévio | 10 (56,6) |
| Concomitante à PCP | 8 (44,4%) |
| Carga viral, cópias/mL, mediana [IIQ25-75] | 332873 [37386 - 866921] |
| CD4, células/μL mediana [IIQ25-75] | 16 [5,5 - 57] |
| PaO ₂ , mmHg, média ± DP (mínimo-máximo) | 85,3 (34,6 - 150) |
| DHL, U/L, média ± DP (mínimo-máximo) | 453,4 (188 - 1140) |
| Terapia antiretroviral, n° (%) | 5 (27,8) |
| Profilaxia com SMT-TMT, n° (%) | 1 (5,6) |
| PCP prévia, n° (%) | 0 (0) |
| Tratamento da PCP com SMT-TMT, n° (%) | 18 (100) |
| Mudança do tratamento da PCP, n° (%) | 1 (5,6) |
| Terapia adjuvante com corticosteroide, n° (%) | 13 (72,2) |
| Óbito por <i>P. jirovecii</i> pneumonia, n° (%) | 2(11,1) |

Os dados são apresentados como número (%), média ± DP ou mediana [Intervalo Interquartil 25-75].

Abreviaturas: SIDA: Síndrome da imunodeficiência adquirida; PCP: Pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*; HIV: Doença pelo vírus da imunodeficiência humana; PaO₂: Pressão parcial arterial de oxigênio; DHL: desidrogenase láctica; SMT-TMT: Sulfametoxazol- trimetoprima.

7. CONCLUSÕES

Observamos mutação na amostra de apenas um paciente, nos códons 55 e 57 do gene que codifica a enzima DHPS do *Pneumocystis jirovecii* entre os 16 espécimes clínicos testados para a mutação. O paciente não estava fazendo profilaxia com SMX-TMP para PCP, sugerindo que a transmissão de humano para humano foi a mais provável fonte de aquisição do isolado mutante nesse caso. Os demais casos apresentaram o chamado “padrão selvagem” na tipagem do *P. jirovecii* no *locus* da DHPS, ou seja, o padrão de aminoácidos treonina na posição 55 e prolina na posição 57 da enzima perfil, que significa ausência de mutação.

Dois pacientes morreram (11,1%), sendo que um deles apresentava a mutação DHPS do *Pneumocystis jirovecii*.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo confirma a existência de cepas mutantes no DHPS no códon 55 (alanina) e no códon 57 (serina) demonstrando um aumento de prevalência da mutação em relação à dados prévios da mesma instituição embora a prevalência atual seja baixa. São necessários estudos continuados para avaliar medidas de prevenção da disseminação de infecção, vigilância e monitoramento dos pacientes com SIDA e PCP para detecção de mutações.

Não há, entre os artigos científicos revisados, nenhum dado sobre mutação do DHPS do *P. jirovecii* no Brasil. O tema merece ser analisado no cenário brasileiro, no qual ainda há um número elevado de internações por PCP associada à AIDS. Os hospitais terciários no Brasil têm uma grande circulação do *P. jirovecii* nas suas dependências. O estudo atual traz dados relevantes que estimulam novas pesquisas sobre o desenvolvimento de resistência antimicrobiana deste fungo em nosso país, mudança de prevalência das mutações conhecidas ou mesmo surgimento de outras mutações. Prevalências elevadas das mutações na DHPS do *P. jirovecii* têm sido identificadas em países desenvolvidos. Adicionalmente, estudos para esclarecer os mecanismos envolvidos na resistência ao fármaco sulfa e as implicações clínicas destas são bem-vindos.

ANEXOS

Anexo I

Obtenção das amostras e detecção do *P. jirovecii*

O LBA é coletado na rotina diagnóstica dos casos suspeitos de PCP no HCPA. A análise microscópica de lâminas de LBA, coradas pelos métodos da prata de Grocott e de Giemsa, é utilizada para confirmação diagnóstica.

O LBA é obtido pela instilação de alíquotas de soro fisiológico nos segmentos pulmonares, seguida pela aspiração do material, totalizando 120 a 150 ml. (1).

A análise do LBA tem proporcionado um acréscimo significativo no diagnóstico de doenças neoplásicas, infecciosas, e doenças difusas do parênquima pulmonar (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.

- A extração do DNA do *P. jirovecii* foi realizada no Laboratório Especial de Doenças Infecciosas, localizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre utilizando o PureLink™ Genomic DNA Mini Kit, conforme o seu protocolo, apenas foi adaptada a temperatura 55°C e o tempo da proteinase K, a fim de aumentar a eficiência da extração.

- Detecção do *P. jirovecii*: O gene de cópia única da Dihidropteroato sintetase (DHPS) foi amplificado nas amostras positivas através de protocolo que utiliza os *primers* DHPS3 (5' GCG CCT ACA CAT ATT ATG GCC ATT TTA AATC 3') e DHPS4 (5' GGA ACT TTC AAC TTG GCA ACC AC 3'). O produto da reação foi revelado por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e a banda visualizada através de luz ultravioleta (2).

Referências:

- 1- Moreira M. B, Steidle L. J. M, Fortes D. Y. et al. Rendimento diagnóstico da broncoscopia no HU/UFSC. **Pulmão RJ** 2010; 19(1-2): 13-20.
- 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.

Anexo II

Tabelas 1 e 2: Dados demográficos e clínicos**Tabela 1.** Dados demográficos e clínicos dos 16 casos com amplificação positiva à Reação em Cadeia pela Polimerase / Dihidropteroato sintetase (PCR/DHPS).

| Caso | LBA ^a | Diagnóstico HIV concomitante com PCP ^b | Idade | Sexo | PaO ₂ ^c | LDH ^d | ARV ^e | PCP ^f prévia | Profilaxia para PCP | Tratamento para PCP | R/O ^g |
|------|------------------|---|-------|------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 1 | 2016 | Sim | 41 | F | 92,1 | 286 | Não | Não | Não | Sim | R |
| 2 | 2016 | Não | 51 | M | - | 549 | Sim | Não | Não | Sim | R |
| 3 | 2016 | Sim | 42 | F | 103 | 730 | Não | Não | Não | Sim | R |
| 4 | 2016 | Sim | 38 | M | 67,3 | 302 | Não | Não | Não | Sim | O |
| 5 | 2016 | Sim | 36 | M | 144 | 613 | Não | Não | Não | Sim | O |
| 6 | 2016 | Não | 37 | M | 87,5 | 213 | Sim | Não | Sim | Sim | R |
| 7 | 2016 | Não | 30 | F | 69,3 | 447 | Não | Não | Não | Sim | R |
| 8 | 2016 | Sim | 27 | F | 78,8 | 1140 | Não | Não | Não | Sim | R |
| 9 | 2016 | Não | 42 | M | 109 | 236 | Não | Não | Não | Sim | R |
| 10 | 2016 | Não | 50 | F | 72,8 | 415 | Não | Não | Não | Sim | R |
| 11 | 2016 | Sim | 56 | F | 54,1 | 890 | Não | Não | Não | Sim | R |
| 12 | 2017 | Sim | 36 | M | 75,9 | 293 | Não | Não | Não | Sim | R |
| 13 | 2017 | Não | 50 | F | 150 | 217 | Sim | Não | Não | Sim | R |
| 14 | 2017 | Sim | 71 | F | 76,8 | 253 | Não | Não | Não | Sim | R |
| 15 | 2017 | Não | 20 | F | 79,6 | 655 | Sim | Não | Não | Sim | R |
| 16 | 2017 | Não | 46 | F | 76,7 | 224 | Não | Não | Não | Sim | R |

^a Ano do lavado broncoalveolar (LBA); ^b Vírus da imunodeficiência humana e pneumonia por *P. jirovecii* (PCP); ^c Pressão parcial de oxigênio arterial (mmHg); ^d Desidrogenase láctica sérica (U/L); ^e Uso de antiretrovirais; ^f Pneumonia por *P. jirovecii*; ^g R: recuperado, O: óbito; ^h diagnóstico do HIV no momento da PCP; ⁱ sulfametoxazol-trimetoprim; ^j uso de corticóide como terapia adjuvante; ^k substituição do tratamento por efeito adverso.

Tabela 2. Dados demográficos e clínicos dos 2 casos que não amplificaram para Reação em Cadeia pela Polimerase / Diidropteroato sintetase (PCR/DHPS).

| Caso | LBA ^a | Diagnóstico HIV concomitante com PCP ^b | Idade | Sexo | PaO ₂ ^c | LDH ^d | ARV ^e | PCP ^f prévia | Profilaxia para PCP | Tratamento para PCP | R/O ^g |
|------|------------------|---|-------|------|-------------------------------|------------------|------------------|-------------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| 1 | 2016 | Não | 34 | F | 34,6 | 511 | Sim | Não | Não | Sim | R |
| 2 | 2017 | Não | 36 | F | 79,7 | 188 | Não | Não | Não | Sim | R |
| | | | | | | | | | | | |

^a ano do lavado broncoalveolar; ^b vírus da imunodeficiência humana e pneumonia por PCP; ^c pressão parcial de oxigênio arterial (mmHg); ^d desidrogenase láctica sérica (U/L); ^e uso de antiretrovirais; ^f pneumonia por *Pneumocystis*; ^g R: recuperado, O: óbito; ^h diagnóstico do HIV no momento da PCP; ⁱ sulfametoxazol-trimetoprima; ^j uso de corticóide como terapia adjuvante; ^k substituição do tratamento por efeito adverso.