

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

TESE DE DOUTORADO

**AUSÊNCIA DE MUTAÇÕES NO GENE DA DIIDROPTEROATO SINTETASE DO  
*PNEUMOCYSTIS JIROVECI* EM PACIENTES COM A SÍNDROME DA  
IMUNODEFICIÊNCIA ADQUIRIDA (AIDS) NO BRASIL**

**GUSTAVO WISSMANN NETO**

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

Porto Alegre, 2006

Aos meus pais Elário (*in memoriam*)

e

Noemia

## **Agradecimentos**

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

- ao Prof. João Carlos Prolla, pela orientação segura e pelo exemplo como professor;

- à Dra. Ada Diehl e à equipe da Unidade de Citologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pelo fornecimento das lâminas de Giemsa e pelo apoio constante;

- à Dra. Ann E. Wakefield, da Universidade de Oxford, Inglaterra, pelo estímulo para pesquisar sobre o *Pneumocystis jirovecii* (*in memoriam*).

- ao Prof. Steven Meshnick, da Universidade da Carolina do Norte, EUA, pela colaboração para a realização do seqüenciamento do DNA.

## SUMÁRIO

### **1 INTRODUÇÃO / 5**

1.1- A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida nos dias atuais / 5

1.2- O *Pneumocystis jirovecii* à luz das técnicas de Biologia Molecular / 9

1.3- O uso das sulfonamidas na profilaxia e as mutações no gene da Dihidropteroato sintetase do *Pneumocystis jirovecii* / 16

1.4- Referências bibliográficas / 26

### **2- OBJETIVO / 39**

**3- ARTIGO:** Absence of Dihydropteroate Synthase Mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian AIDS patients / 40

### **4- DISCUSSÃO FINAL / 50**

### **5- CONCLUSÕES / 52**

### **6- PERSPECTIVAS FUTURAS / 53**

### **7- ANEXOS / 54**

7.1- Anexo 1: Extração do DNA, Reação em Cadeia pela Polimerase e Seqüenciamento do gene da Dihidropteroato sintetase / 54

7.2 - Anexo 2: Tabelas dos dados clínicos e demográficos / 57

7.3 - Anexo 3: Análise estatística / 62

## 1- INTRODUÇÃO

### 1.1 - A pneumonia por *Pneumocystis jirovecii* associada à Síndrome da Imunodeficiência Adquirida nos dias atuais

O início da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) no começo da década de 1980 trouxe uma enorme mudança na incidência da pneumonia por *Pneumocystis jirovecii*, na época chamado *Pneumocystis carinii*. Os primeiros relatos sobre a epidemia da AIDS foram justamente os casos desta pneumonia observados em pacientes usuários de drogas injetáveis e homossexuais masculinos, como registraram Masur e cols em 1981 (1). E a Pneumocistose, ou pneumonia por *Pneumocystis* (PCP), como também é chamada, passou rapidamente a ser identificada como o diagnóstico mais comum no momento da apresentação da AIDS entre os pacientes norte-americanos (2).

É interessante ressaltar que o *P. jirovecii* observado na pneumonia associada à AIDS é considerado, através da análise genética, como o mesmo microorganismo que ocorria antes dessa epidemia. Isto foi demonstrado em estudo publicado por Tsolaki e cols em 1998, no qual foram avaliadas amostras obtidas de pacientes que apresentaram PCP associada a outras causas de imunodeficiência entre 1968 e 1981. Os resultados desse estudo coordenado pela Prof. Ann Wakefield, da Universidade de Oxford, mostraram que o microorganismo encontrado antes da epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV) apresentou alta similaridade genotípica com o observado nos casos de PCP associada à AIDS (3).

O uso da chamada terapia antiretroviral potente – 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 – alterou substancialmente desde

1996 o prognóstico dos pacientes infectados pelo vírus HIV. Foi estimada, em estudo publicado por Eggers e cols no ano de 1997, uma redução de 65% na mortalidade de pacientes infectados pelo vírus HIV com linfócitos CD4 abaixo de 200 cels/ $\mu$ l e que fizeram uso da terapia tríplice (4). No ano de 1998, uma publicação de dados do “EuroSIDA Study Group” confirmou uma queda significativa na mortalidade entre os pacientes HIV-positivos que foram tratados com a referida associação antiretroviral (5).

Um estudo de grande magnitude, chamado “Adult and Adolescent Spectrum of HIV Disease”, do *Center for Diseases Control and Prevention*, nos Estados Unidos, demonstrou o declínio da ocorrência das infecções oportunistas após o advento da terapia antiretroviral potente. 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, a PCP ainda figura nesse estudo como a infecção oportunista mais comum no momento do diagnóstico da AIDS. É interessante notar no mesmo estudo que, entre os pacientes que desenvolveram PCP, cerca de 44% não estavam em acompanhamento médico para a infecção pelo HIV, provavelmente por desconhecerem esse diagnóstico (6).

Resultados do “Multicenter AIDS Cohort Study” também apresentaram o impacto da terapia antiretroviral potente sobre a incidência das infecções oportunistas associadas à AIDS. Uma significativa redução (89%) no risco relativo para o desenvolvimento da PCP em pacientes com AIDS foi observada no período de 1996 a 1998, em comparação com o período de 1990 a 1992, no qual era usada a monoterapia antiviral (7).

Ao contrário dos dados acima, em alguns países em desenvolvimento a situação é claramente diferente, como na África. Conforme revisão feita por Fisk e cols, a incidência de PCP na África tem crescido nos últimos anos com o avanço da epidemia da AIDS naquele continente (8).

No passado, o quadro de infecções respiratórias associadas à AIDS na África mostrava uma

baixa prevalência de PCP. Abouya e cols relataram, no ano de 1992, somente 9% de casos de PCP numa série de 53 autópsias de pacientes HIV-positivos em Adidjan, África Ocidental; a tuberculose pulmonar foi a causa do óbito em 40% desses casos (9). Batungwanayo e cols relataram, em 1994, uma prevalência de somente 5% de PCP entre 111 casos de pacientes com o vírus HIV e sintomas respiratórios que foram submetidos à broncoscopia em Rwanda (10).

Nos últimos anos são referidas, como já mencionado, conforme o estudo de revisão de Fisk e cols, taxas maiores de prevalência da PCP no continente africano, entre 11-39% das infecções respiratórias associadas à AIDS (8). Morris e cols, ao abordarem a epidemiologia da PCP nos dias de hoje, em artigo publicado no ano de 2004, referem que a baixa prevalência previamente registrada pode ter ocorrido pela carência de recursos para o diagnóstico; além disso, os mesmos autores alertam para a possibilidade de que muitos pacientes HIV-positivos vieram ao óbito por tuberculose ou pneumonias bacterianas, o que evitaria que esses indivíduos atingissem o nível mais baixo de CD4 no qual a PCP geralmente se manifesta (11). De qualquer modo, a exposição da população africana ao *P. jirovecii* não parece ser menor do que em outros continentes, conforme Wakefield e cols, que demonstraram altas taxas de anticorpos anti-*Pneumocystis* também entre as crianças africanas (12).

A pneumonia por *P. jirovecii* na população pediátrica na África, cuja prevalência já se mostrava superior à dos adultos em estudos prévios (11), segue atualmente sendo demonstrada em taxas de prevalência de até 49% dos casos de pneumonias associadas à AIDS, como descreveram Ruffini e cols no ano de 2002 na África do Sul (13).

No Brasil, temos o registro de 362.364 casos de AIDS de 1980 a junho de 2004, conforme dados do Boletim Epidemiológico do Ministério da Saúde do Brasil / ano 2005.

Em relação à prevalência da PCP no Brasil, Cury e cols observaram, em estudo de 92 casos de autópsias de pacientes brasileiros com AIDS durante os anos de 1993 a 2000, cerca de 48% de

óbitos por infecção respiratória, entre os quais 17,5 % de casos de PCP (14). Pereira e cols, em outro estudo brasileiro que avaliou autópsias de 40 pacientes com AIDS entre 1990 e 2000, demonstraram a presença do *P. jirovecii* em 19,1% dos agentes infecciosos pulmonares identificados (15).

Marins e cols demonstraram, através de um estudo retrospectivo realizado no Brasil e publicado em 2003, a mudança significativa na sobrevida de pacientes com AIDS no Brasil após o uso das medicações antiretrovirais. Foi observada uma sobrevida média de 58 meses para os pacientes que tiveram o diagnóstico da AIDS em 1996, sendo que antes de 1989 é citada uma sobrevida média de somente 5,1 meses. Este estudo avaliou 2821 casos de várias regiões brasileiras e apresenta o tratamento antiretroviral como o grande preditor do aumento da sobrevida encontrado. Percebe-se assim um forte impacto do uso da terapia antiretroviral nos pacientes com AIDS no nosso país. 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 (16). O mesmo autor ressalta que, neste novo contexto da AIDS no Brasil, a tuberculose passou a ser mais frequente que a PCP como doença presente no diagnóstico da síndrome, ressaltando que isto pode em parte ser devido à profilaxia utilizada.

Ainda em relação à queda na prevalência da PCP nesta época da terapia antiretroviral potente, Atzori e cols sugeriram, no ano de 2000, que existe uma ação inibitória direta dos medicamentos inibidores da protease sobre o *P. jirovecii* (17). Conforme esses autores, tal ação poderia contribuir para a redução das taxas de PCP, além da já claramente demonstrada recuperação da imunidade pelo uso da terapia antiretroviral potente. Essa observação foi contestada por Walzer, que demonstrou que as drogas antivirais, entre as quais os inibidores da protease, não parecem ter efeito direto sobre o *P. jirovecii in vitro* ou *in vivo* (18, 19).



## 1.2- O *Pneumocystis jirovecii* à luz das técnicas de Biologia Molecular

Os estudos acerca do comportamento do *P. jirovecii* sempre foram limitados pelo fato de esse microorganismo não crescer nos meios de cultura *in vitro*. A partir dos métodos de análise do DNA houve um avanço importante no conhecimento acerca do *P. jirovecii*. Após ter sido considerado um protozoário por quase 80 anos, foi definido como um fungo no ano de 1988 através da análise genética, conforme relatado por Edman e cols (20).

No ano de 1990, a professora Ann Wakefield, do Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Oxford, Inglaterra, apresentou pela primeira vez o método da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para a detecção do *Pneumocystis*, utilizando oligonucleotídeos iniciadores para a amplificação de uma seqüência do DNA que é parte do gene que codifica a chamada “Grande Subunidade do RNA Ribossômico Mitocondrial” (21). A PCR, que revolucionou a Biologia Molecular, passou então a servir de base para estudos moleculares relacionados ao diagnóstico e à epidemiologia do microorganismo.

Através da Pós-graduação em Pneumologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, tivemos o privilégio de acompanhar os trabalhos da Prof. Ann Wakefield por três meses no ano de 1997, o que despertou nosso interesse no estudo do *P. jirovecii*. Vários artigos de autoria da Prof. Wakefield, falecida em 2002, ou de sua equipe, serão ainda citados nesta introdução.

O uso da Reação em Cadeia pela Polimerase no diagnóstico da infecção pelo *P. jirovecii* foi demonstrado em vários espécimes clínicos. Flori e cols mostraram o uso da PCR no lavado broncoalveolar (LBA) e compararam seus resultados com os métodos de coloração Giemsa e Gomori-Grocott; a sensibilidade e a especificidade foram de 100% e 87% na PCR e 60% e 100% nos métodos citológicos (22). Wakefield introduziu a aplicação da PCR no escarro induzido, relatando sensibilidade de 90% neste método e 70% no método citológico da coloração Gomori-

Grocott (23). A possibilidade de utilizar amostras da orofaringe no diagnóstico da PCP foi apresentada em 1999 por Tsolaki e cols, os quais ressaltaram que a fácil obtenção das amostras poderia propiciar o uso deste espécime clínico para monitorar a resposta ao tratamento ou para genotipagens em estudos epidemiológicos (24). Ainda em relação às amostras da orofaringe, Fischer e cols mostraram, no ano de 2001, uma sensibilidade de 91% no diagnóstico da PCP a partir da análise desses espécimes em 175 casos (25).

Por outro lado, a detecção do *P. jirovecii* pela Reação em Cadeia pela Polimerase no sangue não tem valor no diagnóstico da pneumonia por este microorganismo, conforme Tamburrini e cols (26).

Foi mais recentemente descrito o uso da PCR quantitativa para evitar que a alta sensibilidade do método e a possibilidade de colonização pelo *P. jirovecii*, que será abordada a seguir, interfiram na acurácia diagnóstica da pneumonia por esse fungo. Flori e cols destacaram em 2004 o uso da PCR quantitativa em amostras do LBA como instrumento útil na diferenciação entre infecção e colonização (22). O mesmo método já havia sido proposto para este fim por Larsen e cols em 2002 (27).

Além das questões referentes ao diagnóstico, muitos avanços no entendimento do *P. jirovecii*, como comentado anteriormente, foram obtidos com as técnicas de análise molecular. Há décadas atrás pensava-se que a PCP seria uma zoonose; o microorganismo era encontrado em vários outros hospedeiros – ratos, camundongos, porcos e outros – e especulava-se assim que o reservatório do mesmo poderia ser em animais. Frenkel, entretanto, em 1976 já descrevia diferenças fenotípicas entre o *Pneumocystis* encontrado no homem e os encontrados em animais (28).

Sinclair e Wakefield em 1991 mostraram pela primeira vez que os microorganismos obtidos do homem e os do rato são geneticamente diferentes, através da análise do seqüenciamento do DNA que codifica a Grande Subunidade do RNA Ribossômico Mitocondrial, conhecida como uma região

particularmente útil como instrumento na filogenia molecular (29). Banerji e cols demonstraram diferenças genéticas no *Arom locus* de ratos, humanos, coelhos e camundongos (30). Denis e cols mostraram a diversidade ao nível do *SODA locus* em ratos, humanos, coelhos, macacos e porcos (31). Gigliotti e cols observaram em 1993 que o *Pneumocystis* não era transmissível entre diferentes mamíferos (32).

O *Pneumocystis* que infecta o homem é hoje chamado *Pneumocystis jirovecii*. Este nome foi proposto em publicação da revista **Emerging Infectious Diseases**, do ano de 2002, na qual Stringer, Wakefield e outros pesquisadores ressaltaram o *Pneumocystis* que infecta o homem como uma espécie distinta e conferiram o nome em memória ao parasitologista Otto Jirovec, a quem é atribuída pelos autores a primeira descrição do microorganismo em humanos (33).

Hughes (34) discordou da nova nomenclatura, referindo que os holandeses Van der Meer e Brug, em 1942, e o tcheco Josef Vanek, em 1951, teriam demonstrado o *Pneumocystis* em humanos antes que assim o fizesse Otto Jirovec em 1952. Entretanto, Stringer e cols insitiram na nova nomenclatura (35), apoiados por Frenkel, que já havia sugerido, em 1999, o nome *Pneumocystis jirovecii* (36).

Cabe aqui lembrar brevemente que as publicações acerca do microorganismo e sua nomenclatura iniciaram no Brasil. Carlos Chagas, do Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, descreveu-o pela primeira vez em 1909 e pensou que se tratava de uma fase do *Trypanosoma cruzi* (37). Antonio Carini, um pesquisador italiano que atuava em São Paulo, demonstrou o mesmo organismo em pulmões de ratos em 1910 (38). A seguir, os franceses Delanoe e Delanoe descobriram que se tratava de um novo patógeno e o denominaram *Pneumocystis carinii*, em homenagem a Antonio Carini (39).

Como mencionamos anteriormente, hoje sabemos através da análise molecular que existem várias espécies de *Pneumocystis* que infectam os diferentes animais. O nome *Pneumocystis*

*jirovecii*, apesar da divergência acima mencionada, tem predominado atualmente nas publicações sobre a espécie que infecta o homem. A publicação **MMWR**, do *Center for Disease Control and Prevention*, utilizou o nome *P. jirovecii* em artigo do ano de 2004, que trata da atualização das rotinas de tratamento das infecções oportunistas associadas à AIDS (40).

Após a definição da diversidade do *Pneumocystis* que infecta diferentes mamíferos, as técnicas de estudo molecular evidenciaram um significativo polimorfismo genético no próprio *P. jirovecii*.

As seqüências de DNA denominadas ITS (*Internal Transcribed Spacer*) 1 e 2, localizadas, respectivamente, entre os genes 18S rRNA e 5.8S rRNA e os genes 5.8S rRNA e 26S rRNA, são *loci* não codificadores que apresentam alto grau de polimorfismo e têm sido aplicados na tipagem genética do *P. jirovecii* (41).

O primeiro método de tipagem das regiões ITS 1 e ITS 2 foi proposto por Lu e cols em 1994, que criaram uma classificação para os alelos que possam ser encontrados nesta tipagem do *P. jirovecii* (42). Usando tal sistema, Lee e cols em 1998 apresentaram um estudo multicêntrico que analisou 207 amostras, encontrando um surpreendente polimorfismo ao detectar 59 subtipos de *P. jirovecii* (43).

Tsolaki e cols, do Instituto de Medicina Molecular de Oxford, desenvolveram um segundo sistema de tipagem ITS 1 / ITS 2 e igualmente demonstraram um alto grau de polimorfismo, ao apresentar cerca de 40 subtipos de *P. jirovecii*, com a ocorrência de coinfeção em cerca de um terço dos casos (44). A seguir Miller, do mesmo grupo de pesquisadores, ao avaliar um pequeno número de casos, abordou a possibilidade de haver alguma correlação entre os tipos ITS 1 / ITS 2 e a severidade da pneumonia pelo *P. jirovecii* (45). Isto não foi confirmado em estudos posteriores, como o de Helweg-Larsen, no ano de 2001, que avaliou prospectivamente 130 pacientes e não encontrou associação entre os genótipos ITS e a severidade clínica da PCP (46).

A avaliação do polimorfismo do *P. jirovecii* mostrou-se útil para estudar os aspectos de transmissão do microorganismo. Nimri e cols destacaram que o polimorfismo apresentado na análise das regiões ITS pode ser importante na avaliação da possível transmissão de pessoa a pessoa (47). Stringer e Keely demonstraram que, nos casos de pneumonias recorrentes nos mesmos pacientes, eram encontrados diferentes subtipos ITS 1 e ITS 2 e também diferentes subtipos quando estudada a região da Grande Subunidade do RNA Ribossômico Mitocondrial. Estes resultados mostraram que as pneumonias recorrentes são provavelmente causadas por reinfecção (48, 49).

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* (50). A mesma autora apresentou também um caso de provável transmissão da infecção de mãe para filha (51), o que contraria a tese da reativação por organismos latentes.

Beard e cols, ao estudarem a tipagem (regiões da Grande Subunidade do RNA Ribossômico Mitocondrial e do gene que codifica a Diidropteroato sintetase) de 191 amostras de pacientes com PCP obtidas de cinco cidades norte-americanas, encontrou um padrão de genótipos associados ao local do diagnóstico e não ao local do nascimento do paciente. Afirmaram, assim, que a variação genética demonstrada sugere que a maioria dos casos de infecção pelo *P. jirovecii* são adquiridas de fontes como outros seres humanos ou do ambiente e não da reativação de infecções adquiridas precocemente na infância (52).

O conhecimento sobre a colonização no homem pelo *P. jirovecii* foi abordado por vários autores. Huang e cols relataram, no ano de 2003, a colonização em 69% de 32 indivíduos HIV-positivos assintomáticos, uma porcentagem acima de outros estudos revisados pelos mesmos autores e que indicaram anteriormente taxas de colonização entre 9 a 44% desses pacientes; a partir desse achado salientaram, assim como fez Wakefield e cols no mesmo ano, a possibilidade de que esses pacientes HIV-positivos assintomáticos colonizados tenham papel importante na transmissão

do *P. jirovecii* para outros indivíduos (53, 54). Takahashi e cols demonstraram em 2002 a colonização do fungo em pacientes imunossuprimidos HIV-negativos, como os portadores de doenças malignas e os pacientes transplantados, ao passo em que não observaram a colonização em indivíduos adultos imunocompetentes (55). Nevez e cols acrescentaram em 2003 que a população de indivíduos colonizados, além dos próprios pacientes com PCP, pode ter função como reservatório do *P. jirovecii* (56).

Quanto à presença do *P. jirovecii* na população pediátrica, estudos sorológicos já haviam mostrado que os seres humanos desenvolvem freqüentemente a chamada infecção primária na infância (57). Toutet e cols mostraram por tipagem genética que os subtipos do *P. jirovecii* pelas regiões ITS são similares entre as crianças imunocompetentes e os pacientes imunossuprimidos que desenvolvem PCP; assim, a população pediátrica pode também ter papel como reservatório do fungo (58). Vargas e cols também afirmaram que a freqüente detecção do *P. jirovecii* em crianças imunocompetentes fortalece a hipótese de que esta população possa ser um reservatório do fungo na comunidade (59).

Outro grupo específico foi alvo de estudos sobre a colonização do *P. jirovecii*: o dos profissionais de saúde. Miller e cols mostraram em 2001 a presença do fungo em alguns profissionais assintomáticos que trabalhavam em contato próximo com pacientes com PCP; esses profissionais foram considerados colonizados pelo *P. jirovecii* (60). Durand-Joly em 2003 investigou a presença do fungo no lavado da orofaringe de 146 profissionais de saúde num hospital universitário em Lille, França. O autor demonstrou a presença do *P. jirovecii* em profissionais que trabalham com pacientes imunossuprimidos e crianças; destacou que o fungo poderia circular pelo ar a partir dos pacientes e colonizar os referidos profissionais que, transitoriamente colonizados, poderiam transmitir o microorganismo a outros (61).

A colonização do *P. jirovecii* foi ainda recentemente relatada em pacientes portadores de

doenças pulmonares crônicas, conforme Monte-Cano e cols no ano de 2004. Ao estudarem amostras de 64 pacientes HIV-negativos com diferentes doenças pulmonares crônicas, referiram a presença do fungo em cerca de 27% deste grupo (62). A detecção do *P. jirovecii* em crianças com doença respiratória crônica na ausência de infecção pelo HIV já havia sido observada em 1998 por Contini e cols (63).

### **1.3- O uso das sulfonamidas na profilaxia e as mutações no gene da Diidropteroato sintetase do *Pneumocystis jirovecii***

A quimioprofilaxia da pneumonia pelo *P. jirovecii* tem papel fundamental no manejo dos pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida. Os pacientes adultos e adolescentes, incluindo mulheres gestantes, devem receber a quimioprofilaxia para a PCP se tiverem uma contagem de linfócitos CD4 abaixo de 200 cels/ $\mu$ l ou história de candidíase orofaríngea. Pacientes que têm uma porcentagem de CD4 abaixo de 14% ou história de uma doença associada à AIDS devem ser considerados para a profilaxia. Também deve ser considerado o uso da quimioprofilaxia quando a contagem dos linfócitos CD4 encontra-se abaixo de 250 cels/ $\mu$ l e não é possível um monitoramento freqüente da mesma (64, 65).

O composto sulfametoxazol-trimetoprim (SMX-TMP) é o agente mais indicado para a quimioprofilaxia da PCP. Uma dose de 960mg (800mg de sulfametoxazol e 160mg de trimetoprim) por via oral ao dia é o regime preconizado; também mostraram-se efetivas doses de 480 mg ao dia ou 960mg três vezes por semana (64). O SMX-TMP confere proteção também contra a toxoplasmose e infecções bacterianas (66, 67).

A ação do SMX-TMP sobre o *P. jirovecii* ocorre principalmente pela atividade da sulfa, conforme já descrito em 1992 por Walzer e cols, que avaliaram os antifolatos em modelo animal (68).

Os efeitos colaterais do SMX-TMP são comuns em pacientes com AIDS. Os relatados com maior frequência são: febre, distúrbios gastrintestinais, eritrodermia e leucopenia (69, 70). Os pacientes que apresentam efeitos adversos podem se beneficiar de uma reintrodução gradual, a chamada dessensibilização à droga (71). Se os efeitos colaterais não forem tolerados, os regimes profiláticos alternativos incluem dapsona via oral, dapsona e pirimetamina e ácido fólinico via oral,



pentamidina aerossolizada (administrada pelo nebulizador Respigard II TM) ou atovaquona via oral (64).

Ioannidis e cols, em metanálise que avaliou 35 estudos randomizados que compararam diferentes tipos de quimioprofilaxia, concluíram que o SMX-TMP é a profilaxia superior em termos de efetividade (72).

A profilaxia da PCP pode ser suspensa quando está evidenciada a restauração da imunidade do paciente com AIDS em uso da terapia antiretroviral potente. Furrer e cols demonstraram em 1999 que a profilaxia primária para PCP pode ser suspensa, de maneira segura, quando a contagem dos linfócitos CD4 atinge 200 cels/ $\mu$ l ou mais de forma sustentada por três meses (73). Ledergerberg e cols em 2001 concluíram ser possível a suspensão da profilaxia secundária ao serem atingidos esses mesmos níveis de CD4 ao analisar, de forma prospectiva, episódios de PCP recorrentes em 325 pacientes (74). No mesmo ano, de Quiros demonstrou resultados similares quanto à suspensão tanto da profilaxia primária como da secundária (75).

É importante considerar que alguns pacientes não toleram as várias medicações da terapia antiretroviral potente (76) e outros poderão ter um vírus que desenvolva resistência às terapias em uso (77). Isso mostra a importância da quimioprofilaxia para PCP e, em consequência, do composto sulfametoxazol-trimetoprim, no manejo dos pacientes com AIDS ainda nos dias de hoje.

As sulfonamidas agem interferindo na síntese do folato, inibindo a enzima Diidropteroato sintetase (DHPS), que cataliza a união do ácido para-aminobenzóico e da pterina para formar o ácido diidropteróico. Os microorganismos como o *P. jirovecii* não possuem a capacidade de transportar o folato para dentro das células, como fazem os seres humanos, portanto dependem fundamentalmente da síntese do folato “de novo”, em cuja rota está a DHPS (78).

Mutações têm sido identificadas no gene da DHPS do *P. jirovecii*, como será abordado a seguir, o que tem levantado a discussão acerca do desenvolvimento da resistência do

microorganismo às sulfonamidas.

O gene da DHPS é conhecido, através do seqüenciamento genético, como parte do *fas gene*, que codifica também a diidroaldolase e a hidroximetildiidropterina, conforme demonstrado por Volpe em 1993 (79).

Lane e Meshnick, em conjunto com outros autores, demonstraram em 1997 pela primeira vez a presença de mutações no gene da DHPS do *P. jirovecii* e a possibilidade de elas estarem associadas às sulfonamidas (80).

O Professor Steven Meschnick, citado acima, atualmente no Departamento de Epidemiologia da Universidade da Carolina do Norte, Estados Unidos, é colaborador da pesquisa que estamos apresentando aqui.

As mutações referidas são pontuais e resultam na substituição de aminoácidos nas posições 55 e 57 da enzima. O padrão treonina 55 / prolina 57 é considerado o que normalmente existe na DHPS do *Pneumocystis* que infecta o homem e é também detectado no mesmo microorganismo em outros primatas; este padrão é assim designado o “padrão selvagem” (80, 81, 82). As mutações encontradas acarretam alterações na DHPS: substituição da treonina pela alanina na posição 55, da prolina pela serina na posição 57, ou ambas (80, 82, 83). Nos estudos que posteriormente serão abordados acerca da prevalência dessas mutações, o genótipo mutante mais comum e considerado o mais significativo no processo do desenvolvimento da resistência às sulfas é o que apresenta as duas alterações citadas, ou seja, alanina 55 / serina 57.

É destacado que as mutações descritas acima são não-sinônimas (acarretam alteração no aminoácido) e ocorrem em regiões altamente conservadas do gene da DHPS, o que sugere que esteja ocorrendo uma pressão seletiva por parte das sulfonamidas (80, 82). Kazanjian e cols também mostraram que as mutações foram detectadas a partir de 1993, o que reforça a tese de que estejam associadas ao uso das sulfonamidas na profilaxia da PCP (83).

É interessante observar também que, com base na homologia da DHPS da *E. coli*, as mutações pontuais referidas encontram-se num sítio ativo da enzima; as substituições de aminoácidos nessas posições podem resultar em alterações estruturais da enzima que afetam a sua ligação com o substrato (84).

Outros microorganismos têm apresentado mutações na DHPS e isto tem sido associado ao desenvolvimento da resistência às sulfonamidas. Mutações pontuais em posições equivalentes ao sítio referido no *P. jirovecii* são encontradas no *Plasmodium falciparum* (85) e no *Mycobacterium leprae* (86). Outras mutações próximas ao local são relatadas no *Streptococcus pneumoniae* (87) e também no *Plasmodium falciparum* (88).

Foi demonstrada de forma significativa a associação entre o uso do SMX-TMP ou da dapsona na profilaxia da PCP e a presença de mutações na DHPS do *P. jirovecii*. Kazanjian e cols, no ano de 1998, observaram mutações na DHPS em 71% dos pacientes expostos à profilaxia com sulfa ou dapsona e em 15% dos pacientes não expostos, avaliando 20 pacientes com diagnóstico de PCP cujos espécimes para análise foram obtidos entre 1995 e 1997 em Michigan, EUA (82). O mesmo autor apresentou, no ano de 2000, um estudo multicêntrico de várias cidades norte-americanas com 97 casos de PCP, encontrando mutações em 76% dos pacientes expostos às sulfonamidas e em 23% dos não expostos (83). Neste último trabalho, é claramente observado que o tempo de uso da profilaxia está associado ao risco de ocorrerem mutações no gene da DHPS do *P. jirovecii*.

Outros estudos de vários países também avaliaram a ocorrência de mutações na DHPS do *P. jirovecii* em amostras obtidas de pacientes com PCP que estavam em uso da profilaxia com sulfonamidas.

Huang e cols demonstraram no ano de 2000 que, na cidade de São Francisco, EUA, 81,5% dos pacientes com PCP apresentaram mutações no *P. jirovecii*, enquanto que em Seattle essa porcentagem era de 77,8% e em Atlanta era de 54,2%. Esse estudo concluiu que determinada região

geográfica é fator de risco para a presença do genótipo mutante, o que pode estar relacionado à transmissão do fungo de pessoa a pessoa (89). Os mesmos autores referiram, em estudo apresentado em 2001, que em diferentes áreas dentro da própria cidade de São Francisco há diferenças na prevalência do genótipo mutante (90).

Ma e cols, no ano de 1999, afirmaram que o uso do SMX-TMP na profilaxia da PCP está associado à presença de mutações na enzima DHPS, alvo das sulfonamidas, e não na enzima Diidrofolato redutase (DHFR), alvo do trimetoprim. Nesse estudo, entre 35 amostras oriundas de pacientes norte-americanos com PCP, foram detectadas mutações na DHPS em 18 delas e na DHFR em somente uma. As mutações na DHPS foram aquelas descritas anteriormente e a mutação na DHFR foi classificada como sinônima, ou seja, que não leva à alteração do aminoácido (91). Takahashi e cols também não encontraram mutações na DHFR do *P. jirovecii* que possam estar relacionadas ao desenvolvimento de resistência; estes autores observaram, em estudo publicado em 2002, entre 27 pacientes japoneses com PCP em uso de profilaxia com SMX-TMP, 14 mutações sinônimas e duas não-sinônimas em regiões referidas como não conservadas. As duas mutações não-sinônimas encontradas eram diferentes das que causam resistência em outros microorganismos como *E. coli* e *Plasmodium falciparum* (92).

Ao contrário dos dados acima, Nahimana e cols, no ano de 2004, referiram a ocorrência de mutações não-sinônimas acarretando alterações possivelmente envolvidas em sítios ativos da DHFR do *P. jirovecii* em 6 casos entre 33 pacientes oriundos da França e Suíça e que vinham recebendo profilaxia que incluía um inibidor da DHFR (93). Estes achados não foram confirmados por outros autores até o momento. Robberts e cols, em estudo publicado em 2005, encontraram quatro casos com mutações na DHFR, todas em regiões referidas como não altamente conservadas, entre 27 espécimes obtidos de pacientes sul-africanos com PCP (94).

As mutações na DHPS incidem, conforme observado por Ma e cols em 2001, de forma

independente em diferentes subtipos do *P. jirovecii* – vistos por tipagem genética, como a análise das regiões ITS – e não num único subtipo que poderia ter desenvolvido essas mutações e subseqüentemente ter sido disseminado (95).

Crothers e cols, no ano de 2003, apresentaram resultados sobre a presença de mutações na DHPS em 264 pacientes com PCP da cidade de São Francisco, EUA. Demonstraram a ocorrência de mutações em 91% dos pacientes em profilaxia e em 77% dos pacientes sem profilaxia. Observaram, ainda, que 66 dos 264 pacientes (25%) tinham a PCP como primeira manifestação da AIDS; entre estes, 71% já apresentavam o genótipo mutante. Os autores destacaram que a presença dos genótipos mutantes nos não expostos à profilaxia reforça a possibilidade da transmissão do *P. jirovecii* de pessoa a pessoa (96).

Helweg-Larsen e cols em 1999, ao avaliarem amostras de 144 pacientes que apresentaram PCP entre 1989 e 1990 na Dinamarca, encontraram uma associação significativa entre o uso da sulfa e a presença de mutações na DHPS; demonstraram a ocorrência de mutações em 62% dos pacientes em uso de profilaxia e em somente 10,5% dos que não fizeram uso da mesma (97).

Visconti e cols, em Roma, Itália, no ano de 1999, observaram 70% de genótipos mutantes em pacientes em uso de profilaxia, estudando 18 casos de PCP (98). Resultados divergentes no mesmo país foram publicados no ano de 2002 por Ma e cols, que avaliaram 107 pacientes com PCP na cidade de Milão e demonstraram mutações na DHPS em somente 19% dos expostos à profilaxia e em 4% dos não expostos, concluindo que nos pacientes italianos a prevalência das mutações na DHPS do *P. jirovecii* é baixa (99). Outro estudo também realizado em Milão, publicado em 2003 por Zingale e cols, apresentou, por sua vez, uma alta prevalência do genótipo mutante (72,4% dos pacientes expostos) (100). Esta significativa diferença nos dados oriundos dos estudos italianos pode ser devida à metodologia utilizada; Ma e cols utilizaram a técnica chamada *PCR-SSCP* (PCR com análise conformacional do polimorfismo da fita simples de DNA), enquanto os outros dois

estudos utilizaram técnicas de seqüenciamento.

Uma prevalência de 35,3% de mutações entre os expostos e 25% entre os não expostos, diferença que não é estatisticamente significativa, foi demonstrada por Costa e cols, em estudo realizado em Portugal e publicado no ano de 2002. O estudo avaliou 89 pacientes, entre os quais 6 imunossuprimidos HIV-negativos. A presença do polimorfismo referido entre os não expostos, segundo os autores, faz pensar que o *P. jirovecii* mutante pode estar sendo transmitido de pessoa a pessoa ou a partir de uma fonte no meio ambiente (101).

Nahimana e cols apresentaram, no ano de 2003, após avaliarem 158 pacientes imunossuprimidos com PCP (120 HIV-positivos, 38 HIV-negativos) da cidade de Lyon, França, uma prevalência de 80% de genótipos mutantes entre os pacientes expostos às sulfonamidas e de 29,7% entre os não expostos. Nesse estudo, foi incluído o uso do esquema sulfadoxina-pirimetamina como profilaxia para a PCP. Um resultado interessante aqui foi relatar que, entre os cinco hospitais daquela cidade envolvidos na pesquisa, um hospital específico foi um fator de risco independente para a presença das mutações, mostrando que uma transmissão de pessoa a pessoa poderia disseminar *P. jirovecii* mutantes (102).

Os estudos acima referidos mostraram uma prevalência maior das mutações na DHPS nos pacientes que apresentaram a PCP e estavam em uso da profilaxia com sulfonamidas. Isto leva a crer que as mutações estão associadas ao desenvolvimento de resistência do *P. jirovecii* a essas drogas utilizadas na quimioprofilaxia. Entretanto, não está claro se a presença das mutações pode ter alguma associação com a falha no tratamento da PCP com medicações com sulfa em doses mais altas.

Helweg-Larsen e cols, no ano de 1999, observaram na Dinamarca uma maior mortalidade em três meses entre 31 pacientes que apresentaram o *P. jirovecii* mutante em comparação com 121 pacientes que apresentaram o genótipo “selvagem” do fungo. Porém, não se soube no estudo se a

morte foi especificamente causada pela falha no tratamento da PCP (97).

Takahashi e cols, no ano de 2000, em estudo realizado no Japão com somente 24 pacientes, concluíram que as mutações estão associadas à falha no tratamento da PCP; os autores mostraram a falha na terapêutica com SMX-TMP em dois de 18 pacientes com o genótipo “selvagem” e em todos os quatro pacientes com o genótipo mutante do *P. jirovecii* (103).

Outro estudo, que avaliou prospectivamente 102 pacientes norte-americanos com PCP tratados com SMX-TMP, publicado por Navin e cols no ano de 2001, mostrou resultados divergentes, não encontrando relação entre o genótipo mutante e a falha terapêutica. Entre os pacientes com *P. jirovecii* mutante, foi observada uma mortalidade de 14% pela PCP; entre aqueles com *P. jirovecii* “selvagem”, foi relatada uma mortalidade de 25% (104).

Um aspecto importante na avaliação de drogas para a profilaxia e tratamento da PCP foi ressaltado por Iliades e Meshnick em recente artigo do ano de 2005, ao mostrarem que as mutações no gene da DHPS podem gerar uma ação de “resistência cruzada” do *P. jirovecii* contra várias drogas à base de sulfas. É destacado que novos compostos deveriam ser buscados entre as seguintes drogas que se mostraram capazes de inibir *in vitro* o *P. jirovecii* mutante naquele estudo: sulfacloropiridazina, sulfametoxipiridazina e sulfadiazina (105).

A possibilidade de ocorrer uma reversão na prevalência dos genótipos mutantes em virtude da redução do uso da sulfas nos países desenvolvidos na era da terapia antiretroviral potente foi referida por Miller e cols, ao compararem a taxa de mutações em uma pequena amostra de pacientes com PCP na Inglaterra entre os períodos 2000-2001 e 1992-1993 (106). Entretanto, Kazanjian e cols mostraram resultados divergentes em publicação de 2005, referindo um aumento na taxa de genótipos mutantes do *P. jirovecii* encontrados entre pacientes norte-americanos no período 2000-2001 (88% nos expostos à sulfas; 54% nos não expostos) em comparação com o período 1994-1995 (46% nos expostos; 0% nos não expostos), avaliando 24 casos no primeiro período e 20 no segundo

(107).

Como já comentado anteriormente, atualmente o foco de estudo do *P. jirovecii* tem se voltado para os chamados países em desenvolvimento, onde é encontrada uma maior ocorrência da PCP. Foram publicados alguns dados acerca da prevalência das mutações na DHPS no *P. jirovecii* no continente africano. No ano de 2003, Miller e cols, do grupo de pesquisadores anteriormente liderados pela Prof. Wakefield, relataram somente um caso de PCP com genótipo mutante entre 13 pacientes adultos com PCP no Zimbabwe (106).

Em 2004, Zar e Mesnhnick demonstraram que mutações na DHPS são incomuns em pacientes pediátricos com PCP na África do Sul. Entre 30 espécimes obtidos de crianças com PCP, quatro apresentavam o fungo com mutações, entre os quais três casos com mutações únicas no códon 55 ou no códon 57 e somente um caso da dupla mutação alanina 55 / serina 57. Somente uma criança nesse estudo usava profilaxia com sulfa, e apresentou PCP com genótipo selvagem. Os autores destacaram que o aumento do uso da sulfa atualmente na África pode resultar no surgimento de um maior número de mutações no *P. jirovecii* no continente africano (108).

Outro estudo recente, do ano de 2005, publicado por Robberts e cols, demonstrou que é rara a ocorrência das mutações na DHPS do *P. jirovecii* em pacientes com PCP na África do Sul. Estes autores observaram a ocorrência, entre 53 amostras em que o gene da DHPS foi amplificado com sucesso, somente uma com genótipo mutante da DHPS, no caso a dupla mutação alanina 55 / serina 57 (94).

Kazanjan e cols demonstraram, no ano de 2004, resultados sobre a ocorrência das mutações na DHPS do *P. jirovecii* na China. Observaram que um entre 14 pacientes chineses com PCP apresentava o genótipo mutante, neste caso uma única mutação, com o padrão alanina 55 / prolina 57. Nenhum caso apresentou a dupla mutação alanina 55 /serina 57. Entre os 14 pacientes avaliados, nenhum estava em uso de profilaxia para PCP (107).



Não há dados na América do Sul acerca da prevalência das mutações da Dihidropteroato sintetase no *Pneumocystis jirovecii* em pacientes que apresentam a pneumonia por este fungo.

#### 1.4- Referências bibliográficas

1. Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, et al. An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. **N Engl J Med** **1981**;305:1431-1438.
2. Mills J. *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii* infections in patients with AIDS. **Rev Infect Dis** **1986**;8:1001-1011.
3. Tsolaki AG, Beckers P, Wakefield AE. Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis*: high genotypic similarity with contemporary isolates. **J Clin Microbiol** **1998**;36:90-93.
4. Egger M, Hirschel B, Francioli P, Sudre P, Wirz M, Flepp M, et al. Impact of new antiretroviral combination therapies in HIV infected patients in Switzerland. **BMJ** **1997**;315:1194-1199.
5. Mocroft A, Vella A, Benfield TL, Chiesi A, Miller V, Gargalianos P, et al. Changing patterns of mortality across Europe in patients infected with HIV-1. **Lancet** **1998**;352:1725-1730.
6. Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederik T, Bertolli J, Lindegren ML, et al. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. **Clin Infect Dis** **2000**;30:5S-14S.
7. Detels R, Tarwater P, Phair JP, Margolick J, Riddler SA, Munoz A. Effectiveness of potent antiretroviral therapies on the incidence of opportunistic infections before and after AIDS diagnosis. **AIDS** **2001**;15:347-355.
8. 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.
9. Abouya YL, Beaumel A, Lucas S, Dago-Akribi A, Coulibaly G, N'Dhatz M, 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.

10. Batungwanayo J, Taelman H, Lucas S, Bogaerts J, Alard D, Kagame A, et al. Pulmonary disease associated with the human immunodeficiency virus in Kigali, Rwanda. A fiberoptic bronchoscopic study of 111 cases of undetermined etiology. **Am J Respir Crit Care Med** **1994**;149:1591-1596.
11. Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, et al. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. **Emerg Infect Dis** **2004**;10:1713-1720.
12. Wakefield AE, Tewart TJ, Moxon ER, Marsh K, Hopkin JM. Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. **Trans R Soc Trop Med Hyg** **1990**;84:800-802.
13. Ruffini DD, Madhi AS. The high burden of *Pneumocystis carinii* pneumonia in African HIV 1-infected children hospitalized for severe pneumonia. **AIDS** **2002**;16:105-112.
14. Cury PM, Pulido CF, Furtado VM, Palma FM. Autopsy findings in AIDS patients from a reference hospital in Brazil: analysis of 92 cases. **Pathol Res Pract** **2003**;199:811-814.
15. Pereira AS, Rodrigues DB, Correia D, Reis MA, Teixeira PA. Identificação de agentes infecciosos pulmonares em autópsias de pacientes com a síndrome da imunodeficiência adquirida. **Rev Soc Bras Med Trop** **2002**;35:635-639.
16. Marins JR, Jamal LF, Chen SY, Barros MB, Hudes ES, Barbosa AA, et al. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. **AIDS** **2003**;17:1675-1682.
17. Atzori C, Angeli E, Mainini A, Agostoni F, Micheli V, Cargnel A. In vitro activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors against *Pneumocystis carinii*. **J Infect Dis** **2000**;181:1629-1634.
18. Walzer PD, Ashbaugh A, Collins M, Cushion M. Anti-human immunodeficiency virus drugs are ineffective against *Pneumocystis carinii* in vitro and in vivo. **J Infect Dis** **2001**;184:1355-1357.
19. Walzer PD, Cushion M. Human immunodeficiency virus protease inhibitors and *Pneumocystis carinii*. **J Infect Dis** **2002**;185:1692-1693.

20. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the Fungi. **Nature** **1988**;334:519-522.
21. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, Sinclair K, Miller RF, Moxon ER, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. **Lancet** **1990**;336:451-453.
22. Flori P, Belleste B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosis *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. **J Med Microbiol** **2004**;53:603-607.
23. Wakefield AE, Miller RF, Guiver L, Hopkin JM. DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Lancet** **1991**;337:1378-1379.
24. Tsolaki AG, Miller RF, Wakefield AE. Oropharyngeal samples for genotyping and monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. **J Med Microbiol** **1999**;48:897-905.
25. Fischer S, Gill VJ, Kovacs J, Miele P, Keary J, Silcott V, et al. The use of oral washes to diagnose *Pneumocystis carinii* pneumonia: a blinded prospective study using a polymerase chain reaction-based detection system. **J Infect Dis** **2001**;184:1485-1488.
26. Tamburrini E, Mencarini P, Visconti E, Zolfo M, De Luca A, Siracusano A, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. **J Clin Microbiol** **1996**;34:1586-1588.
27. Larsen HH, Masur H, Kovacs JA, Gill VJ, Silcott VA, Kogulan P, et al. Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. **J Clin Microbiol** **2002**;40:490-494.
28. Frenkel JK. *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. **National Cancer Institute Monograph** **1976**;43:13-30.

29. Sinclair K, Wakefield AE, Banerji S, Hopkin J. *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. **Mol Biochem Parasitol** **1991**;45:183-184.
30. Banerji S, Lugli EB, Miller RF, Wakefield AE. Analysis of genetic diversity at the *arom* locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. **J Eukaryot Microbiol** **1995**;42:675-679.
31. Denis CM, Mazars E, Guyot K, Odberg-Ferragut C, Viscogliosi E, Dei Cas E, et al. Genetic divergence at the SODA locus of six different formae speciales of *Pneumocystis carinii*. **Med Mycol** **2000**;38:289-300.
32. Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, Haidaris PJ. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. **Infect Immun** **1993**;61:1886-1890.
33. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. **Emerg Infect Dis** **2002**;8:891-896.
34. Hughes WT. *Pneumocystis carinii* vs. *Pneumocystis jiroveci*: another misnomer (response to Stringer et al.). **Emerg Infect Dis** **2003**;9:276-277.
35. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Cushion MT. A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans (response to Hughes). **Emerg Infect Dis** **2003**;9:278-281.
36. Frenkel JK. *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical overview. **J Eukaryot Microbiol** **1999**;46:89S-92S.
37. Chagas C. Nova Trypanozomiaza humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n gen, n sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz** **1909**;1:159-208.
38. Carini A. Formas de eschizogonia do *Trypanosoma lewisi*. Soc De Med et Chir de São-Paulo 16 aou 1910, in **Bulletin de l'Institut Pasteur** **1910**; t IX :973-978.
39. Delanoe P, Delanoe M. Sur les rapports des kystes de Carini du poumon des rats avec le *Trypanosoma lewisi*. **C R Hebd Seances Sci** **1912**;155:658-659.

40. Benson AC, Kaplan JE, Masur H, Pau A, Holmes KK. Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents. **MMWR** 2004;53 (RR-15):5-8.
41. Beard CB, Roux P, Nevez G, Hauser PM, Kovacs JA, Unnasch TR, et al. Strain typing methods and molecular epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. **Emerg Infect Dis** 2004;10:1729-1735.
42. Lu JJ, Bartlett MS, Shaw MM, Queener SF, Smith JW, Ortiz-Rivera M, et al. Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. **J Clin Microbiol** 1994;32:2904-2912.
43. Lee CH, Helweg-Larsen J, Tang X, Jin S, Li B, Bartlett MS, et al. Update on *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. **J Clin Microbiol** 1998;36:734-741.
44. Tsolaki AG, Miller RF, Underwood AP, Banerji S, Wakefield AE. Genetic diversity at the internal transcribed spacer regions of the rRNA operon among isolates of *Pneumocystis carinii* from AIDS patients with recurrent pneumonia. **J Infect Dis** 1996;174:141-156.
45. Miller RF, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* genotypes and severity of pneumonia. **Lancet** 1999;353:2039-2040.
46. Helweg-Larsen J, Lee CH, Jin S, Hsueh JY, Benfield TL, Hansen J, et al. Clinical correlation of variation in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes in *Pneumocystis carinii f. sp. hominis*. **AIDS** 2001;15:451-459.
47. Nimri LF, Moura IN, Huang L, del Rio C, Rimland D, Duchin JS, et al. Genetic diversity of *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* based on variation in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. **J Clin Microbiol** 2002;40:1146-1151.
48. 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.

49. Keely S, Stringer JR. Multi-locus genotype switching in *Pneumocystis carinii* sp. f. *hominis*: evidence for reinfection. **J Euk Microbiol** **1996**;43:50S.
50. 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.
51. 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.
52. Beard CB, Carter JL, Keely SP, Huang L, Pieniazek NJ, Moura IN, et al. Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. **Emerg Infect Dis** **2000**;6:265-272.
53. Huang L, Crothers K, Morris A, Groner G, Fox M, Turner J, et al. *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. **J Eukaryotic Microbiol** **2003**;Suppl:126S-128S.
54. Wakefield AE, Lindley AR, Ambrose HE, Denis CM, Miller R. Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in human immunodeficiency virus-infected patients. **J Infect Dis** **2003**;187:901-908.
55. Takahashi T, Goto M, Endo T, Nakamura T, Yusa N, Sato N, et al. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection. **J Med Microbiol** **2002**;51:611-614.
56. Nevez G, Totet A, Jounieaux V, Schmit JL, Dei-Cas E, Raccurt C. *Pneumocystis jiroveci* internal transcribed spacer types in patients colonized by the fungus and in patients with pneumocystosis from the same French geographic region. **J Clin Microbiol** **2003**;41:181-186.
57. 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.

58. Tolet A, Pautard JC, Raccurt C, Roux P, Nevez G. Genotypes at the internal transcribed spacers of the nuclear rRNA operon of *Pneumocystis jiroveci* in nonimmunosuppressed infants without severe pneumonia. **J Clin Microbiol** 2003;41:1173-1180.
59. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa A, Ponce CA, Cabrera CE, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. **Clin Infect Dis** 2001;32:855-861.
60. Miller RF, Ambrose HE, Wakefield AE. *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. **J Clin Microbiol** 2001;39:3877-3882.
61. Durand-Joly I, Soula F, Chabé M, Dalle JH, Lafitte JJ, Senechal M, et al. Long-term colonization with *Pneumocystis jirovecii* in hospital staffs: a challenge to prevent nosocomial pneumocystosis. **J Eukaryotic Microbiol** 2003;50:614S-615S.
62. Montes-Cano MA, de la Horra C, Martin-Juan J, Varela JM, Torronteras R, Respaldiza N, et al. *Pneumocystis jiroveci* genotypes in the Spanish population. **Clin Infect Dis** 2004;39:123-128.
63. Contini C, Villa MP, Romani R, Merolla R, Delia S, Ronchetti R. Detection of *Pneumocystis carinii* among children with chronic respiratory disorders in the absence of HIV infection and immunodeficiency. **J Med Microbiol** 1998;47:329-333.
64. Kaplan JE, Masur H, Holmes KK. Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons. **MMWR** 2002;51(RR-8):4-5.
65. Kovacs JA, Masur H. Drug therapy: prophylaxis against opportunistic infections in patients with human immunodeficiency virus infection. **New Engl J Med** 2000;342:1416-1429.
66. Carr A, Tindall B, Brew BJ, Marriot DJ, Harkness JL, Penny R, et al. Low-dose trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis for toxoplasmic encephalitis in patients with AIDS. **Ann Intern Med** 1992;117:106-111.



67. Hardy WD, Feinberg J, Finkelstein DM, Power ME, He W, Kaczka C, et al. A controlled trial of trimethoprim-sulfamethoxazole or aerosolized pentamidine for secondary prophylaxis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. AIDS Clinical Trials Group Protocol 021. **N Engl J Med** 1992;327:1842-1848.
68. Walzer PD, Foy J, Steele P, Kim CK, White M, Klein RS, et al. Activities of antifolate, antiviral, and other drugs in an immunosuppressed rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. **Antimicrob Agents Chemother** 1992;36:1935-1942.
69. Bozzette SA, Finkelstein DM, Spector SA, Frame P, Powderly WG, He W, et al. A randomized trial of three antipneumocystis agents in patients with advanced human immunodeficiency virus infection. **N Engl J Med** 1995;332:693-699.
70. Fischl MA, Dickinson GM, La Voie L. Safety and efficacy of sulfamethoxazole and trimethoprim chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS. **JAMA** 1998;259:1185-1189.
71. Para MF, Finkelstein D, Becker S, Dohn M, Walawander A, Black JR. Reduced toxicity with gradual initiation of trimethoprim-sulfamethoxazole as primary prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia: AIDS Clinical Trials Group 268. **J Acquir Immune Defic Syndr** 2000;24:337-343.
72. Ioannidis JP, Cappelleri JC, Skolnik PR, Lau J, Sacks HS. A meta-analysis of the relative efficacy and toxicity of *Pneumocystis carinii* prophylactic regimens. **Arch Intern Med** 1996;156:177-188.
73. Furrer H, Egger M, Opravil M, Bernasconi E, Hirschel B, Battegay M, et al. Discontinuation of primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected adults treated with combination antiretroviral therapy. **N Engl J Med** 1999;340:1301-1306.

74. Ledergerber B, Mocroft A, Reiss P, Furrer H, Kirk O, Bickel M. Discontinuation of secondary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection who have a response to antiretroviral therapy. **N Engl J Med** 2001;344:168-174.
75. de Quiros JC, Miro JM, Pena JM, Podzamczar D, Alberdi JC, Martinez E, et al. A randomized trial of the discontinuation of primary and secondary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia after highly active antiretroviral therapy in patients with HIV infection. **N Engl J Med** 2001;344:159-167.
76. McNaghten AD, Hanson DL, Jones JL, Dworkin MS, Ward JW and the Adult / Adolescent Spectrum of Disease Group. Effect of antiretroviral therapy and opportunistic illness primary chemoprophylaxis on survival after AIDS diagnosis. **AIDS** 1999;13:1687-1695.
77. Ledergerber B, Egger M, Opravil MR, Telenti A, Hirschel B, Battegay W, et al. Clinical progression and virological failure on highly active antiretroviral therapy in HIV-1 patients: a prospective cohort study. **Lancet** 1999;353:863-869.
78. Sköld O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates** 2000;3:155-160.
79. Volpe F, Ballantine SP, Delves C. The multifunctional folic acid synthesis *fas* gene of *Pneumocystis carinii* encodes dihydroneopterin aldolase, hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase and dihydropteroate synthase. **Eur J Biochem** 1993;216:449-458.
80. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. **J Infect Dis** 1997;175:482-485.
81. Demanche C, Guillot J, Berthelemy M, Petit T, Roux P, Wakefield AE. Absence of mutations associated with sulfa resistance in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene from non-human primates. **Med Microbiology** 2002;40:315-318.

82. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, et al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. **AIDS** **1998**;12:873-878.
83. 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**; 182:551-557.
84. Dallas WS, Gowen JE, Ray PH, Cox MJ, Dev IK. Cloning, sequencing and enhanced expression of the dihydropteroate synthase gene of *Escherichia coli* MC4100. **J Bacteriol** **1992**;174:5961-5970.
85. Brooks DR, Wang P, Read M, Watkins WM, Sims PF, Hyde JE. Sequence variation of the hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulfadoxine. **Eur J Biochem** **1994**;224:397-405.
86. Kai M, Matsuoka M, Nakata N, Maeda S, Gidoh M, Maeda Y, et al. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. **FEMS Microbiol Lett** **1999**;177:231-235.
87. Lopez P, Espinosa M, Greenberg B, Lacks SA. Sulfonamide resistance in *Streptococcus pneumoniae*: DNA sequence of the gene encoding dihydropteroate synthase and characterization of the enzyme. **J Bacteriol** **1987**;169:4320-4326.
88. Nzila AM, Mberu EK, Sulo J, Dayo H, Winstanley PA, Sibley CH, et al. Towards an understanding of the mechanism of pyrimethamine-sulfadoxine resistance in *Plasmodium falciparum* : genotyping of dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase of kenian parasites. **Antimicrob Agents Chemother** **2000**;44:991-996.

89. 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;182:1192-1198.
90. Huang L, Friedly J, Morris AM, Carter JL, Turner JR, Merrifield C, et al. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase genotypes in HIV-infected persons residing in San Francisco: possible implications for disease transmission. **J Eukaryot Microbiol** 2001;Suppl:137S-138S.
91. Ma L, Borio L, Masur H, Kovacs JA. *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. **J Infect Dis** 1999;180:1969-1978.
92. Takahashi T, Endo T, Nakamura T, Sakashita H, Kimura K, Ohnishi K, et al. Dihydrofolate reductase gene polymorphisms in *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* in Japan. **J Med Microbiol** 2002;51:510-515.
93. Nahimana A, Rabodonirina M, Bille J, Francioli P, Hauser P. Mutations of *Pneumocystis jiroveci* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. **Antimicrob Agents Chemother** 2004; 48:4301-4305.
94. Robberts FJ, Chalkley LJ, Weyer K, Goussard P, Liebowitz LD. Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jiroveci* from South Africa. **J Clin Microbiol** 2005;43:1443-1444.
95. Ma L, Kovacs JA. Genetic analysis of multiple loci suggests that mutations in the *Pneumocystis carinii f. sp. hominis* dihydropteroate synthase gene arose independently in multiple strains. **Antimicrob Agents Chemother** 2001;45:3213-3215.
96. Crothers K, Huang L, Morris A, Fox M, Groner G, Turner J, et al. *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutations in patients with *Pneumocystis* pneumonia who are newly diagnosed with HIV infection. **J Eukaryot Microbiol** 2003;50:609S-610S.

97. 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**;354:1347-1351.
98. Visconti E, Ortona E, Margutti P, Marinaci S, Zolfo M, Mencarini P, et al. Identification of dihydropteroate (DHPS) gene mutant in *Pneumocystis carinii* in respiratory samples of HIV+ patients from 1992-1997. **J Eukaryot Microbiol** **1999**;46:132S.
99. Ma L, Kovacs JA, Cargnel A, Valerio A, Fantoni G, Atzori C. Mutations in the dihydropteroate synthase gene of human-derived *Pneumocystis carinii* isolates from Italy are infrequent but correlate with prior sulfa prophylaxis. **J Infect Dis** **2002**;185:1530-1532.
100. Zingale A, Carrera P, Lazzarin A, Scarpellini P. Detection of *Pneumocystis carinii* and characterization of mutations associated with sulfa resistance in bronchoalveolar lavage samples from human immunodeficiency virus-infected subjects. **J Clin Microbiol** **2003**;41:2709-2712.
101. Costa MC, Helweg-Larsen J, Lundgren B, Antunes F, Matos O. Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jiroveci* from Portuguese patients with *Pneumocystis* pneumonia. **Int J Antimicrob Ag** **2003**;22:516-520.
102. Nahimana A, Rabodonirina M, Zanetti G, Meneau I, Francioli P, Bille J, et al. Association between a specific *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase mutation and failure of pyrimethamine/sulfadoxine prophylaxis in human immunodeficiency virus-positive and negative patients. **J Infect Dis** **2003**;188:1017-1023.
103. 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 sulfonamide therapy. **J Clin Microbiol** **2000**;38:3161-3164.

104. Navin TR, Beard CB, Huang L, del Rio C, Lee S, Pieniazek NJ, 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.
105. Iliades P, Meshnick SR, Macreadie IG. Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* DHPS gene confer cross-resistance to sulfa drugs. **Antimicrob Ag Chemother** **2005**;49:741-748.
106. Miller RF, Lindley AR, Ambrose HE, Malin AS, Wakefield AE. Genotypes of *Pneumocystis jirovecii* isolates obtained in Harare , Zimbabwe, and London, United Kingdom. **Antimicrob Agents Chemother** **2003**;47:3979-3981.
107. Kazanjian PH, Fisk D, Armstrong W, Shulin Q, Liwei H, Zhang Ke, et al. Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* pneumonia, in the United States and China. **J Infect Dis** **2004**;189:1684-1687.
108. Zar HJ, Alvarez-Martinez MJ, Harrison A, Meshnick SR. Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. **Clin Infect Dis** **2004**;39:1047-1051.

## **2- OBJETIVO**

O objetivo deste estudo foi determinar a prevalência das mutações no gene da enzima Dihidropteroato sintetase do *Pneumocystis jirovecii* associadas ao uso da profilaxia com sulfa, em pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida que apresentaram a pneumonia por este fungo, entre agosto de 1997 e março de 2004, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

### 3- ARTIGO

Artigo submetido à publicação no *The Journal of Eukaryotic Microbiology*

#### Running head:

WISSMANN-NETO ET AL. - - - ABSENCE OF *PNEUMOCYSTIS JIROVECII* MUTATIONS  
IN BRAZIL

#### Title:

Absence of Dihydropteroate Synthase Mutations in *Pneumocystis jirovecii* from Brazilian  
AIDS Patients

GUSTAVO WISSMANN-NETO,<sup>a</sup> MÍRIAM J. ALVAREZ-MARTINEZ,<sup>b</sup> STEVEN R.  
MESHNICK,<sup>b</sup> ADA R. S. DIHEL,<sup>c</sup> and JOÃO C. PROLLA<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> MSc/PhD Pneumology Program, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio  
Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil,

<sup>b</sup> Department of Epidemiology, University of North Carolina, Chapel Hill, USA,

<sup>c</sup> Cytology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul,  
Porto Alegre, Brazil.

Corresponding author: G. Wissmann-Neto - - - Address: Rua Cícero Ahrends 191/401, 90150-060,  
Porto Alegre, RS, Brazil. Telephone number: 55-51-32352382; FAX number: 55-51-33309700;  
email: gwissmann@uol.com.br



ABSTRACT. Several studies from developed countries have documented the association between trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis failure and mutations in the *Pneumocystis jirovecii* gene coding for dihydropteroate synthase (DHPS). We obtained clinical informations for 70 patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia seen in Porto Alegre, Brazil, from 1997 to 2004. DNA was extracted from Giemsa-stained smears, and PCR-amplified with sequencing of the DHPS locus. Successful amplification was obtained in 57 of 70 cases (81,4%), including five cases (8.7%) who had used sulfa prophylaxis. No DHPS gene mutations were seen. These results suggest that DHPS mutations are currently as rare in Brazil as in other developing countries.

**Key words.** sulfa prophylaxis, AIDS-associated disorders, *Pneumocystis jirovecii*, Brazil.

*Pneumocystis jirovecii* pneumonia is still an important cause of morbidity and mortality in patients with AIDS, despite widespread use of potent antiretroviral therapy in developed countries (9).

In developing countries the occurrence of *Pneumocystis* pneumonia (PCP) in AIDS patients is object of increasing concern and attention (1). In Brazil, AIDS is a significant public health problem, with 362,364 cases having been reported, as of June 2004, with an estimated total of over 600,000 HIV-infected adult individuals at that time (National Program of AIDS / Brazil 2005).

A significant decrease in AIDS-related mortality in Brazil has been observed, since the widespread free distribution of highly active antiretroviral therapy. However, PCP is still frequently seen in AIDS patients, being the second most common pulmonary infection at the moment of AIDS diagnosis, tuberculosis being the first (7).

Trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) is the primary agent of choice for prophylaxis of PCP (4). Several studies from developed countries, have documented the association between TMP-SMX prophylaxis failure and the occurrence of mutations in the *P. jirovecii* gene coding for dihydropteroate synthase (DHPS), especially at the codons 55 and 57, both as single mutations or combined, as reviewed by Huang et al (3). The baseline prevalence of these mutations in developed countries is high, while it is low in developing countries such as China, Zimbabwe and South Africa (5,8,10,12).

The aim of this study was to determine the prevalence of DHPS gene mutations in bronchoalveolar isolates from AIDS patients hospitalised with PCP in Porto Alegre, Brazil. This is the first study of *P. jirovecii* DHPS mutations in South America.

## MATERIALS AND METHODS

The study was performed in 70 bronchoalveolar lavage (BAL) isolates positive for the presence of *Pneumocystis jirovecii* in the cytological examination, by Giemsa staining and confirmed by silver Grocott staining method, from patients with AIDS and PCP seen at the Hospital de Clinicas de Porto Alegre, Brazil from August 1997 to March 2004.

The BAL was done routinely in all patients with clinical suspicion of PCP, and the cytological exam was done following the routine of the cytology unit, according to the method previously described (11).

The patient's data were obtained retrospectively, by review of the hospital charts and records. Sulfa prophylaxis was considered present when TMP-SMX was administered prophylactically at any time in the 3-month period antecedent to the PCP episode. Treatment response was considered: a) PCP recovery, when the patient had a favourable response in the 21 days following start of therapy, as judged by the clinician in charge; b) PCP related death, when it occurred in the 28 days following start of therapy, and so judged by the clinician in charge, or established by autopsy.

An additional set of 20 HIV-positive patients who had pulmonary infiltrates in their chest radiographs, and negative cytological examination for *Pneumocystis jirovecii*, were also included in the study.

DNA was extracted from the Giemsa stained slides by the method of Lee et al (6). The touchdown nested PCR for the *P.jirovecii* DHPS locus and the sequencing analysis were performed as described elsewhere (12). This study was approved by Institutional Review Boards (ethical committees) at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil, and the University of North Carolina, USA.

## RESULTS AND DISCUSSION

DHPS was PCR-amplified successfully in samples from 57 of 70 patients (81.4%). The characteristics of these 57 patients are listed in the Table 1. They were predominantly male (64,9%), with an average age of  $37.1 \pm 9.6$  SD years. The average values of PO<sub>2</sub> and LDH at admission were respectively  $64.0 \text{ mmHg} \pm 11.9$  SD, with a range of 38.0 to 96.1 mmHg, and  $721.5 \text{ U/L} \pm 400.1$  SD, with a range of 220 to 1,841 U/L.

Only five patients (8.8%) used TMP-SMX prophylaxis in the preceding 3 months, and 9 patients (15.8%) used antiretroviral therapy. Four patients (7%) had previous episodes of PCP, and none was exposed to sulfa drugs for treatment of previous toxoplasmosis infection. For twenty-four patients (42.1%), the PCP episode was the AIDS-defining illness.

PCP was treated with TMP-SMX in 55 patients (96.5%), 6 of whom were switched to alternative agents due to adverse effects. The adjuvant use of corticosteroids occurred in 75.4% of the patients. Fifty-two patients (91.2%) had a good response to treatment. Deaths due to PCP were registered in 5 patients (8.8%), but none of these patients were autopsied.

The characteristics of the 13 patients from which clinical samples did not amplify were not significantly different from the data of the 57 patients with positive PCR-amplification (data not shown).

No codon 55 or 57 mutations in the DHPS gene were seen in the sequenced amplicons. All had the wild-type genotype, with the nucleotide sequence ACACGGCCT in codons 55, 56, and 57 respectively, corresponding to threonine and proline at the positions 55 and 57.

All 20 HIV-positive who had pulmonary infiltrates in their chest radiographs, and negative cytological examination for *Pneumocystis jirovecii*, were also PCR-negative for the microorganism.

Several studies from developed countries have documented the association between TMP-SMX prophylaxis failure and the increasing prevalence of mutations in the *P. jirovecii* gene coding for DHPS. However, there is a controversy whether DHPS mutations are associated with PCP therapeutic failures (3). It is feared the development of resistance to treatment may develop in the future, if new mutations, in addition to the ones previously described, should occur in the *P. jirovecii* genome (5).

In developed countries, as many as 80% of patients exposed to the prophylaxis with sulfonamides have been found to have mutant *P. jirovecii* DHPS genes (2). This is in contrast with the situation in developing countries, where the prevalence of mutations is much lower. In South Africa, Zar et al. reported in 2004, only four instances of mutant genotypes, and only one with the double mutation, alanine 55/serine 57, in a series of 30 pediatric cases (12). Another study, from the same country, reported only one instance of mutant DHPS genotype in 53 samples (10). In China, between 1998 and 2001, only one case of mutation was reported in a series of 15 adult patients with PCP (5). In Zimbabwe, only one case of mutation was reported in 2003 from 14 adult patients with PCP (8).

In conclusion, we observed the absence of mutations in the DHPS gene of *Pneumocystis jirovecii* in the clinical material from 57 Brazilian patients seen for PCP episodes in Brazil from 1997 to 2004. These results are similar to the ones reported from other developing countries, showing a low prevalence of mutations in the DHPS gene. As PCP is still an important infection in patients with AIDS in Brazil, and sulfa is the agent of choice for its treatment and prophylaxis, it is interesting to monitor the possible development of DHPS mutations, related to resistance to sulfa in *Pneumocystis jirovecii*.

## LITERATURE CITED

1. Fisk, D., Meshnick, S. & Kazanjian, P. 2003. *Pneumocystis carinii* in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis.*, **36**:70--8.
2. Huang, L., Beard, C.B., Creasman, J., Levy, D., Duchin, J.S., Lee, S., Pieniazek, N., Carter, J.L., del Rio, C., Rimland, D. & Navin, T.R. 2000. Sulfa or sulfone prophylaxis and geographic region predict mutations in the *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene. *J Infect Dis.*, **182**:1192--8.
3. Huang, L., Crothers, K., Atzori, C., Benfield, T., Miller, R., Rabodonirina, M. & Helweg-Larsen, J. 2004. Dihydropteroate synthase gene mutations in *Pneumocystis* and sulfa resistance. *Emerg Infect Dis.*, **10**:1721--8.
3. Kaplan, J.E., Masur, H. & Holmes, K.K. 2002. Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons. *MMWR*, **51** No RR-8:4--5.
4. Kazanjian, P.H., Fisk, D., Armstrong, W., Shulin, Q., Liwei, H., Ke, Z. & Meshnick, S.R. 2004. Increase in prevalence of *Pneumocystis carinii* mutations in patients with AIDS and *P. carinii* pneumonia, in the United States and China. *J Infect Dis.* **189**:1684--7.
5. Lee, C.H., Wang, J., Durkin, M.M., Brady, S.L., Bartlett, M.S., Smith, J.W. 1994. Amplification of *Pneumocystis carinii* DNA on specimens scraped from slides. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **18**:197--9.
6. Marins, J.R., Jamal, L.F., Chen, S.Y., Barros, M.B., Hudes, E.S., Barbosa, A.A, Chequer, P., Teixeira P.R. & Hearst, N. 2003. Dramatic improvement in survival among adult Brazilian AIDS patients. *AIDS.* **17**:1675-82.

7. Miller, R.F., Lindley, A.R., Ambrose, H.E., Mali, A.S., Wakefield, A.E. 2003. Genotypes of *Pneumocystis jiroveci* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**:3979--81.
9. Morris, A., Lundgren, J.D., Masur, H., Walzer, P.D., Hanson, D.L., Frederick, T., Huang, L., Beard, C.B. & Kaplan, J.E. 2004. Current epidemiology of *Pneumocystis pneumonia*. *Emerg Infect Dis.* **10**:1713--20.
10. Robberts, F.J., Chalkley, L.J., Weyer, K., Goussard, P., Liebowitz, L.D. 2005. Dihydropteroate synthase and novel dihydrofolate reductase gene mutations in strains of *Pneumocystis jiroveci* from South Africa. *J Clin Microbiol.* **43**:1443--4.
11. Tregnago, R., Xavier, R.G., Pereira, R.P., Prolla, J.C. 1993. The diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by cytologic evaluation of Papanicolaou and Leishman-stained bronchoalveolar specimens in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Cytopathology.* **4**:77--84.
12. Zar, H.J., Alvarez-Martinez, M.J., Harrison, A., Meshnick, S.R. 2004. Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. *Clin Infect Dis.* **39**:1047--51.

Table 1. Characteristics of the 57 cases with positive PCR / DHPS amplification

Characteristic	
Age, mean years $\pm$ SD (range)	37.1 $\pm$ 9.6 (23-67)
Male sex, no. (%)	37 (64,9%)
Partial pressure of arterial oxygen, mean mmHg $\pm$ SD (range)	64.0 $\pm$ 11.9 (38.0-96.1)
Lactate dehydrogenase, mean U/L $\pm$ SD (range)	721.5 $\pm$ 400.1 (220-1841)
Trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis, no. (%)	5 (8.8%)
Antiretroviral therapy, no. (%)	9 (15.8%)
Previous <i>Pneumocystis jirovecii</i> pneumonia, no. (%)	4 (7.0%)
Previous Toxoplasmosis, no. (%)	0 (0%)
Diagnosis of HIV at the moment of the <i>P. jirovecii</i> pneumonia	24 (42.1%)
Trimethoprim-sulfamethoxazole treatment, no. (%)	55 (96.5%)
Treatment changed due adverse effects, no. (%)	6 (10.5%)
Adjuvant corticosteroid therapy, no. (%)	43 (75.4%)
Deaths due to <i>P. jirovecii</i> pneumonia, no. (%)	5 (8.8%)



## **ACKNOWLEDGMENTS**

Gustavo Wissmann was supported by the Pneumology Postgraduation funding of the Federal University of Rio Grande do Sul, 2005. Míriam J. Alvarez Martinez was supported by the NIH grant 1 RO AI 46966.

#### 4- DISCUSSÃO FINAL

No presente estudo, foram avaliados 70 casos que apresentaram a PCP no Hospital de Clínicas de Porto Alegre de agosto de 1997 a março de 2004 e cujas lâminas de lavado broncoalveolar puderam ser localizadas para análise.

Obtivemos a amplificação e o seqüenciamento do gene da Diidropteroato sintetase a partir da extração do DNA do *P. jirovecii* de lâminas coradas pelo método citológico de Giemsa. A extração do DNA, a Reação em Cadeia pela Polimerase e a análise do seqüenciamento do DNA estão detalhadas no Anexo 1.

A amplificação foi positiva em 57 dos 70 casos estudados (81,4%). Esta taxa de amplificação a partir da extração do DNA de lâminas de Giemsa mostra a grande utilidade que essas lâminas podem ter para a realização de estudos moleculares sobre o *P. jirovecii*.

Os dados demográficos e clínicos dos 57 casos cuja amplificação foi positiva e dos 13 nos quais não ocorreu a amplificação estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, no Anexo 2. Não houve diferença significativa entre as características dos dois grupos de pacientes, como demonstrado na análise estatística descrita no Anexo 3. Não encontramos, portanto, entre os dados coletados, nenhum achado clínico ou demográfico que pudesse ter interferido nos resultados da amplificação do DNA.

Os estudos publicados em outros três países em desenvolvimento (África do Sul, Zimbábwe e China) mostraram uma baixa prevalência das mutações na Diidropteroato sintetase do *P. jirovecii* nessas regiões.

De maneira similar, não observamos a presença de mutações na Diidropteroato sintetase nos 57 casos amplificados neste estudo. Este resultado parece indicar que, no nosso meio, ocorreu uma menor pressão seletiva da sulfa sobre o *P. jirovecii*, em comparação com os países desenvolvidos,

nos quais a prevalência das mutações é alta. Na série de casos que obtivemos, entre os 70 pacientes com PCP cujos dados clínicos foram coletados, somente 6 pacientes estavam em uso da profilaxia com sulfa.

A pneumonia pelo *Pneumocystis jirovecii* ainda é uma causa importante de morbidade e mortalidade entre os pacientes com a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida e o agente sulfametoxazol-trimetoprim é o mais utilizado no Brasil para o tratamento dessa infecção. No nosso estudo, de um total de 70 casos de PCP, 68 (97,1%) foram inicialmente tratados com o SMX-TMP.

Parece-nos importante que seja monitorada, no Brasil, em virtude da importância do SMX-TMP no manejo dos pacientes com AIDS, a ocorrência das mutações na Diidropteroato sintetase do *P. jirovecii* que estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência antimicrobiana do patógeno às sulfas.

## 5- CONCLUSÕES

Não observamos mutações nos códons 55 e 57 do gene que codifica a enzima Dihidropteroato sintetase (DHPS) do *Pneumocystis jirovecii* nos espécimes clínicos (lâminas de lavado broncoalveolar coradas pelo método de Giemsa) de 57 pacientes que apresentaram a PCP entre agosto de 1997 e abril de 2004 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Todos os 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.

## 6- PERSPECTIVAS FUTURAS

Desde 1997, vêm sendo conduzidos estudos nos países desenvolvidos para avaliar a presença das mutações na Dihidropteroato sintetase do *Pneumocystis jirovecii*. Os resultados mostraram evidências da associação entre o uso da profilaxia com sulfa e a presença das mutações.

É também possível que, além das mutações referidas nos códons 55 e 57 da enzima, outras mutações possam surgir na Dihidropteroato sintetase, no processo do desenvolvimento de resistência antimicrobiana mencionado.

As mutações na DHPS do *P. jirovecii* têm sido recentemente estudadas nos países em desenvolvimento, como demonstrado nas publicações do Prof. Steven Meshnick, da Universidade da Carolina do Norte, que colaborou com os estudos realizados na África do Sul e China.

Temos o projeto de, juntamente com a equipe do Prof. Meshnick, seguir nessa linha de estudo no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, vinculados à Pós-graduação em Pneumologia – UFRGS. Primeiramente, deverá ser feita a análise dos casos recentes de PCP, ocorridos em 2004 e 2005, quanto à presença das mutações nos códons 55 e 57 da Dihidropteroato sintetase, utilizando a mesma metodologia descrita. A seguir, parece-nos apropriado conduzir um estudo prospectivo para mostrar a presença dessas e de outras possíveis mutações na DHPS e a evolução clínica dos pacientes com a pneumonia pelo *P. jirovecii* tratados no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

## 7.1- ANEXO 1

### **Extração do DNA:**

Primeiramente, o meio de montagem residual foi removido pela lavagem das lâminas em xileno, etanol absoluto e etanol a 70%, por 5 minutos em cada, sucessivamente. A seguir, para remover a coloração de Giemsa, as lâminas foram embebidas em metanol absoluto por 10 minutos e após secas ao ar.

O material de cada lâmina foi então raspado com um bisturi e misturado com 50µl de água destilada na própria lâmina. Um disco de filtro de fibra de vidro foi colocado na extremidade da lâmina para a transferência do material diluído para o filtro. A seguir, o filtro foi ainda pressionado sobre a lâmina para absorver qualquer amostra residual.

Cada filtro foi então embebido num tubo Eppendorf contendo 100µl de metanol por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a retirada do metanol, os tubos foram levados à temperatura de 80°C por 15 minutos para promover a secagem do filtro.

Foram adicionados aos tubos 100µl da solução-tampão (50 mM KCl; 15 mM Tris-HCL; pH-8,3; 0,5% NP-40) e 500 µl de proteinase K e o material foi levado à incubação à 55°C por 45 minutos. Após, a proteinase K foi inativada pela agitação do tubo num recipiente com água por 10 minutos. Ao final, foi feita a centrifugação por 10 segundos para precipitação do filtro e de restos de tecidos, e 5 µl do sobrenadante de cada amostra foi utilizado para a Reação em Cadeia pela Polimerase (1).

### **Reação em Cadeia pela Polimerase e Seqüenciamento do DNA:**

O locus da Diidropteroato sintetase (DHPS) foi amplificado por uma “Nested PCR” (2,3) num termociclador programável PTC-200.

Duas diferentes polimerases, a Taq DNA Polimerase Recombinante (Invitrogen) e a Hot StarTaq DNA Polimerase (Qiagen, Valencia, California, USA) foram usadas, e não houve diferença entre ambas. Os mesmos oligonucleotídeos iniciadores, mas diferentes programas no termociclador, foram utilizados para cada polimerase.

Na primeira amplificação da PCR, os oligonucleotídeos F1 e B45 foram usados; na segunda amplificação, os oligonucleotídeos utilizados foram A hum e BN (4).

A mistura da PCR continha: DNA extraído (5 $\mu$ l); oligonucleotídeos iniciadores (0,4 $\mu$ M cada); mistura equimolar dos nucleotídeos trifosfatados – “dNTPs” (0,2mM); 2,5U de polimerase; solução-tampão (cada polimerase com sua própria solução-tampão) e água até um volume total de 100 $\mu$ l. MgCl<sub>2</sub> (2mM) foi usado com a Taq DNA Polimerase Recombinante, mas não com a Hot Star Taq DNA Polimerase.

Controles positivos (DNA extraído do *P. jirovecii*, com sequência conhecida) e controles negativos (água livre de RNA) foram incluídos com cada grupo de amostras levadas à PCR.

As condições para a primeira amplificação da PCR foram: 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 92°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos e uma etapa final de 72°C por 5 minutos.

As condições para a segunda amplificação da PCR foram: 94°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 92°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 60 segundos e uma etapa final de 72°C por 5 minutos. Quando a Hot Star Taq Polimerase foi utilizada, a fase inicial foi de 95°C por 15 minutos ao invés de 94°C por 5 minutos.

Para análise dos fragmentos gerados pela PCR, 8 $\mu$ l de cada 100 $\mu$ l do produto amplificado foi colocado em gel de agarose a 2%, submetido à eletroforese e visualizado com brometo de etídio.

As amplificações foram consideradas positivas quando foi visualizada claramente uma banda de 335 pares de base no gel de agarose. As bandas foram extraídas do gel usando o “QIAquick Kit”,

e levadas para a realização do sequenciamento automatizado através do “ABI Prism BigDye terminator cycle sequencing ready reaction Kit” (Applied Biosystems) no Núcleo de Sequenciamento Genético da Universidade da Carolina do Norte, Chapel Hill, EUA.

As seqüências obtidas foram analisadas usando Chromas 2.23 (Techelysium Pty. Ltd), ClustalX 1.8 e Gene-Doc (alinhamento de seqüências múltiplas) e comparadas às seqüências conhecidas do gene da Diidropteroato sintetase do *P. jirovecii* (U 66282.1 no “Pubmed Nucleotide database”).

#### **Referências bibliográficas:**

1. Lee CH, Wang J, Durkin MM, Brady SL, Bartlett MS, Smith JW. Amplification of *Pneumocystis carinii* DNA on specimens scraped from slides. **Diagn Microbiol Infect Dis** **1994**;18:197-199.
2. Lane BR, Ast JC, Hossler PA, Mindell DP, Bartlett MS, Smith JW, et al. Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. **J Infect Dis** **1997**;175:482-485.
3. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane B, Bartlett MS, Smith JW, et al. Pneumocystis carinii mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. **AIDS** **1998**;12:873-878.
4. Zar HJ, Alvarez-Martinez MJ, Harrison A, Meshnick SR. Prevalence of dihydropteroate synthase mutants in HIV-infected South African children with *Pneumocystis jiroveci* pneumonia. **Clin Infect Dis** **2004**;39:1047-1051.



## 7.2- ANEXO 2

### Tabelas 1 e 2: Dados demográficos e clínicos

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos 57 casos com amplificação positiva à Reação em Cadeia pela Polimerase / Diidropteroato sintetase (PCR/DHPS).

Caso	LBA <sup>a</sup>	Diagnóstico do HIV <sup>b</sup>	Idade	Sexo	PO2 <sup>c</sup>	LDH <sup>d</sup>	ARV <sup>e</sup>	PCP <sup>f</sup> Prévia	Profilaxia	Tratamento	R / O <sup>g</sup>
1.	1997	1996	35	M	71,8	456	-	-	-	clindamicina	R
2.	1997	1997 <sup>h</sup>	26	M	58,0	1357	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
3.	1997	1988	33	M	91,0	591	+	-	-	SMX/TMP	R
4.	1997	1996	32	M	78,5	393	+	-	SMX/TMP <sup>i</sup> 960mg/dia 1 mês	SMX/TMP	R
5.	1997	1994	31	M	57,0	1020	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
6.	1998	1998 <sup>h</sup>	58	F	76,0	408	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
7.	1998	1998 <sup>h</sup>	44	F	75,0	503	-	-	-	SMX/TMP	R
8.	1998	1998	40	F	76,4	347	-	-	-	SMX/TMP	R
9.	1998	1998	45	M	87,0	405	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup> pentamidina <sup>k</sup>	R
10.	1998	1998 <sup>h</sup>	34	F	66,3	520	-	-	-	SMX/TMP	R
11.	1998	1998	40	M	55,6	1841	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
12.	1999	1999 <sup>h</sup>	34	F	85,4	959	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
13.	1999	1999 <sup>h</sup>	40	M	56,2	1741	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup> clindamicina- primaquina <sup>k</sup>	O
14.	1999	1998	35	F	67,8	644	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R

15.	1999	1999 <sup>h</sup>	44	M	54,1	1653	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	O
16.	1999	1993	29	M	45,4	304	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
17.	1999	1988	37	M	72,8	397	-	-	SMX/TMP 960mg/dia 14 meses	SMX/TMP	R
18.	2000	2000 <sup>h</sup>	27	M	63,0	955	+	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
19.	2000	2000	28	F	58,4	850	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
20.	2000	1998	42	M	72,3	924	-	-	SMX/TMP 960mg/dia 6 meses	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
21.	2001	2001	23	F	73,2	689	-	-	-	SMX/TMP	R
22.	2001	2000	24	M	81,3	469	-	-	-	SMX/TMP	R
23.	2001	2001 <sup>h</sup>	48	F	69,4	880	-	-	-	SMX/TMP	R
24.	2002	2002 <sup>h</sup>	48	M	44,0	1001	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
25.	2002	2002 <sup>h</sup>	28	M	61,0	693	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
26.	2002	2002 <sup>h</sup>	34	M	69,7	570	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
27.	2002	2002 <sup>h</sup>	30	M	48,2	1157	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
28.	2002	1999	49	F	62,2	585	+	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
29.	2002	2002 <sup>h</sup>	47	F	57,4	1410	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup> clindamicina- primaquina <sup>k</sup>	O
30.	2002	2002 <sup>h</sup>	42	F	48,5	910	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
31.	2002	2001	23	F	70,6	604	-	-	-	SMX/TMP	R
32.	2002	2002	39	F	60,7	1520	+	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
33.	2002	1992	31	M	66,2	1560	+	+	SMX/TMP 480mg/dia 2 meses	SMX/TMP <sup>j</sup>	O

34.	2002	1997	29	M	52,6	623	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
35.	2003	2002	52	M	48,0	735	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
36.	2003	1996	28	M	63,9	915	+	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
37.	2003	2003 <sup>h</sup>	39	M	58,0	788	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
38.	2003	2003 <sup>h</sup>	29	M	50,0	653	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
39.	2003	2003 <sup>h</sup>	25	M	58,3	510	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
40.	2003	2003	23	M	74,6	220	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
41.	2003	2002	39	M	61,8	427	-	+	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
42.	2003	2002	26	M	67,0	346	+	+	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
43.	2003	1994	44	F	77,9	521	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup> clindamicina- primaquina <sup>k</sup>	R
44.	2003	1997	33	M	75,8	204	+	-	SMX/TMP 960mg 3x /semana 3 meses	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
45.	2003	1993	33	F	63,7	586	-	-	-	clindamicina- primaquina <sup>j</sup>	R
46.	2003	2003	49	F	52,0	1013	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	O
47.	2003	2003 <sup>h</sup>	38	F	96,1	624	-	-	-	SMX/TMP	R
48.	2003	2003	57	M	56,0	457	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
49.	2003	2003 <sup>h</sup>	31	M	44,2	605	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup> pentamidina clindamicina- primaquina <sup>k</sup>	R
50.	2003	2001	52	M	52,1	341	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
51.	2003	2003 <sup>h</sup>	38	M	64,0	464	-	-	-	SMX/TMP	R

52.	2003	2003 <sup>h</sup>	43	M	58,5	434	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
53.	2004	2004 <sup>h</sup>	67	M	57,2	279	-	-	-	SMX/TMP	R
54.	2004	2002	33	M	66,8	148	-	+	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
55.	2004	1994	36	M	59,9	795	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup> clindamicina- primaquina pentamidina <sup>k</sup>	R
56.	2004	2004 <sup>h</sup>	40	F	53,0	497	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
57.	2004	2002	33	F	56,2	622	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R

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

Tabela 2. Dados demográficos e clínicos dos 13 casos que não apresentaram amplificação à Reação em Cadeia pela Polimerase / Diidropteroato sintetase (PCR/DHPS).

Caso	LBA <sup>a</sup>	Diagnóstico do HIV <sup>b</sup>	Idade	Sexo	PO2 <sup>c</sup>	LDH <sup>d</sup>	ARV <sup>e</sup>	PCP <sup>f</sup> Prévia	Profilaxia	Tratamento	R / O <sup>g</sup>
1.	1997	1993	33	M	54,0	514	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
2.	1998	1998 <sup>h</sup>	35	M	70,5	410	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
3.	1998	1998	34	M	76,5	564	-	-	-	SMX/TMP	R
4.	1999	1999	48	M	53,0	734	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
5.	1999	1999	26	M	60,0	530	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
6.	2000	2000 <sup>h</sup>	48	F	74,0	380	-	-	-	SMT/TMP	R
7.	2002	2002	39	M	55,8	1032	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
8.	2002	2002	24	M	47,9	918	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	O
9.	2003	2003 <sup>h</sup>	54	F	55,0	678	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
10.	2003	2002	33	M	72,8	355	-	-	-	SMX/TMP	R
11.	2003	2003 <sup>h</sup>	26	F	61,8	427	-	-	-	SMX/TMP	R
12.	2003	1999	37	M	50,0	654	+	+	SMX/TMP <sup>i</sup> 960mg/dia 2 meses	SMX/TMP <sup>j</sup>	R
13.	2003	2003 <sup>h</sup>	60	F	51,8	1749	-	-	-	SMX/TMP <sup>j</sup> clindamicina- primaquina <sup>k</sup>	R

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

### 7.3 - ANEXO 3

#### **Análise estatística:**

Os dados demográficos e clínicos dos casos nos quais a Reação em Cadeia pela Polimerase para o locus da Diidropteroato sintetase (PCR/DHPS) foi positiva (tabela 1) foram comparados com os dados dos casos nos quais a PCR/DHPS não apresentou amplificação (tabela 2).

Foram calculadas as médias e os desvios-padrão das variáveis idade, pressão parcial de oxigênio arterial e desidrogenase láctica sérica da tabelas 1, que foram, respectivamente,  $37,14 \pm 9,58$ ,  $64,00 \pm 11,86$  e  $721,45 \pm 400,06$ . As médias e os desvios-padrão das mesmas variáveis da tabela 2 foram, respectivamente,  $38,23 \pm 11,18$ ,  $60,23 \pm 9,94$  e  $688,07 \pm 378,82$ . Foi então utilizado o Teste t de Student para comparação dessas variáveis das tabelas 1 e 2; os valores de p calculados para idade, PO<sub>2</sub> e LHD foram, respectivamente, 0,74, 0,24 e 0,77, o que mostra que não há diferença significativa entre os dados dessas variáveis das tabelas 1 e 2.

Foi utilizado o Teste qui-quadrado, com a correção de Yates, para comparar as demais variáveis coletadas: sexo, diagnóstico do HIV no momento da PCP, uso de antiretrovirais, ocorrência de PCP prévia, uso de profilaxia, tratamento com sulfametoxazol-trimetoprim, substituição do tratamento por efeito adverso, uso de corticóide como terapia adjuvante e resposta ao tratamento). Os valores de p obtidos foram iguais a 1,00 em todas as variáveis citadas, à exceção da variável “uso de antiretrovirais” que teve o p calculado em 0,75. Não foi demonstrada, assim, diferença significativa entre os dados das tabelas 1 e 2.

Não encontramos, portanto, nenhuma associação entre os dados demográficos e clínicos e o resultado da amplificação na PCR/DHPS.