

PRIMEIRA PARTE

Introdução ao estudo de *Pneumocystis jirovecii* e da pneumocistose

1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

Pneumocystis jirovecii (Frenkel, 1976), anteriormente com a designação de *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* (Stringer *et al.*, 2001, 2002), é um eucariota unicelular que causa morbidade e mortalidade significativas em indivíduos seropositivos para o vírus da imunodeficiência humana (VIH) e em doentes com outras imunodeficiências.

A primeira descrição de *Pneumocystis* data de 1909, quando Carlos Chagas, no Brasil, o identificou no pulmão de um cobaio, tendo-o considerado como uma forma do ciclo de vida de *Tripanosoma cruzi*. Um ano depois, Antonio Carini, também no Brasil, identificou-o no pulmão de um rato e enviou algum material biológico para o Instituto Pasteur, em Paris, para aí serem efectuados estudos mais pormenorizados. Em 1912, no Instituto Pasteur, o casal Delanoë isolou as formas quísticas deste microrganismo, tendo concluído que este era distinto de *T. cruzi* e denominou-o de *Pneumocystis carinii*, tendo por base o órgão onde havia sido identificado e o investigador que lhes tinha facultado o material biológico para estudo.

Nas décadas seguintes, foram encontrados vários quistos semelhantes aos identificados pelo casal Delanoë, os quais se encontravam associados a casos de pneumonia, em espécies distintas de mamíferos. Estas formas parasitárias foram todas associadas a *P. carinii*, visto serem morfológicamente idênticas, causarem a mesma doença e não crescerem em cultura (Stringer *et al.*, 1992; Stringer, 1996).

Nos anos 30 e 40, do século passado, na Europa, foram descritos vários casos de pneumonia intersticial em crianças prematuras e subnutridas, sem, no entanto, se ter conseguido isolar o agente responsável pela doença. Somente no ano de 1952, os investigadores Vanek e Jirovec demonstraram a capacidade de *Pneumocystis* de provocar doença no Homem.

Nos anos 70, do século passado, com o aumento do número de casos de doentes portadores de imunodepressão grave, em particular os receptores de órgãos transplantados e os doentes oncológicos sujeitos a quimioterapia e radioterapia, assistiu-se ao reconhecimento de *P. jirovecii* como um microrganismo oportunista para o Homem.

No início dos anos 80, do século passado, com a síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), verificou-se um aumento drástico do número de casos de pneumonia por *P. jirovecii* (PPc), ou pneumocistose, associado à imunodeficiência provocada por VIH. Desde então, a PPc tornou-se a infecção oportunista mais frequente nos doentes com infecção VIH/SIDA.

2. MORFOLOGIA

O ciclo de vida de *Pneumocystis* apresenta três formas de desenvolvimento distintas, todas elas observáveis nos alvéolos pulmonares do hospedeiro:

a) **trofozoíto** – representa a forma vegetativa do microrganismo (figura 1). Pode ser identificada livre, em secreções pulmonares, ligada às células epiteliais do alvéolo pulmonar (pneumócitos do tipo I) ou fagocitada por macrófagos. O trofozoíto jovem apresenta uma forma redonda ou oval, medindo cerca de 2 μm de diâmetro. Provavelmente, é uma célula haplóide resultante de um ciclo de vida assexuado, por divisão binária de uma célula-mãe, mas também pode resultar de um ciclo de vida sexuado, por libertação após ruptura de um quisto. À medida que a maturação ocorre, o trofozoíto adquire uma forma mais irregular, de maiores dimensões (3-5 μm). O trofozoíto maduro possui uma membrana celular fina, com 20-50 nm de espessura, constituída por uma camada interna, que corresponde à membrana plasmática, e uma camada externa, que parece ter um papel essencial na regulação osmótica e no transporte de macromoléculas. Na superfície externa da parede celular existe um número elevado de filopódias ou expansões tubulares, estruturas longas e finas, de tamanho variado, que caracterizam este estágio de desenvolvimento. Estas expansões tubulares conferem um aspecto felpudo à camada externa da membrana celular e estão,

provavelmente, relacionadas com a fixação do trofozoíto às células do hospedeiro e/ou à obtenção de nutrientes (Vavra & Kucera, 1970; Matsumoto & Yoshida, 1986; Ruffolo *et al.*, 1989; Yoshida, 1989; Ruffolo, 1994).

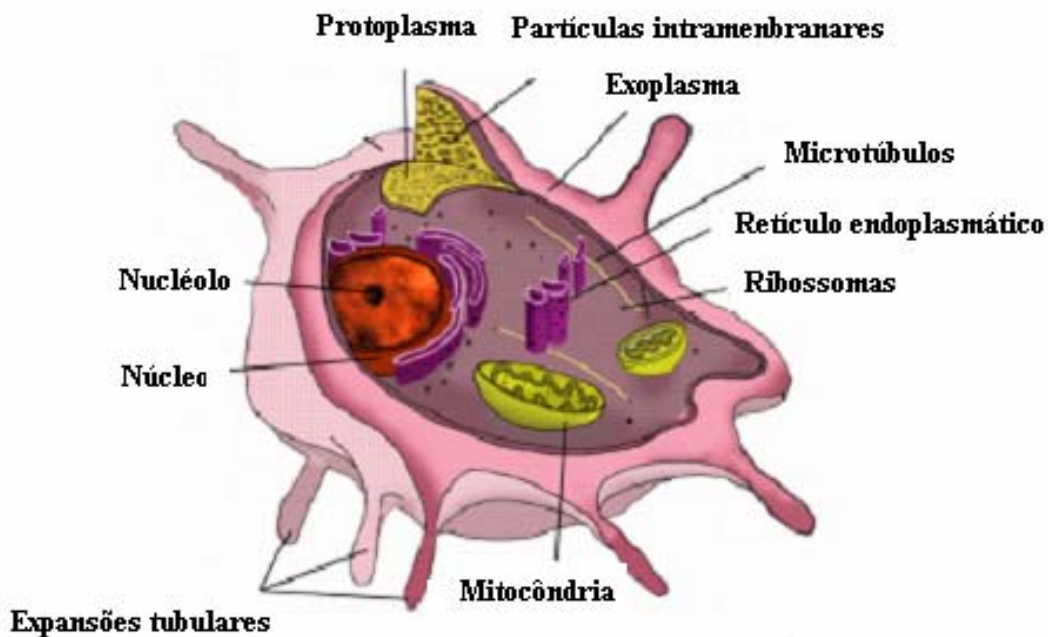


FIGURA 1. Representação esquemática de um trofozoíto de *Pneumocystis* (adaptado de De Souza & Benchimol, 2005).

b) **pré-quisto** – corresponde a um estágio intermédio de desenvolvimento, entre o trofozoíto e o quisto. O pré-quisto apresenta forma oval, com cerca de 4-5 μm de diâmetro, tornando-se esférico à medida que amadurece. No decorrer da maturação, ocorre, ainda, um espessamento da parede celular (40-120 nm), devido à formação de uma camada intermédia, entre a membrana plasmática e a camada externa. O número de

filopódias, na superfície externa da parede celular, é reduzido. Ao contrário do trofozoíto, que pode ser haplóide ou diplóide, o pré-quisto é, sempre, uma célula diplóide, resultante de um ciclo de desenvolvimento sexuado, durante o qual o seu núcleo sofre várias divisões até formar os oito núcleos, característicos do estágio de desenvolvimento seguinte (Vavra & Kucera, 1970; Matsumoto & Yoshida, 1986; Ruffolo *et al.*, 1989; Yoshida, 1989; Ruffolo, 1994).

c) **quisto** – é a forma de resistência de *Pneumocystis* (figura 2). O quisto apresenta uma forma esférica com cerca de 4-6 μm de diâmetro e uma parede celular muito espessa (100-160 nm), resultante do maior desenvolvimento das três camadas existentes no pré-quisto.



FIGURA 2. Representação esquemática de um quisto de *Pneumocystis* (adaptado de De Souza & Benchimol, 2005).

A determinado momento, a camada intermédia sofre uma invaginação, originando uma porção mais espessa (200-300 nm), em forma de cratera. Tal como no pré-quisto, a parede celular do quisto apresenta um número reduzido de filopódias aderentes à sua superfície externa. O quisto encerra oito corpos intraquísticos, estruturas haplóides de forma variada e com cerca de 1 μm de diâmetro, que, de um modo geral, se encontram dispostos em coroa (Vavra & Kucera, 1970; Matsumoto & Yoshida, 1986; Ruffolo *et al.*, 1989; Yoshida, 1989; Ruffolo, 1994).

3. CICLO DE VIDA

As dificuldades no desenvolvimento de métodos de cultivo *in vitro* de *Pneumocystis* têm dificultado o conhecimento completo do seu ciclo de vida. Na tentativa de descrever este ciclo, vários investigadores têm realizado estudos baseados na observação de tecido pulmonar infectado, mediante o recurso à microscopia electrónica. A maioria destes estudos, veio demonstrar que ocorre uma evolução de trofozoíto para pré-quisto e deste para quisto, o qual, após rotura, liberta oito corpos intraquísticos. Cada um destes corpos intraquísticos evolui para um novo trofozoíto, dando início a um novo ciclo de desenvolvimento. Do mesmo modo, foram observadas imagens sugestivas de endogenia e de divisão binária entre trofozoítos (Vavra & Kucera, 1970; Matsumoto & Yoshida, 1986; Ruffolo *et al.*, 1989; Yoshida, 1989; Ruffolo, 1994).

Em 1984, Matsumoto e Yoshida identificaram complexos de sinaptonemas em pré-quistos de *Pneumocystis*, estruturas responsáveis pelo alinhamento dos cromossomas homólogos, no decorrer da profase da meiose I. A observação destas estruturas veio demonstrar a existência de meiose no ciclo evolutivo deste microrganismo e, por conseguinte, de reprodução sexuada. Recentemente, estudos efectuados com o recurso à microscopia electrónica, visualizaram, também, a formação de complexos de sinaptonemas em pré-quistos de *Pneumocystis* (Peters *et al.*, 2001).

Com base nas observações efectuadas, Matsumoto e Yoshida propuseram um ciclo de vida englobando uma fase evolutiva assexuada, na qual ocorreria a reprodução de trofozoítos, e outra sexuada, que culminaria com a formação do quisto maduro (Matsumoto & Yoshida, 1984, 1986; Yoshida, 1989). Este esquema foi revisto mais tarde, em 1989, por Yoshida. Este autor descreveu o ciclo de vida de *Pneumocystis* (figura 3), como um ciclo sexuado, que se inicia com a ruptura do quisto maduro e a libertação dos oito corpos intraquísticos para o espaço alveolar, os quais evoluem para trofozoítos haplóides. Cada trofozoíto haplóide, por conjugação com outro semelhante, dá origem a um trofozoíto diplóide, o qual evolui para pré-quisto. No decorrer da evolução para quisto, o núcleo do pré-quisto sofre uma divisão meiótica com duas fases (meiose I e II), seguida de uma mitose, formando-se um total de oito núcleos haplóides (Yoshida, 1989). Cada um destes núcleos é envolvido por uma membrana plasmática própria, proveniente da porção interna da membrana celular do pré-quisto maduro, dando origem aos corpos intraquísticos. Cada corpo intraquístico possui um núcleo, uma mitocôndria e outros organelos citoplasmáticos (Matsumoto & Yoshida, 1986; Ruffolo, 1994). Quando se completa a formação dos oito corpos intraquísticos obtém-se um quisto maduro, o qual está pronto a romper, iniciando um novo ciclo (Yoshida, 1989). Para além desta fase sexuada, o ciclo evolutivo de *Pneumocystis* compreende, ainda, uma outra fase, na qual ocorre reprodução assexuada de trofozoítos, haplóides ou diplóides, por divisão binária (modo de reprodução dominante, em cultura) ou por endogenia (Yoshida, 1989; Touze *et al.*, 1991; Ruffolo, 1994). O processo de endogenia consiste na formação de duas ou mais células-filhas no interior da membrana celular de uma célula-mãe.

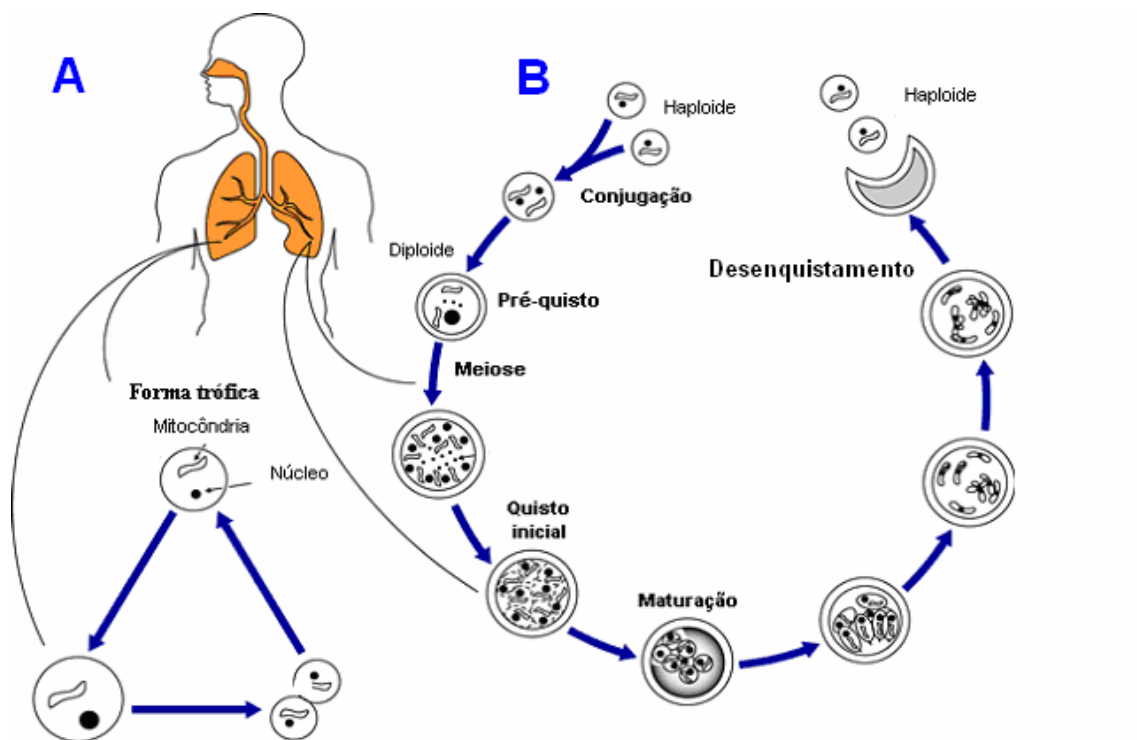


FIGURA 3. Representação esquemática do ciclo de vida proposto para *Pneumocystis*. A– Ciclo de vida assexuado. B– Ciclo de vida sexuado (adaptado de Helweg-Larsen *et al.*, 2004).

Recentemente, diversos estudos, fundamentados em técnicas de genética molecular, têm contribuído para a melhor compreensão do ciclo de vida de *Pneumocystis*. No decurso do estudo do genoma deste parasita, têm sido identificadas sequências homólogas às dos genes que codificam receptores de feromonas em diversos fungos, como *Schizosaccharomyces pombe* e *Saccharomyces cerevisiae* (Smulian *et al.*, 2001; Slaven *et al.*, 2003; Vohra *et al.*, 2003). Nestes microrganismos, o processo de

reprodução sexuada envolve um mecanismo de reconhecimento, mediado por feromonas, que desencadeia um sistema de sinalização para o meio intracelular que resulta, no final, na meiose e formação de novas células. Assim, a identificação de sequências homólogas aos genes envolvidos no processo de reprodução sexuada em leveduras, sugere que um sistema semelhante possa ocorrer em *Pneumocystis*.

4. TAXONOMIA

Pneumocystis é um microrganismo eucariota unicelular cuja classificação taxonômica é, ainda, alvo de estudo e controvérsia. Desde a sua descoberta por Chagas até ao final dos anos 80, do século passado, este microrganismo foi considerado um protozoário.

A classificação de *Pneumocystis*, como protozoário, fundamenta-se, nomeadamente, na morfologia do trofozoíto, na presença abundante de colesterol na parede celular e na sensibilidade aos fármacos antiprotozoários, como a pentamidina e o trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX). Outra característica, que sugere a natureza de protozoário de *Pneumocystis* é a existência de um mecanismo de variação antigénica (Kovacs *et al.*, 1993; Stringer *et al.*, 1993; Garbe & Stringer, 1994), processo comum em bactérias e protozoários. Na base deste processo está o conjunto de glicoproteínas *major* de superfície, denominadas MSG (do inglês, “Major Surface Glicoprotein”), ou glicoproteínas A (gpA), que são codificadas por uma família génica, com cerca de 100 genes. A regulação da expressão deste conjunto de genes permite que *Pneumocystis* possa apresentar isoformas da MSG diferentes e, desta forma, evadir-se da resposta imunológica do hospedeiro (Nakamura & Wada, 1998).

Na década de 80, do século passado, dois grupos de investigadores determinaram a sequência do gene, que codifica a subunidade 18S, equivalente à 16S,

do ácido ribonucleico ribossômico (rRNA, do inglês “ribosomal ribonucleic acid”), do genoma nuclear de *Pneumocystis*. A análise filogenética, baseada na sequência do gene da subunidade 18S do rRNA, demonstrou que *Pneumocystis* apresentava mais semelhanças com alguns fungos, como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Neurospora crassa* e *Cryptococcus diffuens*, do que com alguns protozoários, como *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium berghei* e *Acanthamoeba castellani* (Edman J. C. *et al.*, 1988, 1989a; Stringer *et al.*, 1989, 1989a). Também, a caracterização do genética da β -tubulina de *Pneumocystis* demonstrou a existência de 89 a 91% de homologia com a sequência ortóloga dos fungos filamentosos, ao nível da sequência da proteína, e 79 a 82% de homologia com o gene correspondente nas leveduras e nos protozoários. A sequência do gene da β -tubulina de *Pneumocystis* apresenta, também, oito intrões, num padrão característico dos fungos filamentosos (Edlind *et al.*, 1991, 1992; Li & Edlind, 1994; Weinberg *et al.*, 1994).

Ao longo dos últimos anos, a comparação filogenética, em vários genes, demonstrou que *Pneumocystis* apresentava maior semelhança com os fungos do que com os protozoários, particularmente, nos genes que codificam a dihidrofolato reductase (DHFR) (Edman J. C. *et al.*, 1989), a timidilato sintetase (TS) (Edman U. *et al.*, 1989), a β -tubulina (Dyer *et al.*, 1992, Edlind *et al.*, 1992, Li & Edlind, 1994), a α -tubulina (Zhang & Stringer, 1993), a proteína de ligação à sequência TATA (Meade & Stringer, 1991; Sunkin & Stringer, 1995), a ATPase translocadora de catiões de tipo P (Meade & Stringer, 1991, 1995), os genes que constituem o DNA mitocondrial (Pixley *et al.*, 1991), a actina (Fletcher *et al.*, 1994) e o *arom*, gene que codifica a enzima multifuncional, responsável pela síntese dos aminoácidos aromáticos (Banerji *et al.*, 1993).

Ao contrário do que acontece com os protozoários, as enzimas DHFR e TS são codificadas por genes separados, em dois cromossomas diferentes (Edman J.C. *et al.*, 1989; Edman, U. *et al.*, 1989). Outra característica molecular, que aproxima *Pneumocystis* dos fungos, é que este apresenta o factor de alongação 3 (EF-3, do inglês “elongation factor”), que se encontra, exclusivamente, nos fungos e cuja sequência é 57% idêntica à existente em *S. cerevisiae* (Ypma-Wong *et al.*, 1992).

No geral, o conhecimento do genoma de *Pneumocystis* sugere que este microrganismo pertença ao Reino Fungi, provavelmente num ponto intermédio entre as Classes *Ascomycota* e *Basidiomycota* (Wakefield *et al.*, 1992), embora a possibilidade de ser um basidiomicete não possa ser excluída (Stringer, 1996; Stringer & Walzer, 1996). Por outro lado, a análise da sequência do 5S rRNA nuclear sugeriu a semelhança de *Pneumocystis* com o Reino Fungi, em particular com o grupo *Rhizopoda* /*Myxomycota*/*Zygomycota* (“Fungos protistas”) (Watanabe *et al.*, 1989, 1989a). Em 1994, Eriksson propôs uma nova Família para este fungo, a *Pneumocystidaceae*, e uma nova Ordem, *Pneumocystidales*, ambas inseridas na Classe *Ascomycota*. (Eriksson, 1994). Após esta reclassificação, surgiram novas vertentes de investigação clínica, principalmente, no âmbito do desenvolvimento de novas classes de antifúngicos, contra *P. jirovecii*, em particular, inibidores da β -1,3-glucano sintetase (Stringer, 1996).

Para além das características genéticas apresentadas, este eucariota exhibe algumas características morfológicas que justificam a classificação como fungo, nomeadamente a presença de quitina e β -glucano, na composição da sua parede quística, a ausência de organelos facilmente visíveis, as formas quísticas com oito corpos intraquísticos, semelhantes aos ascosporos dos fungos *Ascomycota*, e as cristas lamelares, ao nível das mitocôndrias (Vavra & Kucera, 1970; Ruffolo, 1994).

No entanto, apesar das várias características genotípicas e morfológicas semelhantes aos fungos, *Pneumocystis* possui algumas características próprias dos protozoários. Em particular, não possui ergosterol, sendo o colesterol o mais abundante na composição da parede celular (Kaneshiro *et al.*, 1999), o que explica a sua resistência aos antifúngicos, como a anfotericina B. Também, não existem, actualmente, meios de cultura *in vitro* eficientes, isto é, capazes de manter *Pneumocystis*, em particular os microrganismos de origem humana, em cultura contínua, nomeadamente, os meios de cultura específicos para fungos. Outras características atípicas de fungo, são o facto da parede do trofozoíto apresentar consistência frágil e flexível (Stringer, 1996) e a existência de apenas uma a duas cópias do gene 18S rRNA, ao contrário da maioria dos fungos, que possuem centenas de cópias deste gene (Tang *et al.*, 1998, Nahimana *et al.*, 2000).

A caracterização taxonómica deste parasita é, também, controversa, quanto à composição do género *Pneumocystis*. De facto, a grande heterogeneidade genética e fenotípica observada em *Pneumocystis* isolado de diferentes hospedeiros sugere que estes microrganismos sejam, na realidade, espécies diferentes. *Pneumocystis* apresenta algumas diferenças nas características fenotípicas, quando isolado de hospedeiros diferentes, nomeadamente, apresenta antigénios de superfície diferentes (Bauer N. L. *et al.*, 1991, 1993; Linke *et al.*, 1994; Mazars *et al.*, 1997; Mazars & Dei-Cas, 1998), e os antigénios semelhantes, nos diferentes tipos de *Pneumocystis*, possuem diferentes mobilidades electroforéticas (Walzer & Linke, 1987; Kovacs *et al.*, 1989a; Linke *et al.*, 1994). A mais importante característica fenotípica que distingue, *Pneumocystis* isolado de diferentes hospedeiros é a especificidade de hospedeiro, ou seja, *Pneumocystis*

isolado de um hospedeiro não é capaz de causar infecção num hospedeiro diferente (Gigliotti *et al.*, 1993; Aliouat *et al.*, 1994).

Com o objectivo de diferenciar *Pneumocystis* isolado de diferentes espécies de hospedeiros, foi elaborado um sistema de nomenclatura trinominal, no qual uma terceira designação, colocada após o epíteto específico, reflectia a origem do parasita (quadro I). (Stringer & Walzer, 1996).

QUADRO I. Exemplos da nomenclatura trinominal para *P. carinii*.

HOSPEDEIROS	NOMENCLATURA TRINOMINAL
Homem	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>hominis</i>
Rato	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>carinii</i>
Rato	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>rattus</i>
Furão	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>mustelae</i>
Ratinho	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>muris</i>
Cavalo	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>equi</i>
Porco	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>suis</i>
Coelho	<i>P. carinii</i> f. sp. <i>oryctolagi</i>

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado o elevado grau de divergência genética observado entre *Pneumocystis* isolado de humanos e de outras espécies de hospedeiros (Stringer, 2002; Stringer *et al.*, 2001, 2002). O estudo filogenético de diversas sequências de DNA de *Pneumocystis* isolado de várias espécies de mamíferos demonstra que existe elevado grau de divergência genética (Demanche *et al.*, 2001; Stringer *et al.*, 2001; Stringer, 2002). De facto, a elevada heterogeneidade

observada, sugere que as formas de *Pneumocystis*, isoladas de diferentes hospedeiros sejam organismos geneticamente diferentes.

Para além, da diversidade genética detectada, a observação de que *Pneumocystis* isolado do Homem não prolifera no pulmão de outro hospedeiro levou vários autores a considerar que este microrganismo poderia pertencer a uma espécie distinta (Mazars & Dei-Cas, 1998; Stringer *et al.*, 2001; Stringer, 2002). Assim, em 1999, Frenkel, pela primeira vez, caracterizou a forma de *Pneumocystis* isolada do Homem, anteriormente designado por *P. carinii* f. sp. *hominis*, denominando-a *P. jirovecii*, homenageando o investigador Otto Jirovec, responsável pelas primeiras descrições da infecção por *Pneumocystis* em humanos.

5. EPIDEMIOLOGIA DA PNEUMOCISTOSE

5.1. FREQUÊNCIA

Apesar da incidência da pneumocistose ter diminuído, após a introdução da profilaxia primária da PPc e, posteriormente, da terapêutica anti-retroviral potente (HAART, do inglês “highly active antiretroviral therapy”), esta infecção continua a ser comum em indivíduos com infecção por VIH (Kaplan *et al.*, 2000). Os doentes residentes em países em vias de desenvolvimento, sem acesso aos fármacos para profilaxia primária da PPc ou à HAART, continuam a estar em elevado risco de desenvolverem esta doença, assim como alguns grupos de doentes nos países industrializados (Morris *et al.*, 2004).

Os primeiros casos de pneumocistose foram reportados durante a 2ª Grande Guerra, em orfanatos na Europa, entre crianças malnutridas, e, mais tarde, foram observados mais casos de infecção em orfanatos, no Irão. Posteriormente, a PPc foi reportada em doentes imunocomprometidos devido a doenças neoplásicas, terapia imunossupressora ou com imunodeficiências congénitas. Também, a transplantação de órgãos aumentou o número de doentes em risco de desenvolverem PPc, apesar da frequência da doença ter diminuído após a introdução da quimioprofilaxia anti-*P. jirovecii*.

No início dos anos 80, do século passado, a incidência da pneumocistose alterou-se de forma drástica, passando de uma doença rara para uma forma de pneumonia, relativamente, comum. A ocorrência de pneumocistose entre homossexuais e utilizadores de drogas intravenosas foi uma das primeiras evidências da epidemia por VIH (Masur *et al.*, 1981). Rapidamente, a PPc tornou-se a primeira doença definidora de SIDA com elevada prevalência, de 20 casos em 100 pessoas/ano, em doentes com contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior a 200 células/ μ l (Phair *et al.* 1990). A pneumocistose era uma importante doença definidora de SIDA e um número estimado de 75% de doentes com infecção por VIH desenvolviam, pelo menos, um episódio de PPc, no decorrer da sua vida (Hay *et al.*, 1988). Mais tarde, com a introdução da profilaxia anti-*P. jirovecii*, em 1989, observou-se importante declínio na frequência desta doença (Fischl *et al.*, 1988). A utilização da HAART seria, também, responsável pela redução significativa da prevalência da pneumocistose, entre adultos, para valores de 3,4% por ano, após 1992, assim como no declínio de outras doenças oportunistas (Kaplan *et al.*, 2000).

Nos E.U.A., o estudo do espectro da infecção por VIH em adultos e adolescentes (ASD, do inglês “Adult and adolescent spectrum of HIV disease project”) observou a redução, significativa, da incidência de todas as doenças oportunistas em 1996–1997, quando a HAART se tornou, pela primeira vez, amplamente disponível. Este estudo registou um decréscimo da PPc de 3,4% por ano, entre 1992 e 1995, que foi posteriormente de 21,5% por ano, entre 1996 e 1998, após a introdução da HAART (Kaplan *et al.*, 2000). Apesar desta melhoria significativa, a pneumocistose é, ainda, a doença oportunista definidora de SIDA mais comum nos E.U.A. (Morris *et al.*, 2004).

Na Europa, o estudo EuroSida tem seguido um grupo com mais de 8.500 doentes com infecção por VIH. Neste estudo, foram observados resultados semelhantes aos

reportados nos E.U.A., relativamente à incidência das doenças definidoras de SIDA, antes e após a introdução da HAART (Mocroft *et al.*, 2000). Da mesma forma, verificou-se que a pneumocistose diminuiu ao longo do período estudado, entre 1994 e 1998. A incidência desta doença diminuiu de 4,9 casos em 100 pessoas/ano, antes de Março de 1995, para 0,3 casos em 100 pessoas/ano, após Março de 1998 (Weverling *et al.*, 1999).

No entanto, nos países industrializados, a pneumocistose continua a suceder apesar da disponibilidade da profilaxia anti-*P. jirovecii* e da HAART. No decurso do estudo ASD, verificou-se que 44% dos casos de PPc ocorreram em doentes que não recebiam cuidados médicos (alguns, provavelmente, desconheciam estar infectados por VIH), 41% dos casos de PPc ocorreram em doentes não aderentes à profilaxia anti-*P. jirovecii* ou que tinham desenvolvido PPc, apesar de tomarem apropriadamente os fármacos prescritos. Também, 9,6% dos casos de pneumocistose surgiram em doentes que eram medicamente seguidos, mas a quem não tinha sido prescrita profilaxia específica. Os restantes 5% dos casos de PPc sucederam em doentes que, embora sob vigilância médica, não tinham os critérios necessários para a profilaxia.

No início da pandemia da SIDA, a pneumocistose ocorria em crianças, seropositivas para VIH, com a frequência de 1,3 casos em 100 crianças/ano, desde a infância até à adolescência, tendo aumentado até 9,5 casos por 100 crianças/ano, durante o primeiro ano de vida (Dankner *et al.*, 2001; Kattan *et al.*, 2001). Na década 90, do século passado, a frequência da infecção pediátrica por VIH diminuiu devido, em grande parte, à melhoria do diagnóstico pré-natal de VIH e ao uso do tratamento anti-retroviral, para prevenção da transmissão vertical.

Nos E.U.A., o projecto para o estudo da doença pediátrica (PSD, do inglês “Pediatric spectrum disease”), conduzido pelo “Center for Diseases Control” (CDC), observou a diminuição considerável na frequência das infecções oportunistas, em crianças com infecção por VIH, durante a era HAART. Os episódios de PPc diminuíram, significativamente, entre 1992 e 1997, em particular após 1995 (Kaplan *et al.*, 2000).

Por outro lado, nos países não industrializados, em vias de desenvolvimento, a pneumocistose continua a ocorrer, com elevada incidência (Fisk *et al.*, 2003). Estudos efectuados na Tailândia, observam frequências de PPc entre 18,7 e 40%, em doentes com infecção por VIH (Wannamethee *et al.*, 1998; Lumbiganon *et al.*, 2000; Chariyalertsak *et al.*, 2001; Anekthananon *et al.*, 2004; Tansuphasawadikul *et al.*, 2005). Na América do Sul, num estudo efectuado no Brasil, detectaram-se 55% de casos de pneumocistose, entre doentes com infecção por VIH e quadro clínico respiratório (Weinberg & Duarte, 1993). Em estudos efectuados, a partir de amostras obtidas *post-mortem*, a frequência é menor, entre 13 e 19% (Michalany *et al.*, 1987; Pereira *et al.*, 2002). Outros estudos, efectuados na mesma região, reportam prevalências da pneumocistose entre 24 e 29% (Pitchenik *et al.*, 1983; Mohar *et al.*, 1992).

No entanto, e ao contrário do que se observa em várias regiões em vias de desenvolvimento, a pneumocistose parece ser pouco frequente em África. De facto, os primeiros estudos efectuados reportam prevalências entre 5 e 11%, na população de doentes com infecção por VIH (Abouya *et al.*, 1992; Kamanfu *et al.*, 1993; Batungwanayo *et al.*, 1994; Ansari *et al.*, 2002), apesar de outros estudos apresentarem taxas de prevalência mais altas, entre 22 e 33% (McLeod *et al.* 1990; Malin *et al.*, 1995). No passado, a pneumocistose pode ter sido subdiagnosticada, em África, devido a várias

razões, nomeadamente, aos recursos limitados no diagnóstico, como pessoal inexperiente na preparação e interpretação das técnicas, e à elevada incidência de pneumonias bacterianas e tuberculose, as quais podem levar à morte, antes que o número de linfócitos TCD4⁺ atinja níveis que condicionam maior risco de desenvolver pneumocistose. No entanto, a exposição a *P. jirovecii* é comum, como está demonstrado pela elevada frequência de crianças africanas que apresentam anticorpos anti-*P. jirovecii* (Wakefield *et al.*, 1990b).

Actualmente, a incidência da pneumocistose em África parece estar a aumentar, à medida que a epidemia da SIDA cresce (Fisk *et al.*, 2003). Recentemente, num estudo realizado no Uganda, em 83 doentes com infecção por VIH, 32 (38,6%) foram diagnosticados com pneumocistose (Worodria *et al.*, 2003). No entanto, não se sabe se este aumento se deve à frequência maior da doença ou se é resultado da melhoria nas técnicas de diagnóstico.

Em África, ao contrário do que acontece com a população adulta, a pneumocistose parece ser mais frequente entre as crianças com infecção por VIH. Em estudos efectuados a partir de amostras *post-mortem* observaram-se taxas de frequência de pneumocistose entre 14 e 51,3%, em função do grupo de idades estudado (Lucas *et al.*, 1996; Ikeogu *et al.*, 1997; Graham *et al.*, 2000; Chintu *et al.*, 2002; Ansari *et al.*, 2003). No Zimbawe, em 15,5% (19/122) das crianças seropositivas para VIH, com idades inferiores a cinco anos de idade, foi detectado *P. jirovecii* na autópsia (Ikeogu *et al.*, 1997). Neste estudo, à excepção de um, todos os casos de pneumocistose foram observados em crianças com menos de seis meses. Noutro trabalho, efectuado na Zâmbia, 29% das crianças com infecção por VIH morreram devido à pneumocistose, o que tornou esta doença a terceira maior causa de morte, na população estudada (Chintu

et al., 2002). Outros estudos, efectuados em crianças hospitalizadas, observaram frequências de PPc entre 10 a 49% (Zar *et al.*, 2000, 2001; Madhi *et al.*, 2002; Ruffini *et al.*, 2002). Na África do Sul, dois estudos reportaram incidências de pneumocistose de 44 e 49% em crianças hospitalizadas com pneumonia grave, em ambos os casos a média de idades das crianças era muito baixa (Madhi *et al.*, 2002; Ruffini *et al.*, 2002).

5.2. TRANSMISSÃO

Pneumocystis é um parasita eucariota com distribuição geográfica cosmopolita. Para além do Homem, este microrganismo já foi identificado no pulmão de outros mamíferos, como roedores, canídeos, equinos e primatas, o que demonstra a sua elevada capacidade patogénica e, também, a sua distribuição ubíqua (Fujita *et al.*, 1996; Bishop *et al.*, 1997; Laakkonen, 1998; Nielsen *et al.*, 1998; Perron Lepage *et al.*, 1999; Lobetti, 2000; Kondo *et al.*, 2000; Hagiwara *et al.*, 2001; Laakkonen *et al.*, 2001; MacNeill *et al.*, 2003). Também, o DNA de *Pneumocystis*, isolado do Homem e do rato, foi identificado em amostras de ar (Bartlett *et al.*, 1994; Wakefield, 1994; Bartlett *et al.*, 1996; Wakefield, 1996; Bartlett *et al.*, 1997; Olsson *et al.*, 1998; Sing *et al.*, 1999a) e de água (Casanova-Cardiel & Leibowitz, 1997). Alguns autores sugerem, também, que o solo possa ser uma fonte de infecção, uma vez que actividades exercidas em contacto com este, como a jardinagem, podem ser factores de risco para a pneumocistose (Navin *et al.*, 2000). No entanto, não foram identificados, até ao momento, reservatórios ambientais de *Pneumocystis*, nem foi reconhecida a forma infectante deste microrganismo.

Da mesma forma, o número de microrganismos necessário para provocar infecção não é, ainda, conhecido. No entanto, alguns autores sugerem que este não deve ser muito elevado. Estudos realizados em ratos imunossuprimidos demonstraram que um inóculo de, pelo menos, 10 microrganismos é capaz de causar infecção (Cushion *et al.*, 1999).

Actualmente, o modo de transmissão da infecção por *Pneumocystis* é, ainda, incerto. Estudos efectuados em roedores e primatas imunocomprometidos sugerem que a infecção se transmita por via aérea, através do aparelho respiratório, por inalação de material infeccioso, apesar de não ser conhecido o estágio do ciclo de vida responsável pela propagação da infecção (Hughes, 1982; Vogel *et al.*, 1993). Também, a ocorrência de surtos epidémicos, em doentes internados em hospitais e em instituições, sugere a propagação de *Pneumocystis* por via aérea (Singer *et al.*, 1975; Fenelon *et al.*, 1985; Goesch *et al.*, 1990; Bensousan *et al.*, 1990; Jacobs *et al.*, 1991; Rabodonirina *et al.*, 2004; Hocker *et al.*, 2005).

A transmissão nosocomial parece ser, também, uma forma de aquisição da infecção. Estudos serológicos efectuados, em funcionários hospitalares, documentaram um aumento do título de anticorpos anti-*P. jirovecii* nos trabalhadores que mantinham contacto directo com doentes com co-infecção VIH/*P. jirovecii* (Leigh *et al.*, 1993a; Lundgren *et al.*, 1997). No entanto, não se conseguiu identificar o parasita nas secreções pulmonares de pessoal hospitalar, imunocompetente (Lidman *et al.*, 1997). Posteriormente, o desenvolvimento e aplicação de técnicas de biologia molecular, na detecção e genotipagem de *Pneumocystis*, mais sensíveis e discriminatórias, do que as técnicas parasitológicas, permitiu a confirmação da transmissão entre doentes com

pneumocistose e pessoal hospitalar (Touzet *et al.*, 2000; Vargas *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2001; Rabodonirina *et al.*, 2004; Hocker *et al.*, 2005).

A transmissão vertical de *Pneumocystis* foi demonstrada em coelhos (Cere *et al.*, 1997; Cere & Polack, 1999) e também pode ocorrer no Homem (Mortier *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 2002; McNally *et al.*, 2005).

No geral, os diversos estudos realizados, que sugerem a transmissão de *Pneumocystis* entre indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos (Dumoulin *et al.*, 2000; Vargas *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2001), a presença de *Pneumocystis* em recém-nascidos ou em crianças muito pequenas (Vargas *et al.*, 2001) e no modelo animal (Soulez *et al.*, 1989, 1991; Icenhour *et al.*, 2001, 2002) e a existência da associação entre a síndrome de morte súbita infantil e a infecção por *P. jirovecii* (Vargas *et al.*, 1999; Morgan *et al.*, 2001; Chabe *et al.*, 2004) proporcionam várias evidências de que esta infecção parece ser transmitida hospedeiro-a-hospedeiro.

5.2.1. Modo de infecção: reactivação de infecção latente ou infecção *de novo*

Num passado recente, julgava-se que o único modo de aquisição da infecção resultava da reactivação da infecção latente. Esta teoria postulava que o primeiro contacto com o parasita ocorreria bastante cedo, na infância. O sistema imunitário controlaria, com sucesso a infecção clínica, mas o microrganismo teria a capacidade de se manter no pulmão do seu hospedeiro. Se por alguma razão o sistema imunitário falhasse, a infecção latente reactivar-se-ia. Na base desta teoria, estão vários estudos serológicos que demonstram que 70 a 85% de crianças, entre os dois e oito anos de idade, e 70% de adultos, apresentam anticorpos anti-*P. jirovecii* (Meuwissen *et al.*, 1977; Pifer *et al.*, 1988; Peglow *et al.*, 1990; Wakefield *et al.*, 1990; Smulian *et al.*,

1993; Vargas *et al.*, 2001; Respaldiza *et al.*, 2004). Também, a elevada prevalência de pneumocistose, durante os primeiros seis meses de vida de crianças com infecção por VIH, sugere, também, a natureza cosmopolita de *Pneumocystis* (Simonds *et al.*, 1993).

Ao longo dos últimos anos, variados estudos têm demonstrado a presença de *Pneumocystis* em indivíduos imunocompetentes, sem evidência de doença (Nevez *et al.*, 1997; Sing *et al.*, 1999; Vargas *et al.*, 1999; Sing *et al.*, 2001). Esta observação suporta a hipótese de que *P. jirovecii* consegue sobreviver no seu hospedeiro sem causar sintomatologia. Alternativamente, esta observação pode sugerir que o parasita é ubíquo no ambiente e que a exposição no Homem é caracterizada por colonização intermitente.

Algumas características biológicas de *P. jirovecii* favorecem a sua estadia, a longo prazo, no hospedeiro. Este parasita tem a capacidade de variar os seus antigénios de superfície, nomeadamente o complexo de glicoproteínas MSG. Esta variação parece estar relacionada com a evasão à resposta imunitária do hospedeiro, o que permite que a ocorrência da colonização (Gigliotti, 1992; Wada *et al.*, 1995; Benfield & Lundgren, 1998). Também, como já foi referido anteriormente, cada forma de *Pneumocystis* isolada de uma espécie diferente de hospedeiro, é específica do hospedeiro onde foi recolhida. De facto, *Pneumocystis* isolado de um determinado hospedeiro não é capaz de infectar outra espécie de hospedeiro (Gigliotti *et al.*, 1993). Estudos filogenéticos, efectuados em várias regiões genómicas, que compararam a divergência genética identificada entre *Pneumocystis* de diversas origens e os seus hospedeiros, sugerem que possa ter ocorrido co-evolução entre este parasita e os seus hospedeiros (Demanche *et al.*, 2001; Guillot *et al.*, 2001; Hugot *et al.*, 2003). Também, a dificuldade de manter *Pneumocystis* em cultura *in vitro* é consistente com a permanência, a longo prazo, no

hospedeiro, reflectindo a especificidade do parasita para um determinado hospedeiro e/ou micro-ambiente.

Até ao momento, vários estudos têm reportado resultados que refutam a teoria da reactivação de infecção latente, pelo menos, como único mecanismo de infecção. De facto, diversos estudos, efectuados em amostras *post-mortem*, em tecido pulmonar e em amostras de secreções pulmonares, não conseguiram demonstrar a presença de *Pneumocystis* em indivíduos imunocompetentes (Wakefield *et al.*, 1990; Peters *et al.*, 1992; Contini *et al.*, 1997). Também, estudos realizados através da amplificação, *in vitro*, do ácido desoxirribonucleico (DNA, do inglês “deoxyribonucleic acid”), por reacção em cadeia da polimerase (PCR, do inglês “polymerase chain reaction”), que permite identificar DNA específico de *Pneumocystis*, em animais imunocompetentes, não foram bem sucedidos na detecção do parasita (Chen *et al.*, 1993; Sepkowitz *et al.*, 1993). Estes estudos demonstram que o hospedeiro consegue eliminar *Pneumocystis* do seu organismo o que contraria a hipótese de que o parasita consiga manter-se latente por um período indeterminado (Vargas *et al.*, 1995).

Nos últimos anos, a genotipagem de *P. jirovecii* tem contribuído, largamente, para a clarificação da transmissão desta infecção. Em diversos estudos, pode-se observar que doentes, com episódios recorrentes de pneumocistose, apresentam diferentes génotipos de *P. jirovecii*. (Keely *et al.*, 1995; Keely *et al.*, 1996; Keely & Stringer, 1996, 1997; Matos *et al.*, 2003a). Este fenómeno de alteração de génotipo, entre episódios de pneumocistose, sugere que a infecção tenha sido adquirida *de novo*, em vez de ser consequência da reactivação de infecção adquirida anteriormente.

Finalmente, a distribuição geográfica, em relação à frequência da pneumocistose e dos génotipos de *P. jirovecii*, contraria a teoria da reactivação. Nos E.U.A., dois

estudos avaliaram a variação geográfica, na distribuição dos genótipos de *P. jirovecii* (Beard *et al.*, 2000; Dohn *et al.*, 2000). Os autores observaram que, os genótipos identificados, não só, variavam entre as diversas cidades estudadas, como estavam, significativamente, relacionados com o local de residência dos doentes, em vez do local de nascimento, o que reflectia a exposição recente a *P. jirovecii* (Beard *et al.*, 2000). Da mesma forma, o risco de desenvolver pneumocistose parecia estar relacionado com a localização geográfica do doente, em particular com o seu local de residência (Dohn *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2000).

5.2.2. Colonização por *P. jirovecii* – o estágio de portador assintomático

Apesar redução do número de casos de pneumocistose, o desenvolvimento e aplicação de técnicas de biologia molecular, como a amplificação de DNA específico por PCR, permite a detecção de cargas parasitárias mais baixas, nomeadamente, em indivíduos assintomáticos. Assim, a identificação de *P. jirovecii*, em amostras respiratórias de indivíduos imunocomprometidos ou saudáveis, sem sintomas e sinais de doença, foi definida como colonização ou estado de portador assintomático ou subclínico (Morris *et al.*, 2004).

O significado clínico da presença de *P. jirovecii*, em amostras respiratórias e, consequentemente, a viabilidade dos microrganismos, só detectados por PCR, é, ainda, desconhecido. No entanto, a colonização por *P. jirovecii* pode ser um fenómeno importante, na medida em que pode representar maior risco de propagação da infecção, uma vez que os portadores assintomáticos podem transmitir a infecção a indivíduos susceptíveis.

Até ao momento, o estado de portador assintomático foi demonstrado em indivíduos imunocomprometidos (com infecção por VIH ou não) e em indivíduos saudáveis (Maskell *et al.*, 2003; Wakefield *et al.*, 2003). Os casos de colonização têm sido descritos, principalmente, em indivíduos com infecção por VIH, nos quais a frequência de portadores assintomáticos varia entre 10 e 69% (Wakefield *et al.*, 1990, 1991; Leigh *et al.*, 1993; Wakefield *et al.*, 1993; Olsson *et al.*, 1996; Matos *et al.*, 2001; Takahashi *et al.*, 2002; Huang *et al.*, 2003). Nos indivíduos imunocomprometidos, seronegativos para VIH, a frequência de portadores de *P. jirovecii* varia entre 4,4 e 40% (Mazars *et al.*, 1996; Weig *et al.*, 1997; Ribes *et al.*, 1997; Nevez *et al.*, 1997, 1999; Matos *et al.*, 2003). Também, na população em geral, saudável, pode-se observar colonização por *P. jirovecii*, o que aumenta exponencialmente, o número de pessoas afectadas (Contini *et al.*, 1998; Dumoulin *et al.*, 2000; Vargas *et al.*, 2001; Medrano *et al.*, 2005).

Nas crianças, a colonização parecer ocorrer numa frequência maior do que nos adultos, uma vez que é nesta fase que ocorre a primeira exposição ao parasita. No Chile, Vargas e colegas (2001) detectaram DNA de *P. jirovecii*, a partir de aspirados nasofaríngeos, em 32% das crianças saudáveis estudadas. Noutro estudo, efectuado em crianças, vítimas da síndrome de morte súbita, 35,1% (no Chile) e 14,8% (no Reino Unido) apresentavam *Pneumocystis* no pulmão (Vargas *et al.*, 1999). Recentemente, num estudo efectuado em amostras obtidas *post-mortem*, recolhida entre 1998 e 2000, o DNA de *P. jirovecii* foi identificado em 51,7% de crianças (Vargas *et al.*, 2005).

No entanto, à semelhança do que se verifica nos adultos, nas crianças não é, ainda, totalmente, conhecido o papel da colonização por *Pneumocystis* no desenvolvimento da PPc e da sua transmissão.

5.3. EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR

O desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e a sua aplicação na caracterização genética de *Pneumocystis*, tem contribuído para uma melhor compreensão da epidemiologia e da transmissão da infecção por *P. jirovecii*.

A epidemiologia molecular, considerada um ramo da epidemiologia, pode proporcionar um melhor conhecimento das infecções, não só da caracterização dos agentes que estão, na sua origem, mas, também, da sua ecologia e dinâmica da transmissão. Até ao momento, os vários estudos publicados, para além de melhorarem o conhecimento da epidemiologia da pneumocistose, têm permitido esclarecer os padrões de transmissão, identificar as fontes de infecção e, até, analisar o potencial desenvolvimento de resistência aos fármacos.

Até ao momento, a tipagem genética de *Pneumocystis* permitiu o estudo da biodiversidade, inter e intra-específica de *Pneumocystis* (Latouche *et al.*, 1997) a identificação de possíveis reservatórios ambientais (Wakefield, 1996; Beard *et al.*, 2000) a ocorrência de transmissão pessoa-a-pessoa (Helweg-Larsen *et al.*, 1998; Miller *et al.*, 2002; Totet *et al.*, 2004) a existência de colonização e portadores assintomáticos (Nevez *et al.*, 2003; Totet *et al.*, 2003a; Wakefield *et al.*, 2003) a identificação de potenciais marcadores de virulência (Miller & Wakefield, 1999) o provável desenvolvimento de resistência aos fármacos (Mei *et al.*, 1998; Walker *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Kazanjian *et al.*, 2000).

Entre os métodos de genotipagem utilizados, mais vezes, encontram-se os baseados na sequenciação de DNA, na análise dos polimorfismos de conformação do DNA em cadeia simples (SSCP do inglês “single strand conformation polymorphism”)

e na análise dos polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP do inglês “restriction fragment length polymorphism”). A análise do DNA por sequenciação directa tem sido o método mais comum, aplicado ao estudo da biodiversidade e da caracterização genética de *Pneumocystis*.

O estudo da sequência de DNA, nomeadamente, dos genes que codificam a enzima TS, a enzima superóxido dismutase, o gene multifuncional *arom* e a subunidade pequena do rRNA mitocondrial (mt[SSU]rRNA, do inglês “mitochondrial small subunit rRNA”), tem sido utilizado para diferenciar *Pneumocystis* isolado de diferentes espécies de hospedeiros mamíferos (Banerji *et al.*, 1995; Dei-Cas, 2000).

Por outro lado, a diversidade genética de *P. jirovecii* foi observada, pela primeira vez, no gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial (mt[LSU]rRNA, do inglês “mitochondrial large subunit rRNA”), onde foram identificadas substituições pontuais em três posições nucleotídicas (Sinclair *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1993). Desde então, a análise da heterogeneidade genética de diversos *loci* tem sido aplicada ao estudo da epidemiologia molecular da pneumocistose (quadro II).

Entre as várias regiões genómicas estudadas, estão os espaçadores internos transcritos (ITS, do inglês “internal transcribed spacers”), do rRNA nuclear, (Lee *et al.*, 1998; Miller & Wakefield, 1999; Helweg-Larsen *et al.*, 2001; Miller *et al.*, 2002; Nevez *et al.*, 2003; Matos *et al.*, 2003a; Totet *et al.*, 2003, 2004) o gene mt(LSU)rRNA (Wakefield, 1996; Beard *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2002; Totet *et al.*, 2003a) e o gene que codifica a enzima dihidropteroato sintetase (DHPS, do inglês “dihydropteroate synthase”) (Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 2000; Kazanjian *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2001, 2003, 2003a; Totet *et al.*, 2004a, 2004b; Costa *et al.*, 2005).

QUADRO II. Genes utilizados na tipagem de *P. jirovecii*.

GENES	Tamanho (pb)	Número de seqüências diferentes	Local polimórfico	Alterações na seqüência de DNA
Subunidade grande do rRNA mitocondrial (Lee <i>et al.</i> , 1993; Tsolaki <i>et al.</i> , 1998)	356	5	81	C/T
			85	T/C/A
			248	C/T
Subunidade pequena do rRNA mitocondrial (Tsolaki <i>et al.</i> , 1998)	300	2	60	C/A
			196	T/G
5S rRNA (Latouche <i>et al.</i> , 1997)	120	6	23	T/G
			63	A/T
			79	T/C
			82	A/G
			88	T/C
<i>Arom</i> (Banerji <i>et al.</i> , 1995)	237	4	121	T/C
			208	A/G/C
ITS 1 e2 (Lee <i>et al.</i> , 1998; Matos <i>et al.</i> , 2003a)	161 e 192	16 e 13	Ver quadro III e IV	
DHPS (Lane <i>et al.</i> , 1997)	834	4	165	A/G
			171	C/T
Citocromo b (Walker <i>et al.</i> , 1998)	1038	7	279	C/T
			362	C/T
			369	G/T
			516	C/T
			1032	T/A
MSG (Ma <i>et al.</i> , 2002a)	123	5	Duas e seis repetições em “tandem” de uma seqüência de 10 nucleótidos	

Pb- pares de bases; A-adenina; C-citosina; G-guanina; T-timina.

A diversidade genética, baseada na variação nucleotídica dos genes que codificam a mt(LSU)rRNA, a mt(SSU)rRNA, o gene *arom* e a DHPS, resulta num poder discriminatório relativamente baixo, com dois, cinco, quatro genótipos possíveis, respectivamente (quadro II). Por outro lado, as regiões ITS são o *locus* com maior poder discriminatório, devido ao elevado número de sequências distintas identificadas, até ao momento. De facto, a comparação entre a genotipagem ITS e a realizada em outros genes, como o mt(LSU)rRNA, o mt(SSU)rRNA e o DHPS, demonstra que as regiões ITS são o *locus* mais informativo e discriminatório, uma vez que podem ser observados diversos genótipos de ITS (Latouche *et al.*, 1997; Tsolaki *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 2001).

À semelhança de outros microrganismos, *Pneumocystis* possui três tipos de sequências transcriptas de rRNA, o 18S, o 5.8S e o 26S, e entre estes genes possui duas regiões ITS (figura 4). Mas, possui apenas uma cópia dos genes de rRNA (Tang *et al.*, 1998; Nahimana *et al.*, 2000). Em vários microrganismos, a sequência das regiões ITS tem sido utilizada em estudos filogenéticos e na avaliação da diversidade intra-específica, assim como tem contribuído para a caracterização genética de estirpes (Gaskell *et al.*, 1997; Gasser *et al.*, 1997; Peterson & Sigler 1998).

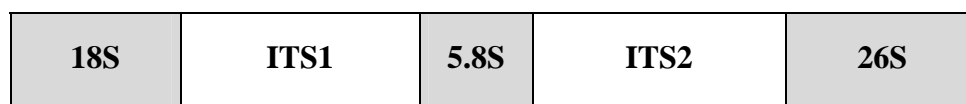


FIGURA 4. Representação esquemática da organização genómica dos genes que codificam o rRNA nuclear e das regiões ITS.

Em *P. jirovecii*, o estudo da variação genética das regiões ITS do rRNA nuclear de *P. jirovecii* foi documentado pela primeira vez em 1993 (Liu & Leibowitz, 1993). No ano seguinte (1994), Lu e colegas descreveram a ocorrência de várias formas genéticas diferentes nas regiões ITS1 e ITS2, por substituição ou deleção de nucleótidos, em diversas posições nucleotídicas. Inicialmente, os tipos de ITS1 foram designados por A, B e C e as sequências de ITS2 foram denominadas por a, b e c, tendo sido observados quatro tipos de combinações diferentes (Ac, Bb, Ba e Bc) nos 15 isolados de *P. jirovecii* estudados (Lu *et al.*, 1994). Mais tarde, Tsolaki e colegas (1996) observaram a existência de 10 tipos de ITS diferentes, em 24 episódios de PPC, em indivíduos seropositivos para VIH, tendo-os classificado como subtipos dos génotipos descritos anteriormente (por exemplo, A₁B₂).

Em 1998, num estudo de tipagem das regiões ITS em isolados de *P. jirovecii* recolhidos em nove países, incluindo Portugal, foi proposta uma nomenclatura alternativa, onde foram descritos novos génotipos de ITS identificados (Lee *et al.*, 1998). Neste esquema de classificação, actualizado em 2003 (Matos *et al.*, 2003a), na região ITS1 estão descritos 16 tipos diferentes, designados por letras maiúsculas de “A” a “P”, e a região ITS2 está classificada em 14 tipos distintos, designados por letras minúsculas de “a” a “n” (quadros III e IV). Estudos posteriores reportaram génotipos ITS1 e ITS2 adicionais, em isolados recolhidos nos E.U.A., em Itália e no Japão perfazendo um número total 27 tipos de ITS1 e 35 tipos de ITS2 (Hosoya *et al.*, 2000; Nimri *et al.*, 2002). Segundo a nomenclatura descrita por Lee e colaboradores (1998), estão identificados, até ao momento, 61 génotipos ITS, em vários estudos efectuados em diferentes regiões do mundo e, em Portugal foram descritos 17 destes 61 génotipos (Lee *et al.*, 1998; Matos, 1999; Helweg-Larsen *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2003).

QUADRO III. Sequência de nucleótidos dos genótipos da região ITS 1, do rRNA nuclear, de *P. jirovecii*, segundo a nomenclatura de Lee *et al.* (1998) e actualizada em Matos *et al.* (2003a).

Genótipo	Posição nucleotídica (pb)							
	ITS 1	6	12-15	21-28	34	42	53-54	80-81
A	C	TTTA	TT--CCCT	T	T	--	--	TTA
B	C	-TTA	TT--CCCT	T	T	--	--	TTA
C	C	-TTA	TT--CCCT	T	T	--	AG	TTA
D	C	TTTA	TT--CCCT	T	T	--	AG	TTA
E	T	-TTA	TT--CCCT	T	T	--	AG	TTA
F	T	-TTA	TT--CCCT	T	T	--	AG	---
G	T	-TTA	TT--CCCT	T	T	--	--	TTA
H	T	-TTA	TTTTCCCC	T	T	--	AG	TTA
I	T	-TTA	TT--CCCC	T	T	--	AG	TTA
J	T	-TTC	TT--CCCC	T	T	AT	AG	TTA
K	T	-TTCG	TT--CCCC	T	T	--	AG	TTA
L	T	-TTA	TT--CCCT	C	T	--	AG	TTA
M	T	-TTA	TT--CCCT	T	C	--	AG	TTA
N	T	-TTA	AT--CCCT	T	T	--	AG	TTA
O	T	TTTA	TT--CCCT	T	T	--	AG	TTA
P	T	-TTA	AT--CCCT	T	T	--	--	TTA

Pb- pares de bases; A-adenina; C-citosina; G-guanina; T-timina.

QUADRO IV. Sequência de nucleótidos dos genótipos da região ITS 2, do rRNA nuclear, de *P. jirovecii*, segundo a nomenclatura de Lee *et al.* (1998) e actualizada em Matos *et al.* (2003).

Genótipo	Posição nucleotídica (pb)								
	ITS 2	52-57	61-65	68-74	76	122	160	166-171	173
a	TAA---	AA-TA	AATATTT	-	-	G	ATATAT	G	-----
b	TAA---	AA-TA	AATATTT	-	-	G	--ATAT	G	-----
c	TAA---	AA-TA	AATATTT	-	C	T	--ATAT	G	-----
d	TAA---	AA-TA	AATATTT	-	C	G	--ATAT	G	-----
e	TAA---	AA-TA	AATATTT	-	-	G	----AT	G	-----
f	TAA---	AA-TA	AATATTT	T	-	G	----AT	A	-----
g	TAA---	AA-TA	AATAATT	-	-	G	----AT	A	-----
h	TAA---	AA--TA	AATATTT	-	-	G	----AT	A	-----
i/l	-----	AAATA	-----	-	-	G	----AT	A	-----
j	-----	-----	AATAATT	-	-	G	--ATAT	G	-----
k	-----	-----	AATAATT	-	-	G	----AT	A	CAAAATA
m	TAATAAT	AA--TA	AATAATT	-	-	G	----AT	A	-----
n	TAA-AT	AA--TA	AATAATT	-	-	G	-----	A	-----

Pb- pares de bases; A-adenina; C-citosina; G-guanina; T-timina.

6. APRESENTAÇÃO CLÍNICA DA PNEUMOCISTOSE

P. jirovecii é um microrganismo que causa pneumonia grave no Homem, dependendo a duração e a gravidade da infecção de diversos factores, em particular, do estado imunológico do hospedeiro. Assim, e dado que a evolução natural da infecção é muito variada, não existem manifestações clínicas patognomónicas da pneumocistose.

A presença de um pequeno número de microrganismos no pulmão ou um sistema imunitário intacto podem não ter consequências clínicas. Por outro lado, as infecções caracterizadas por um elevado número de parasitas podem causar sintomas e sinais, muito variados, nos diferentes hospedeiros. Contudo, as características da infecção por *P. jirovecii* podem ser confundidas com infecções concomitantes, em simultâneo, por outros microrganismos patogénicos ou por complicações da doença subjacente (Hughes, 1994).

6.1. PNEUMOCISTOSE PULMONAR

Dado o tropismo de *P. jirovecii* para o pulmão, as manifestações pulmonares são as mais frequentes na história natural da pneumocistose. No pulmão, *P. jirovecii* adere às células epiteliais do alvéolo pulmonar, os pneumócitos do tipo I, onde prolifera. Na ausência de tratamento, ocorre a destruição destas células, desencadeando-se um

processo inflamatório que provoca hipoxemia e pode conduzir à morte do hospedeiro, por insuficiência respiratória grave (Touze *et al.*, 1991).

O quadro clínico da pneumocistose pulmonar é caracterizado por diversos sintomas, sendo os mais comuns febre, tosse não produtiva e dispneia (Touze *et al.*, 1991; Bernard *et al.*, 1992; Moe & Hardy, 1994; Kovacs *et al.*, 2001). A evolução destes sintomas pode ser, particularmente, lenta nos doentes infectados por VIH, o que pode atrasar o diagnóstico (Kovacs *et al.*, 2001). O início da doença é caracterizado pelo aparecimento de febre, entre os 38°C e os 40°C, em mais de 80% dos casos, tosse, geralmente não produtiva, presente em 50% dos doentes, podendo ser acompanhada por expectoração em 20 a 30% dos doentes (Kovacs *et al.*, 1984). Em indivíduos com infecção por VIH, pode-se observar, também, emagrecimento, dor torácica, astenia e suores nocturnos (Engelberg *et al.*, 1984; Mayaud *et al.*, 1986). No período de estabelecimento da infecção pode ocorrer pneumonia intersticial, com dispneia progressiva, desenvolver em mais de 60% dos doentes (Kovacs *et al.*, 1984; Dohn & Frame, 1994).

O radiograma do tórax, característico de um doente com um quadro clínico compatível com PPc revela, na maior parte dos casos, um padrão de infiltrado intersticial difuso e bilateral (Kovacs *et al.*, 1984; Carette *et al.*, 1994). Contudo, em 10 a 20% dos casos, o exame radiológico pode apresentar-se normal (Kovacs *et al.*, 2001). Em alguns casos de PPc, a apresentação radiológica pode revelar-se atípica, estando a maioria relacionados com o uso da pentamidina em aerossol, na profilaxia da pneumocistose (Jules-Elysee *et al.*, 1990; Kennedy & Goetz, 1992). Nestes casos, podem-se observar infiltrados intersticiais localizados ou unilaterais (Kovacs *et al.*, 1984; De Lorenzo *et al.*, 1987; Carrete *et al.*, 1994), localizações apicais e pneumotórax

(De Lorenzo *et al.*, 1987; Afessa *et al.*, 1988; Kennedy & Goetz, 1992). Neste contexto, os padrões radiológicos atípicos podem-se dever à distribuição desigual da pentamidina no pulmão, o que pode facilitar a disseminação de *Pneumocystis*, em áreas menos aerossolizadas.

Numa fase posterior da doença, pode-se observar insuficiência respiratória grave, com polipneia, cianose, taquicardia e hipóxia-hipocápnia por bloqueio alveolo-capilar.

Nos doentes com infecção por VIH, a pneumocistose estabelece-se de modo insidioso e podem decorrer várias semanas até ao aparecimento da sintomatologia, o que pode significar atraso do diagnóstico da PPc. Inicialmente, os sintomas são discretos, com tosse seca, dispneia e hipoxemia (não ultrapassa os 60 mm Hg) e os sinais radiológicos são tardios (Kovacs *et al.*, 1984; Mayaud *et al.*, 1986; Dohn & Frame *et al.*, 1994).

No indivíduo imunocomprometido, sem infecção por VIH, a sintomatologia da pneumocistose é semelhante à apresentada pelo indivíduo com infecção por VIH, mas mais exuberante. Nestes doentes, a infecção evolui, rapidamente, em alguns dias, para a insuficiência respiratória aguda (Kovacs *et al.*, 1984; Mayaud *et al.*, 1986; Dohn & Frame, 1994).

6.2. PNEUMOCISTOSE EXTRAPULMONAR

Apesar das manifestações pulmonares serem as mais frequentes, no curso natural da infecção por *P. jirovecii*, a presença deste microrganismo tem vindo a ser descrita em outros órgãos, o que sugere a disseminação sistémica, a partir do pulmão (Cohen *et al.*,

1991; Touze *et al.*, 1991; Bernard *et al.*, 1992; Moe & Hardy, 1994; Ng *et al.*, 1997). A disseminação da infecção por *P. jirovecii* pode ocorrer em casos de profunda imunossupressão, em doentes que não sujeitos a profilaxia ou tratados com pentamidina em aerossol (Dieterich *et al.*, 1992; Grasland *et al.*, 1997).

Localizações extrapulmonares da infecção por *Pneumocystis* já foram descritas nos gânglios linfáticos, no aparelho auditivo, no globo ocular, no fígado, no baço, no coração, na medula óssea, na tiróide, no córtex cerebral, nos rins, no aparelho gastrointestinal e na pele (Hennessey *et al.*, 1991; Bellomo *et al.*, 1992; Bierhoff *et al.*, 1996; Manfredi *et al.*, 1998; Kinchen *et al.*, 1998; Patel *et al.*, 1999; Guan *et al.*, 2001; Hagmann *et al.*, 2001; Sundar *et al.*, 2001; Praveen *et al.*, 2002; Zamuco & Yang, 2005). Apesar de, geralmente, a infecção extrapulmonar por *Pneumocystis* ocorrer em simultâneo com a doença pulmonar, já foram descritos casos de localização extrapulmonar exclusiva (Ellison *et al.*, 1995; Terris *et al.*, 1996; Bundow & Aboulafia, 1997).

7. DIAGNÓSTICO DA PNEUMOCISTOSE

7.1. DIAGNÓSTICO PRESUNTIVO

O diagnóstico presuntivo da pneumocistose pulmonar é fundamentado no quadro clínico, nos testes de função pulmonar e na gasimetria arterial, em repouso e após exercício, nos exames radiológicos e em exames laboratoriais inespecíficos. Estes elementos são úteis, no entanto, não confirmam o diagnóstico de pneumocistose.

A apresentação clínica da pneumocistose pulmonar está relacionada com a doença imunossupressora subjacente. De facto, nos doentes com infecção por VIH, o intervalo de tempo que medeia o momento do contágio e o início da sintomatologia é maior, o que torna o diagnóstico, nestes doentes, mais difícil, do que naqueles com outras imunodeficiências (Baughman, 1994).

Os testes de função pulmonar revelam, em cerca de 80% dos doentes, hipoxemia ou, pelo menos, aumento do gradiente de oxigénio alvéolo-arterial (Baughman, 1994).

Apesar de não existir um padrão radiológico característico de pneumocistose, o exame radiológico do tórax é útil nos doentes imunocomprometidos com sintomatologia respiratória (Opravil *et al.*, 1994). A apresentação radiológica clássica da pneumocistose é um padrão intersticial bilateral (Crans & Boiselle, 1999; Boiselle *et al.*, 1999), caracterizado por opacidades reticulonodulares bilaterais. No entanto, o padrão

radiológico pode variar em função da doença imunossupressora subjacente, do grau de imunossupressão e da presença de outras infecções concomitantes (Fishman, 1994).

No caso do radiograma do tórax se apresentar normal ou equívoco, a tomografia computadorizada de alta resolução pode revelar-se útil, dada a sua elevada sensibilidade.(Crans & Boiselle, 1999). Os testes de medicina nuclear como a cintigrafia com tecnécio (^{99m}Tc), que documenta a variação da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar, ou com citrato de gálio (^{67}Ga), que localiza lesões inflamatórias, podem, também, ser utilizados (Fishman, 1994; Stern *et al.*, 1996; Asai, 1998).

Entre os testes laboratoriais inespecíficos, encontra-se o doseamento da desidrogenase láctica no soro (LDH, do inglês “lactate dehydrogenase”), que aumenta no início da infecção. Contudo, este exame, apesar de muito sensível, não é específico da Ppc, podendo, no entanto, ser útil na avaliação do prognóstico e da resposta à terapêutica (Kagawa *et al.*, 1988; Zaman & White, 1988; Grover *et al.*, 1992; Fernandez *et al.*, 1995; Quist & Hill, 1995; Butt *et al.*, 2002).

Em relação aos testes sero-imunológicos, estes apresentam pouco interesse no diagnóstico da pneumocistose, uma vez que a percentagem de portadores de anticorpos anti-*Pneumocystis* é, na população em geral, muito elevada. Por outro lado, a detecção de antígenos no soro, por contra-imuno-electroforese ou por ELISA, tem, também, pouco valor diagnóstico, devido à sua reduzida sensibilidade (McNabb *et al.*, 1988).

7.2. DIAGNÓSTICO DEFINITIVO

O diagnóstico definitivo da pneumocistose assenta na identificação do microrganismo em amostras de secreções pulmonares ou em biopsias de tecido pulmonar, uma vez que o quadro clínico da pneumocistose não é patognomónico, permitindo, apenas, o diagnóstico presuntivo.

7.2.1 Amostras clínicas

As amostras clínicas utilizadas no diagnóstico da pneumocistose podem ser classificadas em amostras obtidas por técnicas invasivas, como a biopsia pulmonar ou o lavado bronco-alveolar (LBA), e em amostras obtidas por técnicas não invasivas, como a expectoração, induzida (EI) ou espontânea, as secreções brônquicas (SB), o aspirado nasofaríngeo ou o lavado oral (LO).

Inicialmente, o estudo cito-histológico de um fragmento de biopsia pulmonar era o único método disponível na detecção de *P. jirovecii*, para o diagnóstico da pneumocistose pulmonar. Esta técnica permite a identificação de *P. jirovecii* em mais de 90% dos casos de infecção e está indicada, quando o LBA é negativo, mas se mantém a suspeita de pneumocistose (Baughman, 1994).

A análise do LBA permite a detecção de *Pneumocystis* em mais de 80% dos casos, sendo a sua recolha efectuada por broncoscopia com fibroscópio, no lobo médio (Gosey *et al.*, 1985). Dada a sua grande sensibilidade, este é o método mais utilizado no diagnóstico da pneumocistose pulmonar. Em crianças, quando não é possível recolher o

líquido do LBA, procede-se à lavagem e aspiração dos brônquios principais, para a recolha das SB.

O estudo da EI, obtida pela inalação de um soro salino a 1,8%, durante 10 a 15 minutos, com um nebulizador ultrassónico, que promove a transudação e a exfoliação traqueobrônquicas, é um método não invasivo para a recolha de secreções pulmonares, para estudo microbiológico. Este método permite a detecção de *P. jirovecii* em 30 a 70% dos casos de infecção, após a coloração com corantes não específicos (Zaman *et al.*, 1988; Ng *et al.*, 1989). Quando associada à técnica de imunofluorescência (IF), com anticorpos monoclonais (AcM) anti-*Pneumocystis*, detecta entre 50 a 90% dos casos de infecção (Kovacs *et al.*, 1986; Baughman *et al.*, 1989; Ng *et al.*, 1990; Matos *et al.*, 1995). A liquefacção da amostra de expectoração, com um agente mucolítico, como o ditiotreitól, e posterior aplicação de uma técnica de coloração específica, contribui, largamente, para a elevada sensibilidade desta técnica de diagnóstico não invasiva (Zaman *et al.*, 1988).

Ao longo dos últimos anos, alguns estudos avaliaram, também, a utilidade do LO, quando estudado por técnicas de PCR, no diagnóstico da pneumocistose (Wakefield *et al.*, 1993; Helweg-Larsen *et al.*, 1997, 1997a, 1998; Matos *et al.*, 2001). O LO, obtido por gargarejamento com um soro salino, permite a detecção de *P. jirovecii* com uma sensibilidade e uma especificidade entre 75-89% e 91-100%, respectivamente (Wakefield *et al.*, 1993; Helweg-Larsen *et al.*, 1998). Por outro lado, este tipo de amostra, obtida por técnicas não invasivas, pode, também, ser muito útil na monitorização da eficácia do tratamento anti-*P. jirovecii* e na realização de estudos epidemiologia e de genotipagem (Tsolaki *et al.*, 1999).

7.2.2. Métodos citoquímicos de coloração

Os métodos citoquímicos de coloração, descritos para detecção de *Pneumocystis*, dividem-se nos que coram a parede dos quistos, mas não o seu conteúdo ou os trofozoítos, e nos que coram os trofozoítos e corpos intraquísticos, mas não os quistos.

A técnica de coloração pela metenamina prata, descrita por Gomori e modificada por Grocott (1955), é considerada como a técnica de referência, no diagnóstico da pneumocistose, corando a parede do quisto. A parede do quisto fica corada de cinzento escuro, num fundo cinza esverdeado claro, e os quistos aparecem com forma redonda ou oval, com 4 a 7 µm. No entanto, para além de ser uma técnica morosa e onerosa, requer um técnico experiente para a sua leitura, uma vez que, também, cora leveduras, que ficam com aspecto semelhante a *Pneumocystis*. Outras técnicas, como a coloração pelo azul de toluidina (Gosey *et al.*, 1985) e pelo calcoflúor (Baselski *et al.*, 1990), coram, também, a parede quística, mas à semelhança do método anterior não são específicas.

A coloração pelo Giemsa permite detectar os trofozoítos e os corpos intraquísticos (Holten-Andersen & Kolmos, 1989). Apesar desta técnica ser de execução rápida e permitir a identificação de outros microrganismos, a sua leitura é difícil, requerendo um técnico experiente para a sua observação. Por este método, os trofozoítos são difíceis de reconhecer e de diferenciar dos restantes fragmentos celulares.

7.2.3. Métodos imunofluorescentes de coloração

Com o intuito de superar a baixa especificidade, e aumentar a sensibilidade, dos métodos citoquímicos, foram desenvolvidas técnicas de coloração com compostos

imunofluorescentes, com AcM, que reconhecem proteínas na parede celular de qualquer estágio do ciclo de vida de *Pneumocystis*.

Em 1986, a IF começou a ser usada na detecção de *P. jirovecii* (Kovacs *et al.*, 1986, Linder *et al.*, 1986), tendo sido considerada mais sensível que os métodos convencionais, como a metenamina prata ou o Giemsa (Kovacs *et al.*, 1986, 1988; Elvin *et al.*, 1988; Baughman *et al.*, 1989; Ng *et al.*, 1990, 1990a; Matos *et al.*, 1995) ou, pelo menos, tão sensível como este (Lautenschlager *et al.*, 1996). Nesta técnica, os anticorpos utilizados ligam-se a antígenos de superfície de *Pneumocystis*, podendo ser utilizados, de forma a aumentar a especificidade da IF, antígenos que não estão completamente acessíveis à superfície do parasita, mas que podem ser expostos, através da digestão parcial da parede do quisto (Lautenschlager *et al.*, 1996). Com a técnica de IF, os quistos e trofozoítos apresentam-se corados de verde fluorescente. Os quistos têm forma redonda ou oval, com 4 a 7 μm , e os trofozoítos são polimórficos, com 1 a 5 μm .

Actualmente, a técnica de imunofluorescência indirecta (IFI) com AcM é a mais utilizada no diagnóstico de *P. jirovecii* (Elvin, 1994).

7.2.4. Métodos moleculares

Ao longo da última década, o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular tem contribuído, largamente, para o diagnóstico das doenças infecciosas, permitindo a identificação de infecções com um reduzido número de microrganismos, em amostras clínicas, de colheita não invasiva.

A amplificação, *in vitro*, de DNA, por PCR, permite detectar DNA específico de um determinado microrganismo, em amostras clínicas e do ambiente. Para além de ser uma técnica muito sensível e específica, a PCR apresenta várias vantagens, como a

possibilidade de processamento de um elevado número de amostras, em simultâneo, e a facilidade de interpretação dos resultados.

No início da década de 90, do século passado, foram descritos os primeiros protocolos para a detecção de DNA específico de *Pneumocystis*, que consistiam na amplificação de um fragmento, que codifica o rRNA mitocondrial (Wakefield *et al.*, 1990, 1990a). Desde então, foram descritos vários métodos de PCR para a identificação de *Pneumocystis*, tendo por alvo diversos genes. Estes métodos permitem a detecção de *Pneumocystis* em amostras de LBA, EI, expectoração espontânea, SB, LO, aspirados nasofaríngeos, soro, sangue e amostras do ambiente (por exemplo, água e ar) (Wakefield *et al.*, 1990, 1991; Leigh *et al.*, 1992; Bartlett *et al.*, 1996; Wakefield, 1996; Bartlett *et al.*, 1997; Casanova-Cardiel & Leibowitz, 1997; Atzori *et al.*, 1995; Caliendo *et al.*, 1998; Olsson *et al.*, 1998; Sing *et al.*, 1999a; Matos, 1999; Matos *et al.*, 2000, 2001; Nevez *et al.*, 2001).

Ao longo dos últimos anos, têm sido descritos vários protocolos de PCR, que amplificam diversos fragmentos de DNA do genoma de *Pneumocystis*, como o rRNA mitocondrial (Wakefield *et al.*, 1990, 1990a), as regiões ITS dos genes que codificam o rRNA nuclear (Lu *et al.*, 1994), o gene que codifica a subunidade 5S do rRNA nuclear (Kitada *et al.*, 1991, 1991a; Oka *et al.*, 1993), um fragmento da sequência que codifica a enzima TS (Olsson *et al.*, 1993), de entre outros.

Devido à sensibilidade elevada da técnica de PCR, a sua aplicação à detecção de *P. jirovecii*, para além de um método importante no diagnóstico da pneumocistose, pode, também, contribuir para a monitorização dos doentes sob terapêutica ou profilaxia e para a detecção de portadores assintomáticos.

Recentemente, a técnica de PCR em tempo real, que permite quantificar o DNA amplificado, ao longo dos ciclos de amplificação, tem sido aplicada à detecção de *P. jirovecii* em amostras clínicas (Flori *et al.*, 2004; Brancart *et al.*, 2005; Strutt & Smith, 2005; Arcenas *et al.*, 2006). Devido à elevada sensibilidade desta técnica, é possível detectar um número muito pequeno de microrganismos, em doentes com pneumocistose ou em portadores assintomáticos, sendo, por isso, muito útil na aplicação ao diagnóstico da pneumocistose, na identificação de casos de colonização por *P. jirovecii* e em estudo de genotipagem (Larsen *et al.*, 2002; Totet *et al.*, 2003a; Ndam *et al.*, 2003).

Em 2000, em resultado de estudos efectuados em culturas *in vitro* de *Pneumocystis*, alguns autores verificaram que este eucariota não sintetizava a S-adenosilmetionina, uma molécula importante nas reacções de metilação e síntese das poliaminas, necessitando, por isso, de recolher este metabolito do ambiente extracelular (Merali *et al.*, 2000). Mais tarde, os mesmos autores sugeriram que a medição da concentração de S-adenosilmetionina, no plasma, poderia ser utilizada como método de diagnóstico da pneumocistose (Skelly *et al.*, 2003; Merali & Clarkson., 2004). De facto, os estudos efectuados verificaram que a concentração média deste metabolito em indivíduos saudáveis era de 106 nmol/L, em indivíduos com suspeita de pneumocistose era de 8 nmol/L e que não era detectada em doentes com PPc (Skelly *et al.*, 2003). Posteriormente, nos doentes com pneumocistose, após tratamento, a concentração de S-adenosilmetionina aumentava para níveis semelhantes aos dos indivíduos saudáveis. A variação da concentração deste metabolito, em função da ausência ou não de infecção, sugere que este método possa ser bastante útil, no diagnóstico e na avaliação da resposta à terapêutica anti-*P. jirovecii*.

8. TRATAMENTO E PROFILAXIA DA PNEUMOCISTOSE

Antes da pandemia da SIDA, a pneumocistose era uma doença pouco frequente, circunscrita a algumas populações de doentes, e as opções terapêuticas eram insuficientes. Nos anos 50, do século passado, o primeiro fármaco a ser utilizado no tratamento da pneumocistose foi a pentamidina, administrada por via parentérica (Ivády & Páldy, 1958), seguida da pirimetamina-sulfadiazina, utilizada pela primeira vez nos anos 60 (Frenkel *et al.*, 1966), e do TMP-SMX, nos anos 70 (Hughes *et al.*, 1974; Hughes *et al.*, 1977). Posteriormente, o desenvolvimento de métodos de cultura de *Pneumocystis*, impulsionou o estudo do efeito de novos fármacos no desenvolvimento e biologia deste parasita (Cushion *et al.*, 1985; Cushion *et al.*, 1985a).

A redução do crescimento de *Pneumocystis* foi demonstrada, através da inibição de enzimas importantes do seu metabolismo, como, a DHFR (Edman J.C. *et al.*, 1989; Kovacs *et al.*, 1990), a DHPS (Kovacs *et al.*, 1989), a TS (Edman U. *et al.*, 1989), a ornitina descarboxilase (Lipschik *et al.*, 1991), a topoisomerase (Dykstra & Tidwell, 1991) e a β -1,3-glucano sintetase (Schmatz *et al.*, 1991).

8.1. TRATAMENTO ETIOLÓGICO

O principal fármaco utilizado no tratamento da pneumocistose é o cotrimoxazol, uma combinação de TMP-SMX, que actua sobre a via biossintética do ácido fólico. O SMX, assim como outros fármacos da família das sulfas (por exemplo, a dapsona e a sulfadiazina), inibe a enzima DHPS, que catalisa a formação do ácido dihidropteroico, a partir do ácido *para*-aminobenzóico e da pteridina. O TMP, também actua sobre a via biossintética do folato, inibindo a enzima DHFR que catalisa a reacção de formação do ácido tetrahidrofólico, a partir do ácido dihidrofólico (figura 5).

A eficácia de tratamento varia entre 70 e 90%, em função da sua duração (Hughes *et al.*, 1978; Shelhamer *et al.*, 1984; Haverkos *et al.*, 1984; Hughes *et al.*, 1993). Os efeitos secundários associados ao uso do cotrimoxazol surgem, geralmente, entre o sétimo e o 14º dia de tratamento e incluem febre, exantema, prurido, náuseas, vómitos, hipotensão, leucopenia, anemia, insuficiência renal, citólise hepática e, raramente, trombocitopenia (Moe & Hardy, 1994).

As reacções adversas são, geralmente, mais frequentes nos doentes seropositivos para VIH, e são controladas pela redução da posologia ou por tratamento sintomático, podendo, no entanto, levar à interrupção do tratamento (Gordin *et al.*, 1984).

Nos doentes com pneumocistose, que desenvolvem reacções adversas ao TMP-SMX, ou que não respondem à terapêutica com este fármaco, o tratamento alternativo utilizado é, geralmente, a pentamidina. A pentamidina é uma diamidina aromática, utilizada no tratamento de infecções por protozoários, como *Trypanosoma brucei gambiense*, *Leishmania donovani* e *Babesia canis*.

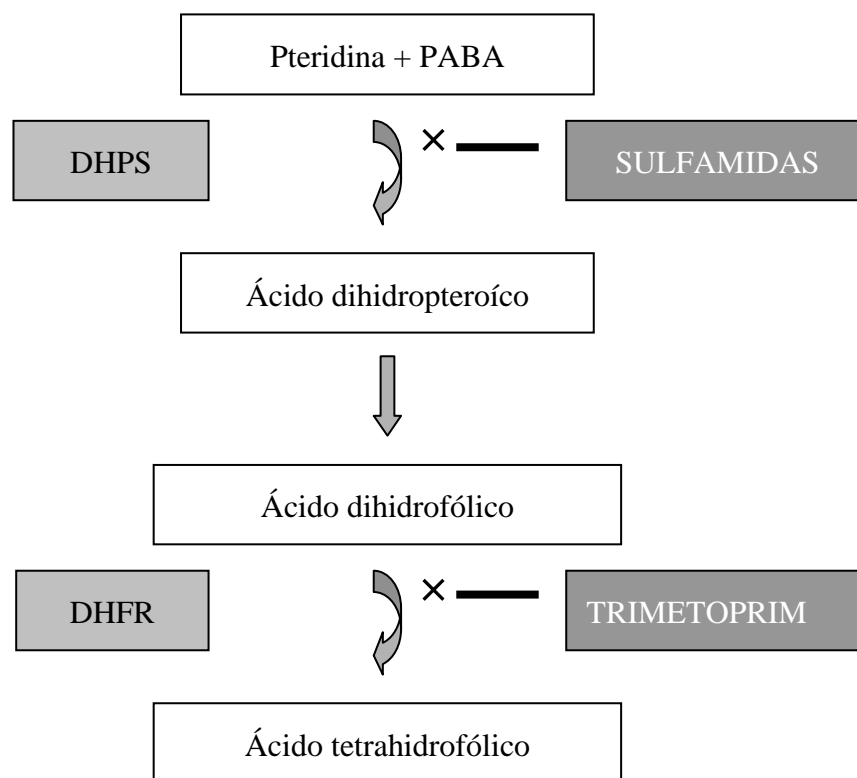


FIGURA 5. Representação esquemática da inibição da via biossintética do ácido fólico, pelas sulfamidas e TMP. PABA; ácido *para*-aminobenzoico; DHPS, dihidropteroato sintetase; DHFR, dihidrofolato reductase.

De preferência, a pentamidina é administrada por via intravenosa, podendo ser, também, usada por via intramuscular, durante 21 dias. Este fármaco possui uma eficácia semelhante à do TMP-SMX, de 70 a 95% (Sattler *et al.*, 1988), podendo os doentes desenvolverem efeitos secundários, como hipoglicemia, azotemia, pancreatite aguda, hipocalcemia, leucopenia e, raramente, trombocitopenia, hipotensão ortostática, arritmia cardíaca, náuseas e vômitos. Alguns destes efeitos secundários, podem ser reversíveis,

após a redução da dose (Sattler *et al.*, 1988). Com o objectivo de reduzir a sua toxicidade, foi experimentada a administração da pentamidina em aerossol. Desta forma, a pentamidina seria dirigida, directamente, para o pulmão afectado, evitando a absorção sistémica e, conseqüentemente, o desenvolvimento de reacções adversas (Conte & Golden, 1988).

Para os casos de hipersensibilidade ao TMP-SMX ou à pentamidina, ou quando os doentes não respondem a qualquer uma destas terapêuticas, outros fármacos são utilizados no combate à infecção por *P. jirovecii*. A associação da dapsona com o TMP é utilizada no tratamento da pneumocistose de gravidade ligeira a moderada (Medina *et al.*, 1990; Safrin *et al.*, 1994). A combinação primaquina-clindamicina é também recomendada, à semelhança da combinação dapsona-TMP, no tratamento de casos de pneumocistose menos graves (Black *et al.*, 1994; Toma *et al.*, 1998; Smego *et al.*, 2001).

A atovaquona, uma hifroxinaftoquinona, inibe o transporte de electrões no complexo do citocromo bc1 e, conseqüentemente, a síntese *de novo* das pirimidinas (Ittarat *et al.*, 1995). A atovaquona, administrada por via oral, durante 21 dias, é recomendada, apenas, nos casos de PPc de gravidade ligeira a moderada.

O trimetrexato, um inibidor da DHFR, é administrado, em conjunto com ácido fólico (leucovorina), nos casos de pneumocistose, quando os doentes não toleram o TMP-SMX, e é necessário proceder ao seu tratamento por via intravenosa (Masur, 1992; Sattler *et al.*, 1994).

8.2. TRATAMENTO ADJUVANTE COM CORTICOSTERÓIDES

Nos doentes com pneumocistose de gravidade moderada a severa, definida por um valor da pressão arterial de oxigénio (PaO_2) inferior a 70 mm Hg ou um valor do gradiente de oxigénio artério-alveolar menor que 35 mm Hg, deve ser administrada corticoterapia o mais cedo possível, até 72 horas após o início do tratamento da PPc (Centers for Disease Control and Prevention, 2004). A administração de corticosteróides é recomendada com o objectivo de reduzir ou prevenir a hipoxemia e melhorar o prognóstico em termos da função pulmonar e sobrevivência (Bozzette, 1990; Bozzette *et al.*, 1990). Os corticosteróides diminuem a inflamação e reduzem a fibrose pulmonar, travando, assim, a afluência de células mononucleares nos locais de infecção (Masur, 1992).

8.3. PROFILAXIA

Antes do uso alargado da profilaxia contra a pneumocistose e do uso da HAART, a PPc ocorria em 70 a 80% dos doentes, com infecção VIH/SIDA (Phair *et al.*, 1990). Desde então, a frequência desta doença diminuiu, significativamente, até valores de incidência, para a Europa Ocidental e os E.U.A , de dois a três casos por cada 100 pessoas/ano (Furrer *et al.*, 1999).

A profilaxia pode ser estabelecida com o intuito de evitar a infecção primária (primeiro episódio) ou secundária (recaída). A profilaxia primária é indicada para adultos e adolescentes infectados por VIH, incluindo mulheres grávidas, e os que estão

sob HAART, que tenham contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior a 200 células/ μ l ou história de candidíase orofaríngea (Centers for Disease Control and Prevention, 1989, 2004; Phair *et al.*, 1990; Kaplan *et al.*, 1998). Os doentes infectados por VIH, com contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior a 14% e com outra doença definidora de SIDA, mas sem outro critério de qualificação, devem, também, ser sujeitos a profilaxia (Centers for Disease Control and Prevention, 1989, 2004; Phair *et al.*, 1990; Kaplan *et al.*, 1998). Quando não é possível monitorizar a contagem de linfócitos TCD4⁺, por um período igual ou superior a três meses, deve ser considerada a prescrição de profilaxia anti-*P. jirovecii* se a última contagem tiver sido superior a 200 células/ μ l, mas inferior a 250 células/ μ l (Kaplan *et al.*, 1998).

A profilaxia primária pode, no entanto, ser interrompida se os doentes responderem com sucesso à HAART, aumentando a sua contagem de linfócitos TCD4⁺ para um valor superior a 200 células/ μ l, por período superior a três meses (Kaplan *et al.*, 2002; Masur *et al.*, 2002). Nos variados estudos que suportam esta recomendação, a maioria dos doentes estava sob a HAART, com inclusão, na combinação terapêutica, de um inibidor da protease, e a maioria dos doentes mantinha uma contagem de linfócitos TCD4⁺ superior a 200 células/ μ l, em média superior a 300 células/ μ l, por mais de três meses, (Furrer *et al.*, 1999; Kirk *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1999; Weverling *et al.*, 1999; Dworkin *et al.*, 2000; Mussini *et al.*, 2000; Yangco *et al.*, 2000; Furrer *et al.*, 2001; Lopez Bernaldo de Quiros *et al.*, 2001).

A profilaxia secundária é indicada, de forma vitalícia, para os doentes, com infecção por VIH, que tiveram episódios anteriores de pneumocistose. No entanto, esta pode ser interrompida no caso dos doentes que tiveram um aumento do valor de contagem de linfócitos TCD4⁺ superior a 200 células/ μ l, por um período igual ou

superior a três meses, em resultado da HAART (Kaplan *et al.*, 2002; Masur *et al.*, 2002). De facto, nos estudos efectuados que sustentam esta recomendação, a maioria dos doentes mantinha a contagem de linfócitos TCD4⁺ superior a 200 células/ μ l, em média superior a 300 células/ μ l, por mais de três meses (Kirk *et al.*, 1999; Dworkin *et al.*, 2000; Soriano *et al.*, 2000; Ledergerber *et al.*, 2001; Lopez Bernaldo de Quiros *et al.*, 2001). Se, posteriormente, ocorrer um episódio de PPc, em doentes com contagem de linfócitos TCD4⁺ superior a 200 células/ μ l, é recomendada a instituição de profilaxia vitalícia, independente do valor da contagem de linfócitos TCD4⁺ (Kaplan *et al.*, 2002; Masur *et al.*, 2002).

O TMP-SMX é o fármaco de primeira escolha para a profilaxia, primária e secundária, da pneumocistose (Center for Diseases Control and Prevention, 1989, 2004; Schneider *et al.*, 1992; Bozzette *et al.*, 1995; Schneider *et al.*, 1995). Nos doentes que desenvolvem reacções adversas ao TMP-SMX, a pentamidina em aerossol é uma alternativa eficaz e bem tolerada (Schneider *et al.*, 1992). A profilaxia da PPc, com pentamidina em aerossol, resulta, por vezes, caso o doente desenvolva pneumocistose pulmonar, numa apresentação clínica pouco comum, com um padrão radiológico de infiltrados locais ou nos lobos superiores, carga parasitária menor, o que pode dificultar o seu diagnóstico, como já foi referido anteriormente.

Outros regimes profilácticos alternativos incluem a dapsona (Bozzette *et al.*, 1995), sendo a combinação dapsona e pirimetanina, em conjunto com ácido fólico (leucovorina), recomendada nos doentes com serologia da toxoplasmose positiva e contagem linfócitos TCD4⁺ inferior a 100 células/ μ l (Girard *et al.*, 1993; Opravil *et al.*, 1995; Podzamczar *et al.*, 1995).

9. ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE *P. JIROVECI* AO COTRIMOXAZOL

Apesar do decréscimo da incidência da pneumocistose, como resultado da profilaxia anti-*P. jirovecii* e da HAART, esta continua a ser uma das infecções oportunistas definidoras de SIDA comum, assim como a mais frequente em doentes com infecção por VIH, na Europa e nos E.U.A. (Kaplan *et al.*, 2000).

O uso alargado do TMP-SMX, na profilaxia e tratamento da pneumocistose, durante quase 30 anos, em conjunto com relatos da ocorrência desta doença em indivíduos sob profilaxia anti-*P. jirovecii*, tem suscitado algumas questões acerca do desenvolvimento de resistência por parte deste parasita ao TMP-SMX (Epstein *et al.*, 1994). Nos últimos anos, um número cada vez maior de microrganismos tem desenvolvido resistência ao TMP-SMX, provavelmente, relacionada com o seu uso alargado na profilaxia da pneumocistose (Martin *et al.*, 1999; Wininger & Fass, 2002). De facto, até a exposição de curta duração ao TMP-SMX pode ser associada ao desenvolvimento de resistências, como foi demonstrado em doentes com cistite aguda causada por *Escherichia coli* (Brown *et al.*, 2002). Também, a prevalência de *Staphylococcus aureus* e de algumas enterobactérias resistentes ao TMP-SMX, em doentes hospitalizados aumentaram, significativamente, de menos de 5,5% de isolados, antes de 1986, até 20% em 1995, à medida que a profilaxia com o TMP-SMX foi aumentando nos doentes com infecção por VIH (Martin *et al.*, 1999). Para além disso, o

aumento do número de microrganismos resistentes foi, significativamente, mais elevado em amostras obtidas de doentes com infecção por VIH, onde os isolados resistentes aumentaram de 6,3%, em 1988, para 53%, em 1995. Também, outros autores, verificaram o aumento significativo do número de microrganismos resistentes, nos doentes tratados com TMP-SMX, em comparação com os doentes que não estavam sob a acção deste fármaco (Wininger & Fass, 2002).

Estudos no modelo animal demonstram que a maior parte da actividade anti-*Pneumocystis* do TMP-SMX é devida ao SMX (Walzer *et al.*, 1992). De facto, o desenvolvimento de resistência às sulfas pode resultar do insucesso do SMX, assim como da dapsona, uma sulfona utilizada, também, no tratamento e profilaxia da pneumocistose. Os fármacos da família das sulfas actuam interferindo na via biossintética do ácido fólico (*vide* figura 5). Ao contrário do que acontece nas células de mamíferos, que possuem sistemas de transporte do ácido fólico, do meio extracelular para o intracelular, a maioria dos procariotas e alguns eucariotas têm que sintetizar o folato *de novo* (Skold, 2000). Assim, como as células dos mamíferos não possuem a DHPS, as sulfas podem, selectivamente, inibir o crescimento de vários microrganismos.

A resistência às sulfas pode desenvolver-se através de variados mecanismos. Na maioria das bactérias entéricas Gram-negativo, a resistência às sulfamidas está, geralmente, relacionada com formas do gene da DHPS mutantes, de elevada divergência genética, presentes no genoma plasmídico (Huoniven *et al.*, 1995). Também, alterações cromossómicas no *locus* da DHPS, como mutações pontuais, inserções ou duplicação de aminoácidos e alterações maiores da sequência, como resultado de recombinação, podem conduzir ao desenvolvimento de resistência (Huoniven, 2001). Em alguns microrganismos, podem coexistir múltiplos mecanismos

de resistência, identificados em diversas estirpes. Por exemplo, em algumas estirpes de *Neisseria meningitidis* o gene da DHPS possui 10% de divergência genética, que se pensa ser devida a recombinação genética (Huoniven *et al.*, 1995), enquanto que outras estirpes de *Neisseria* adquiriram uma inserção cromossômica, que resultou na adição de dois aminoácidos à sequência da DHPS (Qvarnstrom & Swedberg, 2000). Em outros microrganismos, como *E. coli* e *Plasmodium falciparum*, mutações pontuais, não sinónimas, que resultam na alteração de aminoácidos na sequência da DHPS, podem conduzir ao desenvolvimento de resistência às sulfas (Dallas *et al.*, 1992; Brooks *et al.*, 1994). Para além disso, a acumulação de mutações diferentes, ao longo do tempo, pode levar a níveis cada vez maiores de resistência às sulfas, à semelhança do que acontece em *P. falciparum* (Nzila *et al.*, 2000).

9.1. POLIMORFISMOS NO GENE DA DHPS DE *P. JIROVECII*

No início dos anos 90, do século passado, o gene da DHPS de *P. jirovecii* foi sequenciado e verificou-se que este faz parte de um gene único responsável pela síntese do ácido fólico, que codifica uma proteína trifuncional composta pela DHPS, a dihidroneopterina aldolase e a hidroximetildihidropterina pirofosfocinase (Volpe *et al.*, 1992, 1993, 1995). Mais tarde, em 1997, foram identificadas seis substituições nucleotídicas pontuais, em zonas conservadas da sequência do gene da DHPS de *P. jirovecii* (Lane *et al.*, 1997).

As mutações mais frequentes, identificadas no gene da DHPS de *P. jirovecii*, consistem em duas substituições pontuais, não sinónimas, nas posições nucleotídicas

165 (adenina para guanina) e 171 (citosina para timina) que resultam na alteração dos aminoácidos nas posições 55 (treonina para alanina) e 57 (prolina para serina) (Mei *et al.*, 1998; Kazanjian *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2003a). Assim, diferentes genótipos podem ser identificados, em função da presença ou ausência de um dos polimorfismos (quadro V).

QUADRO V. Genótipos observados no gene da DHPS de *P. jirovecii*.

GENÓTIPOS DA DHPS DE <i>P. JIROVECII</i>	CODÃO 55	CODÃO 57
Genótipos simples		
Selvagem	Treonina	Prolina
Mutação no codão 55	Alanina	Prolina
Mutação no codão 57	Treonina	Serina
Mutação nos codões 55 e 57	Alanina	Serina
Genótipos mistos		
Selvagem e mutante no codão 57	Treonina	Prolina e serina
Selvagem e mutante no codão 55	Treonina e alanina	Prolina
Selvagem e mutante nos codões 55 e 57	Treonina e alanina	Prolina e serina

Até ao momento, vários estudos, sugerem que a exposição às sulfas possa estar a exercer um efeito de pressão selectiva sobre o gene da DHPS de *P. jirovecii*, uma vez que os doentes com pneumocistose, sujeitos à profilaxia ou ao tratamento com sulfas, tinham maior probabilidade de apresentar mutações do que aqueles não expostos a estes antibióticos (Kazanjian *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Kazanjian *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Visconti *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002). Estas

mutações, eram raramente identificadas em isolados clínicos anteriores ao início dos anos 90, do século passado (Kazanjian *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Kazanjian *et al.*, 2000). Também, as mutações no gene da DHPS não foram identificadas em *Pneumocystis* isolado de outros mamíferos, habitualmente não expostos a estes antibióticos (Lane *et al.*, 1997; Demanche *et al.*, 2002).

Vários factores sugerem que as mutações observadas podem causar resistência às sulfas. A região do gene da DHPS de *P. jirovecii*, onde foram identificadas as mutações é bastante conservada entre vários microrganismos, como *P. falciparum*, *Streptococcus pneumoniae*, *E. coli* e *Bacillus subtilis* (Lane *et al.*, 1997).

Também, com base na homologia com a sequência do gene da DHPS de *E. coli*, estas substituições pontuais parecem estar num local activo da enzima, envolvido na ligação ao substrato, logo às sulfas (Achari *et al.*, 1997). Assim, as substituições de aminoácidos, observadas nesta região, podem resultar em alterações na estrutura da proteína, que, por sua vez, pode interferir na ligação ao substrato e na actividade da enzima. Da mesma forma, mutações pontuais similares foram identificadas em posições equivalentes a este local activo em outros microrganismos, nomeadamente, em *P. falciparum* (Brooks *et al.*, 1994) e *Mycobacterium leprae* (Kai *et al.*, 1999). Outras mutações localizadas perto deste local activo também causam resistência em *S. pneumoniae* e *P. falciparum* (Lane *et al.*, 1997).

Para além disso, a análise genética de vários *loci* de *P. jirovecii* sugere que as mutações observadas no gene da DHPS surgem de forma independente em vários tipos de *Pneumocystis* o que sustenta a teoria de que a exposição às sulfas pode seleccionas as mutações do gene da DHPS (Ma *et al.*, 2001).

Actualmente, a impossibilidade de ter um método de cultura eficaz e reprodutível de *P. jirovecii* impede o uso de testes de susceptibilidade *in vitro* aos fármacos. De facto, a inexistência de um método de cultura impede, também, o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos com actividade anti-*Pneumocystis*, o que realça a actual dependência do cotrimoxazol, como principal agente na profilaxia e tratamento da pneumocistose. Assim, o significado clínico destas mutações, no gene da DHPS, só pode ser inferido da correlação entre o quadro clínico e a presença de polimorfismos, em doentes com PPc.

9.1.1. Associação da presença das mutações no gene da DHPS e a exposição às sulfas

Ao longo dos últimos anos, alguns estudos avaliaram a existência de associação significativa entre o uso de TMP-SMX ou dapsona na profilaxia da pneumocistose, em doentes com infecção por VIH, e a presença de mutações no gene da DHPS (quadro VI) (Kazanjian *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Kazanjian *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Visconti *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002; Nahimana *et al.*, 2003). Outros estudos, estenderam estas observações ao uso de pirimetamina, combinada com sulfadoxina, na profilaxia da PPc (Nahimana *et al.*, 2003a) e demonstraram a reversão do genótipo mutante para selvagem após a interrupção da administração de TMP-SMX (Miller *et al.*, 2003a). No total, os estudos efectuados analisam episódios de pneumocistose, decorridos entre 1976 e 2003, e incluem dados de doentes e amostras clínicas, de diversos países.

QUADRO VI. Prevalência de mutações no gene da DHPS de *P. jirovecii*, em doentes imunocomprometidos com PPc, e a associação com a exposição aos fármacos da família das sulfas.

Estudo	Período de tempo, país	Mutações DHPS/casos de PPc	Mutações DHPS/doentes com exposição às sulfas	Mutações DHPS/doentes sem exposição às sulfas	P
Kazanjian <i>et al.</i> , 1998	1976-1997, E.U.A.	7/27 (26%)	5/7 (71%)	2/20 (10%)	0.0032
Helweg-Larsen <i>et al.</i> , 1999	1989-1999, Dinamarca	31/152 (20%)	18/29 (62%)	13/123 (11%)	0.022
Ma <i>et al.</i> , 1999	1985-1998, E.U.A.	16/37 (43%)	11/16 (69%)	3/15 (20%)	<0.0001
Beard <i>et al.</i> , 2000	1995-1998, E.U.A.	152/220 (69%)	n.a.	n.a.	n.a.
Kazanjian <i>et al.</i> , 2000	1991-1997, E.U.A.	42/97 (43%)	28/37 (76%)	14/60 (23%)	<0.001
Huang <i>et al.</i> , 2000	1996-1999, E.U.A.	76/111 (69%)	57/71 (80%)	19/40 (48%)	<0.001
Takahashi <i>et al.</i> , 2000	1994-1999, Japão	6/24 (25%)	n.a.	n.a.	n.a.
Visconti <i>et al.</i> , 2001	1992-1997, Itália	7/20 (35%)	4/5 (80%)	3/15 (20%)	0.031
Ma <i>et al.</i> , 2002	1994-2000, Itália	9/107 (8%)	6/31 (19,4%)	3/76 (3,9%)	0.017
Costa <i>et al.</i> , 2003a	1994-2001, Portugal	24/89 (27%)	6/17 (35,5%)	19/73 (25%)	0.39
Latouche <i>et al.</i> , 2003	1998-2001, França	16/92 (17,4%)	2/15 (13,3%)	12/73 (16,4%)	0.55
Zingale <i>et al.</i> , 2003	1996-2002, Itália	28/70 (40%)	21/29 (72,4%)	4/35 (11,4%)	<0.0001
Kazanjian <i>et al.</i> , 2004	1983-2001, EUA	58/145 (40%)	n.a.	n.a.	n.a.
	1998-2001, China	1/15 (7%)			
Zar <i>et al.</i> , 2004	África do Sul	4/30 (13,3%)	n.a.	n.a.	n.a.
Robberts <i>et al.</i> , 2005	2000-2003, África do Sul	2/53 (3,8%)	n.a.	n.a.	n.a.

“n.a.”—Não aplicável.

Na maioria dos estudos realizados, a presença de mutações no gene da DHPS de *P. jirovecii* estava, estatisticamente, associada à exposição a fármacos da família das sulfas, como o TPM-SMX ou a dapsona (Kazanjian *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Kazanjian *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Visconti *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002; Nahimana *et al.*, 2003). Da mesma forma, na maior parte dos estudos, as mutações no gene da DHPS detectaram-se, também, em doentes que não foram expostos às sulfas, para a profilaxia ou o tratamento da PPC. Entre os 26 doentes, com diagnóstico recente de infecção por VIH, a quem nunca tinha sido prescrita profilaxia para a pneumocistose, 14 (54%) apresentavam mutações no gene da DHPS (Huang *et al.*, 2000). Neste estudo, realizado nos E.U.A., verificou-se que a cidade de residência dos doentes era factor preditivo independente associado ao risco dos isolados de *Pneumocystis* apresentarem mutações no gene da DHPS. Os doentes que viviam em Seattle e em São Francisco apresentavam um risco três e cinco vezes superior, respectivamente, dos isolados de *P. jirovecii* revelarem mutações no gene da DHPS, do que os que viviam em Atlanta. (Huang *et al.*, 2000, 2001)

Nos estudos efectuados, verificou-se que a presença de mutações, em doentes sem exposição prévia ao TMP-SMX ou à dapsona, a ausência de mutações semelhantes em *Pneumocystis* isolado de outras espécies de mamíferos e, ainda, o impacto da geografia no genótipo da DHPS têm importantes implicações na transmissão de *P. jirovecii*, nomeadamente, na evidência de transmissão pessoa-a-pessoa (Beard *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2001; Demanche *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2003a; Crothers *et al.*, 2003; Latouche *et al.*, 2003).

9.1.2. Importância clínica das mutações no gene da DHPS de *P. jirovecii*

Apesar dos resultados que sugerem a relação entre a exposição às sulfas e o aparecimento de mutações no gene da DHPS, a resistência fenotípica, não está ainda caracterizada. Alguns investigadores têm estudado o efeito das mutações do gene da DHPS na evolução clínica da pneumocistose, nomeadamente, o insucesso terapêutico ou a morte devido à pneumocistose (Kazanjian *et al.*, 1998; Mei *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Kazanjian *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000; Visconti *et al.*, 2001; Navin *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002). No entanto, permanece por esclarecer se as mutações no gene da DHPS conferem resistência fenotípica ao tratamento com TMP-SMX.

Numa análise multivariada, Helweg-Larsen e colegas (1999) demonstraram que as mutações DHPS podiam ser um factor preditivo independente associado ao aumento da mortalidade provocada pela pneumocistose. Nesse estudo, os doentes infectados com *P. jirovecii*, que apresentavam mutações no gene da DHPS, tinham um risco três vezes superior de morrerem, num período de três meses, após o diagnóstico de pneumocistose, quando comparados com doentes com genótipo selvagem da DHPS. No entanto, 63% dos doentes, com isolados mutantes, responderam, com sucesso, ao tratamento com TMP-SMX.

Em 2000, Kazanjian e colegas observaram a presença de mutações no gene da DHPS associada ao aumento do risco de insucesso do tratamento com TMP-SMX. Numa análise univariada, os doentes com pneumocistose, a quem tinha sido identificado *P. jirovecii*, com DHPS mutante, apresentavam risco de insucesso terapêutico com TMP-SMX duas vezes superior ao dos doentes infectados com *P. jirovecii* com DHPS de tipo selvagem. Neste estudo, o insucesso terapêutico foi definido como o

agravamento do quadro clínico da pneumocistose, após sete dias de tratamento, a incapacidade de melhoria após 10 dias, ou a alteração do regime terapêutico, por agravamento do quadro clínico. Assim, os doentes que estavam a responder com êxito ao tratamento, mas a quem foi alterado o regime terapêutico, devido a reacções adversas, foram considerados como tratados com sucesso.

Em contraste com os estudos anteriores, Navin e colegas (2001) não observaram a associação entre a presença de mutações no gene da DHPS e o aumento da mortalidade associada à pneumocistose, nem com o insucesso no tratamento da PPc. Entre os 66 doentes com DHPS de *P. jirovecii* mutante, tratados com TMP-SMX, 56 (85%) responderam com sucesso à terapêutica.

9.2. POLIMORFISMOS NO GENE DA DHFR DE *P. JIROVECII*

Actualmente, como não existe evidência inequívoca da correlação entre a resistência ao TMP-SMX e a presença das mutações no gene da DHPS, alguns autores estudam a sequência do gene da DHFR de *P. jirovecii*, de forma a avaliar o papel da divergência genética observada no potencial desenvolvimento de resistência a este fármaco. De facto, as mutações pontuais observadas no gene da DHFR são um importante mecanismo de resistências aos fármacos, em vários microrganismos, nomeadamente, em *P. falciparum*, *S. aureus* e *S. pneumoniae* (Dale *et al.*, 1997; Maskell *et al.*, 2001; Khalil *et al.*, 2003).

No entanto, em *P. jirovecii*, existem poucos estudos a avaliar da diversidade genética da DHFR e, até ao momento, a maioria deles não conseguiu demonstrar a

associação entre a exposição ao TMP-SMX, na profilaxia e tratamento da pneumocistose, e a presença de mutações no gene da DHFR (Ma *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2002a; Nahimana *et al.*, 2004). Num estudo efectuado, 97% (36/37) amostras apresentaram sequências do gene da DHFR do tipo selvagem, com uma única amostra a exhibir uma substituição nucleotídica sinónima, isto é, que não resulta na alteração da sequência de aminoácidos da respectiva proteína (Ma *et al.*, 1999). Num segundo trabalho, 59% dos doentes estudados apresentavam mutações no gene da DHFR, tendo sido identificados, em 16 doentes, polimorfismos sinónimos e, em dois doentes, foram detectados polimorfismos não sinónimos, ou seja, que resultam na alteração da sequência de aminoácidos correspondente (Takahashi *et al.*, 2002a). No entanto, nenhuns dos doentes, com substituições não sinónimas, tinham sido, previamente, expostos a inibidores da DHFR e, ambos, foram tratados com TMP-SMX, com sucesso.

Em 2004, Nahimana e colegas identificaram 19 polimorfismos no gene da DHFR em 18 doentes com PPC, sendo 16 substituições não sinónimas e três substituições sinónimas. Das 16 alterações de aminoácidos identificadas, seis estavam localizadas em regiões conservadas do gene da DHFR. Neste estudo, os doentes sujeitos a profilaxia com um inibidor da DHFR (TMP ou pirimetamina) tinham maior probabilidade de apresentarem polimorfismos não sinónimos neste gene, quando comparados com os doentes que não recebiam profilaxia com inibidores da DHFR.

Actualmente, estão identificados 19 polimorfismos não sinónimos e cinco polimorfismos sinónimos distintos (quadro VII) (Takahashi *et al.*, 2002a; Nahimana *et al.*, 2004; Robberts *et al.*, 2005). No entanto, apenas um grupo de investigadores, demonstrou uma associação significativa entre a presença de mutações no gene da

DHFR e a resistência aos fármacos utilizados na profilaxia e no tratamento da pneumocistose (Nahimana *et al.*, 2004).

QUADRO VII. Polimorfismos identificados no gene da DHFR de *P. jirovecii*.

POLIMORFISMOS	SEQUÊNCIA DE DNA	SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDOS		
Sinónimos	A 36 G			
	T 277 C			
	C 278 T			
	T 312 C			
	T 540 C			
Não sinónimos	A 40 G	Treonina	14	Alanina
	C 77 A	Prolina	26	Glutamina
	T 107 A	Fenilalanina	36	Cisteína
	G 110 C	Serina	37	Treonina
	G 156 A	Metionina	52	Isoleucina
	C 175 G	Arginina	59	Glicina
	A 188 G	Ácido glutâmico	63	Glicina
	T 194 C	Leucina	65	Prolina
	C 200 T	Alanina	67	Valina
	G 235 A	Valina	79	Isoleucina
	T 358 C	Serina	106	Prolina
	A 422 G	Ácido glutâmico	127	Glicina
	A 472 G	Tirosina	144	Alanina
	A 500 T	Ácido aspártico	153	Valina
	A 514 G	Isoleucina	158	Valina
	A 539 G	Cisteína	166	Tirosina
	A 550 C	Arginina	170	Glicina
	A 553 G	Lisina	171	Ácido glutâmico
	T 632 C	Tirosina	197	Leucina

A-adenina; C-citosina; G-guanina; T-timina.

A investigação realizada, ao longo dos últimos anos, no âmbito da resistência de *P. jirovecii* ao cotrimoxazol, conduziu a progressos importantes no que diz respeito ao desenvolvimento de resistências aos fármacos, ao conhecimento da diversidade intra-específica deste parasita, assim como, dos mecanismos envolvidos na sua transmissão.

Contudo, muitas questões permanecem por esclarecer, nomeadamente, no que se refere ao papel dos genótipos mutantes, dos genes da DHPS e da DHFR, no desenvolvimento do insucesso da profilaxia e terapêutica anti-*P. jirovecii*, e, também, à caracterização fenotípica dos isolados com sequências mutantes, em particular, no desenvolvimento de resistência clínica ao cotrimoxazol.

Apesar do declínio que se observa na incidência da pneumocistose, existe ainda um elevado número de indivíduos um risco de desenvolverem PPC, em particular, nos países em vias de desenvolvimento, onde o acesso à HAART e à profilaxia da anti-*P. jirovecii* é, ainda, limitado. Sendo, por isso, importante aprofundar o potencial desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol, em *P. jirovecii*, o que possibilitará, no futuro, empreender diferentes estratégias na prevenção e controlo da pneumocistose.

SEGUNDA PARTE

**Estudo da resistência de *P. jirovecii* ao cotrimoxazol em
doentes com infecção VIH/SIDA**

CAPÍTULO I

OBJECTIVOS

I. OBJECTIVOS

Actualmente, apesar dos vários estudos efectuados, na Europa e nos E.U.A., permanece, ainda, por esclarecer a base genética do desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol, utilizado na prevenção da pneumocistose. Os diversos estudos realizados sugerem que as mutações descritas nos genes da DHPS e da DHFR de *P. jirovecii* possam contribuir para o desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol.

Por outro lado, alguns estudos efectuados, que incidem na caracterização genética das regiões ITS do gene de rRNA nuclear de *P. jirovecii*, demonstram a importância deste *locus* no estudo da transmissão e da epidemiologia da pneumocistose, e sugerem que este *locus* possa ser utilizado como um potencial marcador de virulência, entre outras características clínicas.

Assim, no presente estudo, pretendeu-se:

- i) Determinar a frequência de detecção de *P. jirovecii*, através de técnicas parasitológicas e moleculares, em doentes imunocomprometidos com sintomatologia respiratória, no período de 2001 a 2004.
- ii) Aperfeiçoar a detecção do gene da DHPS de *P. jirovecii*, através da redução da contaminação por DNA não-alvo e pela descrição de uma técnica de PCR “nested”.
- iii) Caracterizar, geneticamente, isolados de *P. jirovecii*, obtidos de doentes imunocomprometidos, em três regiões genómicas independentes – os genes da DHPS e da DHFR e as regiões ITS do gene de rRNA nuclear.

- iv) Estudar a associação entre os genótipos identificados nos três *loci* analisados e algumas variáveis epidemiológicas e clínicas, como o período de estudo, a idade, a serologia para VIH, o valor de pressão arterial de oxigénio, o radiograma do tórax, a contagem de linfócitos TCD4⁺ e o uso de profilaxia anti-*P. jirovecii*.
- v) Estudar a associação dos os vários genótipos entre si, com o objectivo de identificar a combinação de alelos, mais frequente, e relacioná-la com as variáveis epidemiológicas e clínicas estudadas (o período de estudo, a idade, a serologia para VIH, o valor de pressão arterial de oxigénio, o radiograma do tórax, a contagem de linfócitos TCD4⁺ e o uso de profilaxia anti-*P. jirovecii*).

Com o presente estudo, esperamos contribuir para o melhor conhecimento da variabilidade genética de *P. jirovecii*, na população imunocomprometida, em Portugal, e desta forma permitir a clarificação da base genética do potencial desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol ao *P. jirovecii*. Para além disso, o estudo da diversidade genética de *P. jirovecii* em doentes imunocomprometidos permite, também, contribuir para o estudo da epidemiologia da pneumocistose, em particular, no esclarecimento da transmissão da infecção por *P. jirovecii*.

CAPÍTULO II

MATERIAL E MÉTODOS

1. POPULAÇÃO ESTUDADA

Entre Março de 2001 e Outubro de 2004, foram recolhidas 403 amostras de secreções pulmonares de 314 doentes, com sintomatologia respiratória, provenientes de vários hospitais da área metropolitana de Lisboa e, também, das regiões do Alto e Baixo Alentejo. As 403 amostras recolhidas, compreendendo 257 expectorações induzidas, 143 lavados bronco-alveolares, dois lavados orais e uma secreção brônquica, foram submetidas a técnicas parasitológicas e moleculares para a detecção de *P. jirovecii*.

1.1. ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS GENÓTIPOS

Para determinar a estabilidade dos genótipos, identificados nos três *loci* a ser estudados, foram analisadas secreções pulmonares seriadas de doentes internados, recolhidas no dia zero (na altura do diagnóstico, antes do tratamento) e nos dias 10 e 21 após o início do tratamento anti-*P. jirovecii*.

1.2. ESTUDO RECTROSPECTIVO

Para além das amostras recolhidas entre Março de 2001 e Outubro de 2004, foram incluídos, no estudo de caracterização genética, 30 isolados de *P. jirovecii*, cuja identificação, efectuada por técnicas parasitológicas e moleculares, foi anterior ao início do presente trabalho. Estes isolados foram recolhidos entre 1995 e 2000 e encontravam-se conservados a -80°C , após o processamento das amostras (Matos, 1999).

2. PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Para a realização do presente trabalho, foram estudadas amostras de secreções pulmonares enviadas para a Unidade de Protozoários Oportunistas/VIH e Outras Protozooses, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical, para o diagnóstico da pneumocistose. As amostras de secreções pulmonares, à chegada ao laboratório, foram processadas de imediato e os esfregaços foram efectuados em lâminas de microscopia, que eram tratadas previamente com poli-L-lisina.

2.1. TRATAMENTO DAS LÂMINAS DE MICROSCOPIA COM POLI-L-LISINA

A poli-L-lisina é uma molécula que adere à superfície das lâminas de microscopia, conferindo uma carga eléctrica negativa, o que promove melhor adesão do material celular. Para tal, as lâminas de vidro de microscopia foram, previamente, lavadas numa solução de álcool ácido a 1% (álcool etílico e ácido acético). Depois de secas, as lâminas foram colocadas num banho de poli-L-lisina (Sigma) a 1:10, em água desionizada estéril, durante cinco minutos, à temperatura ambiente. Após o banho, as lâminas foram secas à temperatura ambiente.

2.2. EXPECTORAÇÃO INDUZIDA (EI) E SECREÇÃO BRÔNQUICA (SB)

Devido à natureza mucosa deste tipo de amostras, foi necessário proceder à liquefacção prévia das mesmas. Assim, foi adicionado, à amostra, igual volume de ditioneitol (Sigma), a 0,1% em água desionizada e esterilizada, seguindo-se agitação vigorosa e incubação a 37°C, durante 30 minutos. A amostra liquefeita foi transferida para um tubo de centrífuga, adicionou-se tampão fosfato salino (PBS, do inglês

"phosphate saline buffer", pH 7,2) e centrifugou-se a 4.100 g, durante 20 minutos. O sobrenadante foi rejeitado e o sedimento foi ressuspensado em 0,5 ml de PBS. Uma gota da amostra (25-50 µl) foi aplicada em cinco lâminas, pré-tratadas com poli-L-lisina e deixou-se secar, à temperatura ambiente. Após a fixação com acetona, durante 10 minutos, as lâminas foram conservadas a -20°C e o restante sedimento foi conservado a -80°C, para posterior estudo por PCR.

2.3. LAVADO BRONCO-ALVEOLAR (LBA)

Inicialmente, a amostra de LBA foi centrifugada a 4.100 g, durante 20 minutos. O sobrenadante foi rejeitado, aproveitando-se 0,5 ml para ressuspender o sedimento obtido. Uma gota da amostra (25-50 µl) foi aplicada em cinco lâminas, pré-tratadas com poly-L-lisina e deixou-se secar, à temperatura ambiente. Após fixação com acetona, durante 10 minutos, as lâminas foram conservadas a -20°C e o restante sedimento foi conservado a -80°C, para posterior estudo por PCR.

2.4. LAVADO ORAL (LO)

A amostra de LO foi, previamente, filtrada através de uma gaze, de forma a eliminar quaisquer detritos alimentares existentes. Em seguida, este tipo de amostra foi processada da mesma forma que o LBA.

3. IDENTIFICAÇÃO PARASITOLÓGICA

O diagnóstico parasitológico consistiu na visualização de quistos de *P. jirovecii* através da técnica de imunofluorescência indirecta (IFI) com anticorpos monoclonais (AcM). Após o diagnóstico parasitológico, as amostras foram conservadas a -80°C , para posterior estudo por PCR.

3.1. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA COM ANTICORPOS MONOCLONAIS

(MonoFluo Kit *P. carinii*, BioRad)

Esta técnica baseia-se na detecção de *P. jirovecii*, através dos seus antígenos de superfície, utilizando AcM específicos. Para tal, são efectuadas duas reacções de ligação antígeno-anticorpo. Na primeira reacção, o AcM, produzido no rato, liga-se ao antígeno de superfície de *P. jirovecii* e na segunda reacção o anticorpo anti-rato, marcado com fluoresceína, liga-se ao anticorpo anti-*P. jirovecii*.

De acordo com as instruções do fabricante, aplicaram-se 20 μl de enzima diluída sobre uma lâmina de microscopia, com um esfregaço de secreções pulmonares fixado com acetona, e incubou-se em câmara húmida durante 30 minutos, a 37°C . Posteriormente, aplicou-se o AcM específico e deixou-se a reagir com a amostra durante 15 minutos, a 37°C , em câmara húmida. De seguida, juntou-se o conjugado isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês “Fluoresceine isothiocyanate”)– anticorpo anti-rato (IgM), que reagiu com a amostra durante 15 minutos, a 37°C , em câmara húmida. Por último, uma gota de glicerina tamponada foi colocada sobre o esfregaço corado, sendo este coberto com uma lamela de vidro, e a lâmina foi observada num microscópio de fluorescência ,no comprimento de onda de 475 nm. A identificação

dos quistos foi efectuada com base na cor verde fluorescente que estes adquirem e nas suas características morfológicas.

A carga parasitária foi estimada por contagem do número de quistos observados nos esfregaços efectuados, a partir das secreções pulmonares (quadro VIII).

QUADRO VIII. Quantificação da carga parasitária das amostras positivas, por IFI-AcM, para *P. jirovecii*.

CARGA PARASITÁRIA	N.º QUISTOS
Baixa (+)	1 a 3 (em 30 campos com ampliação de 1000×)
Moderada (++)	4 a 30 (em 30 campos com ampliação de 1000×)
Elevada (+++)	2 ou mais (em um campo com ampliação de 1000×)

4. FILTRAÇÃO E EXTRACÇÃO DE DNA GENÓMICO TOTAL

4.1. MICROFILTRAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SECREÇÕES PULMONARES

Com o objectivo de proceder à remoção do DNA do hospedeiro, foi efectuado um método de microfiltração, antes da extracção de DNA, em 40 amostras de secreções pulmonares (21 expectorações induzidas e 19 lavados bronco-aveolares) recolhidas, entre Outubro de 2001 e Abril de 2002.

Antes de se proceder à extracção do DNA genómico, as amostras foram divididas em duas alíquotas. Uma alíquota de cada amostra foi filtrada com os filtros Mitex LCWP 25-mm (Millipore) e o filtrado foi centrifugado a $4.100 \times g$, durante 20 minutos. De seguida, foram efectuadas duas lavagens com PBS. Posteriormente, procedeu-se à extracção do DNA genómico, nas amostras filtradas e não filtradas, pelo método do Mini-BeadBeeter / tiocianato de guanidina-sílica.

4.2. EXTRACÇÃO DE DNA, PELO MÉTODO DE MINI-BEADBEETER/ TIOCIANATO DE GUANIDINA-SÍLICA

O DNA genómico total de *P. jirovecii*, foi isolado a partir dos quistos presentes nas secreções pulmonares, pelo método Mini-BeadBeeter/tiocianato de guanidina-sílica. Este processo constituiu o ponto de partida para a realização da PCR e restantes técnicas de biologia molecular, que permitiram a detecção e caracterização genética de *P. jirovecii*.

Esta técnica, adaptada de Boom *et al.* (1990) e de McLauchlin *et al.* (2000), consiste na lise mecânica dos quistos, por agitação vigorosa com partículas de zircónio, seguida de um protocolo, que envolve a adsorção do DNA a partículas de sílica activada, a lavagem com um tampão e dois solventes orgânicos e, por fim, a eluição, em água desionizada estéril.

Um mililitro de amostra foi centrifugado a $23.100 g$, durante 10 minutos, e 300 μl do sedimento obtido foram adicionados a 900 μl de tampão de lise (tiocianato de guanidina 7 M; Tris-HCl 50 mM pH 6,4; EDTA 25 mM pH 8,0; Triton X-100 1,5% v/v), 60 μl de álcool isoamílico e 0,3 g de partículas de zircónio com 0,5 mm de

diâmetro (Biospec Products). Após forte agitação, num aparelho Mini-BeadBeater (Biospec Products), o sobrenadante foi transferido para um microtubo de 1,5 ml, ao qual já haviam sido adicionados 25–35µl de uma solução aquosa de sílica activada (1%, pH 2,0). O sobrenadante e a sílica activada foram incubados, à temperatura ambiente, num agitador rotativo, a velocidade moderada e constante, durante uma hora. Em seguida, para sedimentar a sílica com o DNA adsorvido, foi efectuada uma centrifugação de 15 segundos a 23.100 g e desprezado o sobrenadante resultante. Posteriormente, foram realizadas cinco lavagens, duas com tampão de lavagem (tiocianato de guanidina 7 M, Tris-HCl 50 mM pH 6,4), duas com etanol a 80% a –20°C e, por fim, uma com acetona. Cada lavagem consistiu na ressuspensão da sílica no tampão ou solvente apropriados, centrifugação a 23.100 g, durante 10 segundos, e rejeição do sobrenadante resultante. Após a lavagem com acetona, a sílica sedimentada foi incubada a 55°C, até completa evaporação daquele solvente. A eluição do DNA foi feita por ressuspensão da sílica em 50 µl de água desionizada estéril e incubação a 60°C, durante 5 minutos. Após uma centrifugação a 23.100 g, durante 2 minutos, o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para um microtubo de 1,5 ml estéril e armazenado a –20°C.

4.3. QUANTIFICAÇÃO DO DNA GENÓMICO TOTAL

Com o objectivo de avaliar a presença de DNA do hospedeiro, nas amostras de secreções pulmonares, o DNA genómico total, extraído de 24 amostras de secreções pulmonares (12 expectorações induzidas e 12 lavados bronco-alveolares), foi quantificado com o “GeneQuant” (Amersham Biosciences), de acordo com as

instruções do fabricante. De seguida, foi calculado o valor da razão (R) entre a concentração de DNA total e a carga parasitária de cada amostra, sendo o valor de DNA medido, em cada amostra, dividido pela sua carga parasitária.

A quantificação do DNA genómico total foi realizada no laboratório do Departamento de Genética, da Faculdade de Ciências Médicas, da Universidade Nova de Lisboa, sob a orientação do Professor Doutor Jorge Gaspar.

5. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR

5.1. AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO rRNA MITOCONDRIAL DE *P. JIROVECI*

As amostras negativas, pela técnica de IFI-AcM, foram submetidas à detecção de DNA específico de *P. jirovecii*. A identificação molecular de *P. jirovecii* foi efectuada por amplificação de um fragmento (263 pb) do gene que codifica a mt(LSU)rRNA por PCR “nested”(Wakefield *et al*, 1990; Tamburrini *et al*, 1996; Matos, 1999). Na PCR “nested”, foram utilizados os pares de oligonucleótidos iniciadores externos, pAZ 102-E e pAZ 102-H, e internos, pAZ 102-X e pAZ 102-Y, descritos no quadro IX.

QUADRO IX. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial de *P. jirovecii*.

PCR (fragmento amplificado, pb)	OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
1ª PCR (346)	pAZ 102-E pAZ 102-H	5- GATGGCTGTTTCCAAGCCCA- 3' 5'- GTGTACGTTGCAAAGTACTC- 3'	Wakefield <i>et al.</i> , 1990; Tamburrini <i>et al.</i> ,
2ª PCR (263)	pAZ 102-X pAZ 102-Y	5'- GTGTACGTTGCAAAGTACTC- 3' 5'- TCACTTAATATTAATTGGGGAGC- 3'	1996; Matos, 1999

Pb-pares de bases.

As reacções de PCR sofreram alguns acertos, em relação ao descrito anteriormente (Matos, 1999), nomeadamente, na concentração de cloreto de magnésio ($MgCl_2$) e dos oligonucleótidos iniciadores e na adição de albumina de soro bovino (BSA, do inglês “bovine serum albumin”).

Para cada amostra, foi preparada uma mistura reaccional de 50 μ l contendo 1 \times tampão de reacção (160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20; Bioline), 0,8 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 10 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, pAZ 102-E e pAZ 102-H (MWG Biotech), 2,5 mM de $MgCl_2$ (Bioline), 0,75 U de Biotaq™ DNA polymerase (Bioline), 0,5 μ g de BSA (Sigma), 2 μ l de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. Na segunda PCR, 2 μ l do DNA amplificado foi adicionado à mistura reaccional, idêntica à primeira, diferindo apenas nos oligonucleótidos iniciadores utilizados (pAZ 102-X e pAZ 102-Y).

Em cada reacção de amplificação foi incluído um controlo positivo, que consistia numa suspensão de DNA de *P. jirovecii*, e um controlo negativo para monitorizar a existência de contaminação por DNA exógeno, composto por todos os componentes da mistura reaccional, à excepção do DNA, que foi substituído por água desionizada estéril. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador "T1 Thermocycler" (Biometra), segundo as condições térmicas descritas no quadro X.

QUADRO X. Condições térmicas de amplificação por PCR do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial de *P. jirovecii*.

PCR	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO		N.º CICLOS
1ª PCR	Desnaturação inicial	94°C, 3 min	40
	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 1,5 min; 55°C, 1,5 min; 72°C, 2 min	
	Extensão final	72°C, 10 min	
2ª PCR	Desnaturação inicial	94°C, 3 min	40
	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 1,5 min; 55°C, 1,5 min; 72°C, 2 min	
	Extensão final	72°C, 10 min	

Mín-minutos.

5.2. AMPLIFICAÇÃO DE UM FRAGMENTO DO GENE DA β -GLOBINA HUMANA

No conjunto de 40 amostras de secreções pulmonares, sujeitas ao processo de microfiltração, descrito anteriormente, foi efectuada a monitorização da presença de DNA humano. Para tal, procedeu-se à amplificação de um fragmento (268 pb) do gene

que codifica a β -globina humana por PCR (Saiki *et al.*, 1986; Bauer, H. M. *et al.*, 1991; Matos, 1999), com as sequências iniciadoras BG1 e BG2, descritas no quadro XI.

Para cada amostra, foi preparada uma mistura reaccional de 50 μ l contendo 1 \times tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20; Bioline), 0,8 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 25 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, BG1 e BG2 (MWG Biotech), 1 mM de MgCl₂ (Bioline), 0,75 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), 0,5 μ g de BSA (Sigma), 5 μ l de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final.

QUADRO XI. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR do gene que codifica a β -globina humana.

PCR (fragmento amplificado, pb)	OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
β -globina (268 pb)	BG1	5- CAACTTCATCCACGTTACC - 3'	Saiki <i>et al.</i> , 1986; Bauer, H. M. <i>et al.</i> , 1991; Matos, 1999
	BG2	5'- GAAGAGCCAAGGACAGGTAC - 3'	

Pb-pares de bases.

Em cada reacção de amplificação foi incluído um controlo positivo, que consistia numa suspensão de DNA humano, cedida pelo Professor Doutor Jorge Gaspar (Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa), e um controlo negativo para monitorizar a existência de contaminação por DNA exógeno, composto por todos os componentes da mistura reaccional, à excepção do DNA, que foi

substituído por água desionizada estéril. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador "T1 Thermocycler" (Biometra), segundo as condições térmicas descritas no quadro XII.

QUADRO XII. Condições térmicas de amplificação por PCR do gene que codifica a β -globina humana.

PCR	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO		N.º CICLOS
	Desnaturação inicial	94°C, 3 min	
β -globina	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min	35
	Extensão final	72°C, 10 min	

Min-minutos.

5.3. VISUALIZAÇÃO DO DNA AMPLIFICADO

O DNA amplificado, por PCR, foi submetido a electroforese em gel de agarose SeaKem[®] LE (FMC BioProducts) a 2%, em tampão TAE (Tris-Acetato 0,04 M; EDTA 0,001 M; pH 8,3), onde foi incorporado brometo de etídio (Sigma), numa concentração final de 0,5 μ g/ml. Em paralelo com o DNA, foi efectuada a electroforese de um marcador de pesos moleculares, o "100 bp Ladder" (Fermentas), para identificação do tamanho dos produtos de PCR.

Antes da aplicação no gel, 1 μ l de tampão de aplicação (Fermentas) foi adicionado a cada 10 μ l de amostra de DNA. Da mesma forma, 1 μ l de tampão de aplicação (Fermentas) foi adicionado a 1 μ l de marcador molecular e a 9 μ l de água

desionizada estéril. A separação electroforética foi efectuada a 60 volts (V), durante, aproximadamente, uma hora. Os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados sob luz ultravioleta (UV), por emissão de fluorescência do brometo de etídio intercalado no DNA, num transiluminador “Eagle Eye[®] II” (Stratagene). A imagem do gel foi fotografada e processada pelo software “Still Video System” (Stratagene).

6. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS DE *P. JIROVECI*

A caracterização genética dos isolados de *P. jirovecii*, identificados por métodos parasitológicos e moleculares, foi efectuada em três regiões genómicas, nomeadamente, nos genes que codificam as enzimas DHPS e DHFR e as regiões ITS do rRNA nuclear.

Para o estudo da heterogeneidade genética da DHPS, após amplificação do DNA, por PCR, as amostras foram sujeitas a hidrólise com endonucleases de restrição (RFLP, do inglês “restriction fragment length polymorphism”). Em alguns fragmentos amplificados do gene da DHPS, foi efectuada, também, a sequenciação directa do DNA, para confirmação dos resultados da análise de RFLP, e para a identificação de novos polimorfismos.

Para a caracterização genética da DHFR e das regiões ITS, o DNA amplificado por PCR foi sequenciado e, em alguns casos, foi efectuada a clonagem dos produtos de PCR, seguida de sequenciação de DNA.

O DNA de todos os isolados, foi extraído pelo método, anteriormente descrito, do Mini–BeadBeeter/tiocianato de guanidina–sílica.

6.1. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DO GENE DA DHPS, POR ANÁLISE DE PCR-RFLP

A caracterização do gene da DHPS de *P. jirovecii* foi efectuada por amplificação de um fragmento de 785 pb (Helweg-Larsen *et al.*, 1999), por PCR “touchdown”. A PCR “touchdown” consiste numa reacção de amplificação, em que os primeiros ciclos são realizados a uma temperatura de ligação superior, que vai diminuindo, 1°C por ciclo, até à temperatura de ligação apropriada, para os oligonucleótidos iniciadores.

Posteriormente, devido à baixa sensibilidade de amplificação do gene da DHPS, pelo método anterior, em particular nas amostras com baixa carga parasitária, foi elaborada uma técnica de PCR, com o objectivo de melhorar a eficácia de amplificação. Com o auxílio do programa informático “Primer Express”, versão 3.0 (Applied Biosystems), foram desenhados dois oligonucleótidos iniciadores, que amplificam uma sequência interna do produto da PCR “touchdown”, originando um fragmento com 186 pb (Costa *et al.*, 2005). Assim, foi constituída uma técnica de PCR “nested”, em que a primeira fase de amplificação consiste na PCR “touchdown” e a segunda fase numa reacção de PCR simples, com os oligonucleótidos iniciadores, DHPS-NF e DHPS-NR, desenhados por nós.

Todos os isolados foram amplificados por PCR “touchdown” e “nested” e, em seguida, foi efectuada a hidrólise dos fragmentos de DNA, com as endonucleases de restrição *AccI* e *HaeIII*, para a detecção das mutações descritas nos codões 55 e 57 (Helweg-Larsen *et al.*, 2000).

6.1.1. Amplificação do gene da DHPS, por PCR “touchdown”

A primeira fase, de amplificação do gene da DHPS, foi efectuada com os oligonucleótidos iniciadores Dp15 e Dp800, cujas características se encontram descritas no quadro XIII.

Para cada amostra, foi preparada uma mistura reaccional de 50 µl contendo 1× tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20; Bioline), 0,8 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 20 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, Dp 15 e Dp 800 (MWG Biotech), 1,5 mM de MgCl₂ (Bioline), 1,5 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), 0,5 µg de BSA (Sigma), entre 5 a 7,5 µl de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final.

QUADRO XIII. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR do gene da DHPS de *P. jirovecii*.

PCR (fragmento amplificado, pb)	OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
PCR “touchdown” (785)	Dp 15	5'- TCTGAATTTTATAAAGCGCCTACAC- 3'	Helweg-Larsen <i>et al.</i> , 1999
	Dp 800	5'- ATTTCATAAACATCA GAACCCG- 3'	
PCR “nested” (186)	DHPS-NF	5'- AAATGCAGGGGCGACGATAAT- 3'	Costa <i>et al.</i> , 2005
	DHPS-NR	5'- GCCTTAATTGCTTGTCTGCAA- 3'	

Pb-pares de bases.

Em cada reacção de amplificação foram incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador "T1 Thermocycler" (Biometra), segundo as condições térmicas descritas no quadro XIV.

QUADRO XIV. Condições térmicas de amplificação por PCR do gene da DHPS de *P. jirovecii*.

PCR	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO		N.º CICLOS
	Desnaturação inicial	94°C, 3 min	
PCR	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 30 seg; 68°C até 58°C*, 30 seg; 72°C, 45 seg	10
“touchdown”	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 30 seg; 58°C*, 30 seg; 72°C, 45 seg	35
	Extensão final	72°C, 10 min	
	Desnaturação inicial	94°C, 3 min	
PCR	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 30 seg; 56°C*, 30 seg; 72°C, 45 seg	40
“nested”	Extensão final	72°C, 10 min	

Min – minutos; seg – segundos.

* Decresce 1°C por ciclo.

6.1.2. Amplificação do gene da DHPS, por PCR “nested”

A segunda reacção de amplificação foi efectuada com os oligonucleótidos iniciadores, DHPS-NF e DHPS-NR, desenhados para este estudo e descritos no quadro XIII.

Para cada amostra, foi preparada uma mistura reaccional de 50 µl contendo 1× tampão de reacção (160 mM (NH₄)₂SO₄, 670 mM Tris-HCl [pH 8,8], 0,1% Tween-20; Bioline), 0,8 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e

dTTP (Promega), 20 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, DHPS-NF e DHPS-NR (MWG Biotech), 1,5 mM de MgCl₂ (Bioline), 1 U de Biotaq™ DNA Polymerase (Bioline), 0,5 µg de BSA (Sigma), 2 µl de DNA amplificado por PCR “touchdown” e água desionizada estéril, para perfazer o volume final.

Em cada reacção de amplificação foram incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador "T1 Thermocycler" (Biometra), segundo as condições térmicas descritas no quadro XIV.

6.1.3. Visualização do DNA amplificado

O DNA amplificado por PCR “touchdown” e “nested” foi submetido a electroforese em gel de agarose a 1,5% e 2%, respectivamente, em tampão TAE com brometo de etídio incorporado, conforme o descrito em 5.3. Em paralelo com o DNA amplificado por PCR “touchdown” e “nested”, foram sujeitos a electroforese os marcadores de pesos moleculares “1 Kb Ladder” (Fermentas) e “100 bp Ladder” (Fermentas), respectivamente.

6.1.4. Hidrólise do DNA amplificado, por endonucleases de restrição-RFLP

A identificação dos genótipos selvagem e mutante do gene da DHPS de *P. jirovecii* foi efectuada por análise dos perfis de restrição do DNA amplificado, por PCR, após a sua hidrólise com endonucleases de restrição (Helweg-Larsen *et al.*, 2000). As sequências de corte destas enzimas de restrição localizam-se sobre os codões 55 e 57, na sequência de tipo selvagem. Assim, a presença de mutações, nesta região, impede o

reconhecimento, por parte das endonucleases de restrição, não havendo hidrólise do DNA amplificado.

Os produtos de amplificação por PCR “touchdown” e “nested” foram hidrolisados, em reacções separadas, com as endonucleases *AccI* e *HaeIII*. Para a identificação do genótipo no codão 55, a reacção de hidrólise foi efectuada num volume de 20 µl, contendo 2 µl de tampão de restrição B⁺ (Fermentas), 10 U de *AccI* (Fermentas), entre 10 e 15 µl do DNA amplificado e água desionizada estéril, até completar o volume final. Para a detecção da mutação no codão 57, a reacção de hidrólise foi feita num volume de 20 µl, contendo 2 µl de tampão de restrição R⁺ (Fermentas), 10 U de *HaeIII* (Fermentas), entre 10 e 15 µl do DNA amplificado e água desionizada estéril, até completar o volume final. Em ambos os casos, a mistura de hidrólise foi a incubar a 37°C, durante a noite.

Os produtos de hidrólise foram separados por electroforese em gel de agarose a 12,5%, conforme descrito em 5.3, com excepção do volume de DNA hidrolisado aplicado, que foi de 20 µl.

6.2. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA DHFR, POR SEQUENCIAÇÃO DE DNA

Os isolados de *P. jirovecii*, identificados por técnicas parasitológicas e moleculares, foram submetidos à amplificação do gene da DHFR, por PCR “nested”, e o DNA amplificado foi, posteriormente, sequenciado. Dez isolados, seleccionados aleatoriamente, foram clonados e os fragmentos obtidos foram, posteriormente, sequenciados.

6.2.1. Amplificação do gene da DHFR, por PCR “nested”

Um fragmento (798 pb) do gene que codifica a DHFR foi amplificado por PCR “nested” (Ma *et al.*, 1999), com os oligonucleótidos iniciadores externos, FR208 e FR1038, e internos, FR242 e FR1018, cujas características estão descritas no quadro XV.

As reacções de PCR sofreram alguns ajustes, em relação ao descrito anteriormente (Ma *et al.*, 1999), nomeadamente, na concentração de MgCl₂ e dos oligonucleótidos iniciadores e na adição de BSA.

Na primeira PCR, para cada amostra, foi preparada uma mistura reaccional de 50 µl contendo 1× tampão de reacção (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl; Invitrogen), 0,8 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 15 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, FR208 e FR1038 (MWG Biotech), 1,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 1 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0,5 µg de BSA (Sigma), entre 5 e 7 µl de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final. Na segunda PCR, 5 µl do produto amplificado foi adicionado à mistura reaccional, idêntica à primeira, diferindo apenas nos oligonucleótidos iniciadores utilizados (FR242 e FR1018).

Em cada reacção de amplificação foram incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador "T1 Thermocycler" (Biometra), segundo as condições térmicas descritas no quadro XVI.

QUADRO XV. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR do gene da DHFR de *P. jirovecii*.

PCR (fragmento amplificado, pb)	OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
1ª PCR (880 pb)	FR208	5'- GCAGAAAGTAGGTACATTATTACGAGA- 3'	Ma <i>et al</i> , 1999
	FR1038	5'- AACCAGTTACCTAATCAAACCTATATTGC- 3'	
2ª PCR (798 pb)	FR242	5'- GTTTGGAATAGATTATGTTTCATGGTGTACG- 3'	
	FR1018	5'- GCTTCAAACCTTGTGTAACGCG- 3'	

Pb-pares de bases.

QUADRO XVI. Condições térmicas de amplificação por PCR do gene da DHFR de *P. jirovecii*.

DHFR-PCR	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO	N.º CICLOS
1ª e 2ª PCR	Desnaturação inicial	94°C, 3 min
	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 1 min; 52°C, 1 min; 72°C, 2 min
	Extensão final	72°C, 10 min

Min – minutos.

6.2.2. Visualização do DNA amplificado

Conforme o descrito em 5.3, os fragmentos de DNA amplificado por PCR “nested” foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE com brometo de etídio incorporado. O fragmento amplificado, com 798 pb, foi analisado em paralelo com o marcador de DNA “1 Kb ladder”(Promega).

6.3. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DAS REGIÕES ITS DO rRNA NUCLEAR, POR SEQUENCIAÇÃO DE DNA

Os isolados de *P. jirovecii*, identificados por técnicas parasitológicas e moleculares, foram submetidos à amplificação das regiões ITS do gene de rRNA, por PCR “nested”, e o DNA amplificado foi, posteriormente, sequenciado. Onze isolados, seleccionados aleatoriamente, foram clonados e os fragmentos obtidos foram, posteriormente, sequenciados.

6.3.1. Amplificação das regiões ITS do rRNA nuclear, por PCR “nested”

As regiões ITS do rRNA nuclear de *P. jirovecii* foram amplificadas por PCR “nested” (Lee *et al.*, 1998), com os oligonucleótidos iniciadores externos, 1724F2 e ITS2R, e internos, FX e RX (quadro XVII). As reacções de PCR foram optimizadas, em relação à concentração dos oligonucleótidos iniciadores e do MgCl₂ e quanto à adição de BSA.

Na primeira PCR, para cada amostra, foi preparada uma mistura reaccional de 50 µl contendo 1× tampão de reacção (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500mM KCl; Invitrogen), 0,4 mM de uma mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (Promega), 8 pmol de cada um dos oligonucleótidos iniciadores, 17242F e ITS2R (MWG Biotech), 2,5 mM de MgCl₂ (Invitrogen), 1 U de Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 0,5 µg de BSA (Sigma), entre 5 e 7 µl de DNA genómico e água desionizada estéril, para perfazer o volume final.

QUADRO XVII. Oligonucleótidos iniciadores utilizados na amplificação por PCR das regiões ITS do rRNA nuclear *P. jirovecii*.

PCR (fragmento amplificado, pb)	OLIGONUCLEÓTIDOS INICIADORES	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
1ª PCR (650)	1724F2 ITS2R	5'- AGTTGATCAAATTTGGTCATTTAGAG- 3' 5'- CTCGGACGAGGATCCTCGCC- 3'	Lee <i>et al.</i> , 1998
2ª PCR (550)	FX RX	5'- TTCCGTAGGTGAACCTGCG- 3' 5'- GTTCAGCGGGTGATCCTGC- 3'	Tang, X. (comunicação pessoal)

Pb-pares de bases.

Na segunda PCR, 4 µl do produto amplificado foi adicionado à mistura reaccional, semelhante à primeira, diferindo, apenas, na concentração da mistura dos desoxirribonucleótidos dATP, dCTP, dGTP e dTTP (0,8 mM), na concentração de cada um dos oligonucleótidos iniciadores utilizados (32 pmol, FX e RX; MWG Biotech) e na concentração de MgCl₂ (1 mM; Bioline).

Em cada reacção de amplificação foram incluídos um controlo positivo e um controlo negativo. As reacções de amplificação foram efectuadas num termociclador "T1 Thermocycler" (Biometra), segundo as condições térmicas descritas no quadro XVIII.

QUADRO XVIII. Condições térmicas de amplificação por PCR das regiões ITS do rRNA nuclear de *P. jirovecii*.

ITS-PCR	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO		N.º CICLOS
	Desnaturação inicial	94°C, 3 min	
1ª PCR	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 90 seg; 62°C, 90 seg; 72°C, 2 min	5
	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 40 seg; 60°C, 40 seg; 72°C, 1min	35
	Extensão final	72°C, 10 min	
	Desnaturação inicial	94°C, 3 min	
2ª PCR	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 90 seg; 62°C, 90 seg; 72°C, 2 min	5
	Desnaturação; ligação; extensão	94°C, 40 seg; 60°C, 40 seg; 72°C, 1min	35
	Extensão final	72°C, 30 seg	

Min – minutos; seg – segundos.

6.3.2. Visualização do DNA amplificado

Conforme o descrito em 5.3, os fragmentos de DNA amplificado por PCR “nested” foram analisados por electroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão TAE com brometo de etídio incorporado. O DNA amplificado, com 550 pb, foi analisado em paralelo com o marcador de DNA “1 Kb ladder” (Promega).

6.4. PURIFICAÇÃO E SEQUENCIACÃO DIRECTA DOS FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR

Os produtos de PCR contêm vários compostos, nomeadamente, sais, oligonucleótidos iniciadores e nucleótidos não incorporados, que podem interferir com a

reação de sequenciação, sendo necessário, antes da sua realização, proceder à remoção dos referidos compostos.

Assim, o DNA amplificado, por PCR, a sequenciar, foi purificado, com o “kit” comercial “JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit” (Genomed). De acordo com as instruções do fabricante, a 40 µl de produto de PCR foram adicionados 200 µl de solução H1 (Genomed) que, após forte agitação, foram transferidos para uma coluna “JETQUICK spin column” (Genomed), já colocada num tubo colector. Depois de uma centrifugação a 23.100 g, durante um minuto, o eluído foi rejeitado e a coluna colocada num novo tubo colector. Em seguida, foram adicionados 250 µl de solução de lavagem H2 (Genomed) e foi realizada nova centrifugação a 23.100 g, durante um minuto. Após rejeição do eluído, foi repetida a centrifugação anterior. Seguidamente, a coluna foi transferida para um microtubo de 1,5 ml, tendo-lhe sido adicionados 50 µl de água desionizada estéril, previamente aquecida a 60°C. Por fim, a coluna foi a incubar a 60°C, durante cinco minutos e, depois de uma centrifugação a 23.100 g, durante dois minutos, a coluna foi eliminada e o produto de PCR purificado foi armazenado a -20°C.

Inicialmente, os produtos de PCR purificados foram enviados para o Laboratório de Sequenciação e Análise de Fragmentos, do Instituto de Ciência Aplicada e Tecnologia (ICAT), onde foram submetidos a reação de sequenciação, resolvidos num sequenciador automático “CEQ™ 2000XL” (Beckman Coulter), com uma tecnologia de electroforese capilar em gel de poliacrilamida, e analisados pelo software “CEQ™ 8000 Genetic Analysis System” (Beckman Coulter). Posteriormente, os produtos de PCR passaram a ser enviados para o Laboratório de Sequenciação da Macrogen (Seuol, Coreia do Sul) onde foram submetidos a reação de sequenciação, resolvidos num

sequenciador automático “3730 XL DNA Analyser” (Applied Biosystems), com uma tecnologia de electroforese capilar em gel de poliacrilamida.

As sequências de DNA foram determinadas em ambos os sentidos, tendo sido obtida uma sequência consenso, por comparação das sequências directa e reversa. Os cromatogramas, com as sequências directa e reversa, de cada fragmento sequenciado, foram comparados, através do programa “Chromas”, versão 1.33 (Theshnelysium Pty Ltd) e, após a correcção manual de alguns erros, foi obtida a sequência consenso.

6.5. CLONAGEM DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS POR PCR E SEQUENCIAÇÃO DO DNA CLONADO

Para a identificação de genótipos múltiplos, presentes na mesma amostra, 10 fragmentos do gene da DHFR e 11 fragmentos das regiões ITS do gene de rRNA nuclear, seleccionados aleatoriamente, foram clonados no vector “p-Drive cloning vector” em *E. coli*, segundo o “Qiagen PCR Cloning Kit” (Qiagen).

Inicialmente, procedeu-se à adição do desoxirribonucleótido dATP, de forma a criar uma extremidade de poli-A, necessária à introdução do fragmento de DNA no vector de clonagem. Para tal, adicionaram-se 8 µl de produto de PCR purificado a 2 µl de mistura de reacção “Qiagen A-Addition” (Qiagen), fornecida no “Qiagen A-Addition Kit” (Qiagen). A reacção de adição foi a incubar a 37°C, durante 30 minutos.

Após a adição de poli-A, procedeu-se à ligação dos produtos de PCR com o vector p-Drive (Qiagen). Para cada amostra, foi preparada uma mistura reaccional de 10 µl contendo 5 µl do reagente “2× ligation mix” (Qiagen), 50ng/µl de vector de

clonagem “p-Drive” (Qiagen), 4 µl de produto de PCR purificado e 1µl de água desionizada estéril. A reacção de ligação DNA–vector de clonagem foi a incubar a 8°C, durante a noite.

Após a ligação DNA–vector efectuou-se a transformação em células *E. coli* competentes, cedidas pelo Professor Doutor Celso Cunha (Unidade de Biologia Molecular, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical). Assim, 2 a 5 µl da mistura de ligação foram adicionados a 100 ml de células competentes, seguindo-se incubação a 42°C, durante 45 a 50 segundos, num banho termostatzado, após a qual se colocou a mistura no gelo durante dois minutos. Adicionou-se 900 µl de meio SOC (triptona 2%, extracto de levedura 0.5%, NaCl 10mM, KCl 2.5mM; MgCl₂ 10mM, MgSO₄ 10mM, dextrose 20 mM), e a mistura de transformação foi a incubar a 37°C, durante 90 minutos, a 150 rpm, numa incubadora com agitação orbital.

Entretanto procedeu-se à preparação de placas de Petri esterilizadas com meio Luria–Bertani (LB, Sigma) sólido agar, contendo 100 µg/ml de ampicilina, 0,5 mM de IPTG e 0,08 mg/ml de Xgal (5-bromo-cloro-3-indolil-β-D-galactosidase). Após a incubação, 200 a 300 µl da solução de transformação foram plaqueados com meio LB agar e as placas foram a incubar a 37°C, durante a noite. Após selecção das colónias recombinantes, estas foram inoculadas em 5 ml de meio LB líquido e incubadas a 37°C, durante a noite, com agitação orbital. O DNA plasmídico, foi posteriormente, extraído pelo “MiniPrep Plasmid DNA extraction Kit” (Qiagen), segundo as condições do fabricante.

O trabalho de clonagem foi efectuado, em parte, com o auxílio do Professor Doutor Celso Cunha, da Unidade de Biologia Molecular, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

6.6. ANÁLISE BIOINFORMÁTICA

As sequências nucleotídicas consenso dos fragmentos dos genes da DHPS, da DHFR e das regiões ITS, dos isolados de *P. jirovecii* estudados, foram comparadas com as sequências de *P. jirovecii* para os *loci* descritos, disponíveis na base de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>). Também, as sequências obtidas no presente trabalho foram alinhadas através do programa Clustal W, versão 1.82 (Thompson *et al.*, 1997). Ao alinhamento resultante, foram efectuados alguns acertos manuais, de forma a eliminar algumas ambiguidades.

7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

No presente trabalho, procedeu-se à avaliação da existência de correlação entre os polimorfismos identificados, nos genes da DHPS e da DHFR, e os genótipos ITS com as características epidemiológicas e clínicas dos doentes estudados, em particular, com o insucesso da profilaxia anti-*P. jirovecii*. Assim, os vários genótipos identificados nas três regiões genómicas, em estudo, foram correlacionadas com o período de estudo, com a idade dos doentes, com o estado serológico para VIH, com algumas características clínicas associadas com a virulência de *P. jirovecii* (o valor de PaO₂, radiograma do tórax), a contagem de linfócitos TCD4⁺ e o uso de profilaxia anti-*P. jirovecii*, com cotrimoxazol. Para o estudo efectuado, a profilaxia anti-*P. jirovecii*, foi considerada

como a toma de cotrimoxazol por um período mínimo de dois meses, antes do diagnóstico da PPC.

Considerando o número de variáveis e o tipo de resposta pretendida, o teste estatístico seleccionado foi o teste do Chi-Quadrado (χ^2). Os dados foram agrupados em tabelas de contingência de duas entradas e a análise foi efectuada com o apoio informático do programa SPSS (do inglês “statistical package for social sciences”, SPSS Inc., versão 13,0), com um intervalo de confiança de 95%, de onde resultaram associações, estatisticamente, significativas, quando o valor de P foi inferior ou igual a 0,05.

A análise estatística foi efectuada, em parte, com o auxílio da Professora Doutora Luzia Gonçalves, da Unidade de Epidemiologia e Bioestatística, do Instituto de Higiene e Medicina Tropical.

CAPÍTULO III

IDENTIFICAÇÃO DE *P. JIROVECI* EM DOENTES

IMUNOCOMPROMETIDOS

III. IDENTIFICAÇÃO DE *P. JIROVECI* EM DOENTES IMUNOCOMPROMETIDOS

1. INTRODUÇÃO

A pneumocistose, é uma infecção oportunista que causa morbidade e mortalidade significativas em seropositivos para VIH e em indivíduos com outras imunodeficiências.

O diagnóstico laboratorial da pneumocistose assenta, principalmente, na observação microscópica de *P. jirovecii* em amostras de secreções pulmonares, como o LBA ou a EI, após aplicação de colorações citoquímicas ou fluorescentes, tais como a IFI-AcM. Todavia, o uso generalizado da profilaxia primária da PPc, em especial com TMP-SMX, predispõe à redução do número de microrganismos identificados nas secreções pulmonares, pelas técnicas de diagnóstico convencionais (Leibovitz *et al.*, 1995). Também, o uso da profilaxia com pentamidina em aerossol, para além da diminuição da carga parasitária, pode ser responsável por padrões radiológicos atípicos e por quadro clínico de difícil interpretação.

A aplicação recente de técnicas de biologia molecular promoveu o diagnóstico em amostras biológicas de obtenção menos invasiva, como a EI e o LO, e contribuiu para a detecção cada vez mais sensível e eficiente de *P. jirovecii*, em particular, no que

diz respeito a amostras com carga parasitária mais baixa, assim como, permitiu a identificação de portadores assintomáticos.

No presente trabalho, pretendeu-se identificar *P. jirovecii* em indivíduos imunocomprometidos, com sintomatologia respiratória, entre Março de 2001 e Outubro de 2004.

2. RESULTADOS

No presente estudo, 403 amostras de secreções pulmonares, recolhidas entre Março de 2001 e Outubro de 2004, foram submetidas à identificação de *P. jirovecii*, por técnicas parasitológicas e moleculares. As 403 amostras estudadas, foram recolhidas de 314 doentes imunocomprometidos, com sintomatologia respiratória. Em 62 doentes foram recolhidas mais do que uma amostra de secreções pulmonares: em 44 doentes foram recolhidas duas amostras; em 10 doentes foram recolhidas três amostras, em sete doentes foram obtidas quatro amostras e apenas num doente foram recolhidas cinco amostras de secreções pulmonares.

Das 403 amostras estudadas, 119 (29,5%) foram positivas, por IFI-AcM, e 284 (70,5%) foram negativas. Através da técnica de IFI-AcM, os quistos de *P. jirovecii* apresentaram forma esférica e dimensão média de 4 a 6 μm , com a parede celular corada de verde fluorescente (figura 6). Durante a avaliação parasitológica das amostras de secreções pulmonares, foi estimada a carga parasitária das amostras positivas por IFI-AcM, segundo as condições definidas anteriormente (*vide* Capítulo II, quadro VIII).

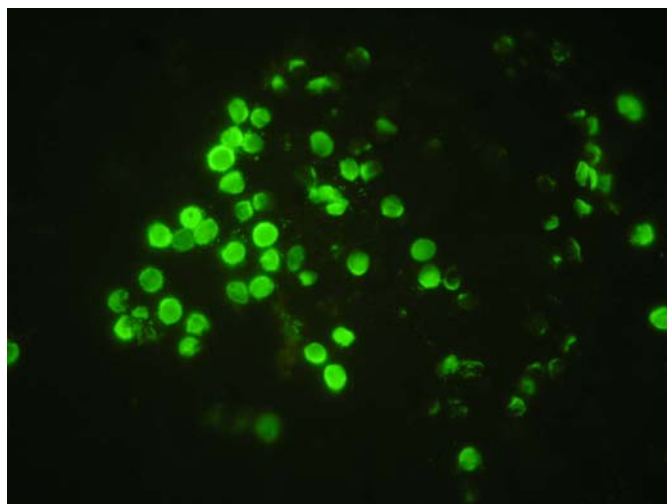


FIGURA 6. Quistos de *P. jirovecii*, visualizados pela técnica de IFI-AcM, em secreções pulmonares ($\times 400$) (original da autora).

Das 119 amostras positivas por IFI-AcM, 81 (68,1%) tinham carga parasitária baixa, 34 (28,6%) apresentaram carga parasitária moderada e em quatro amostras (3,3%) foi detectada uma carga parasitária elevada (quadro XIX).

QUADRO XIX. Carga parasitária de *P. jirovecii*, detectada nas 119 amostras positivas por IFI com AcM.

CARGA PARASITÁRIA	N.º AMOSTRAS	TIPO DE AMOSTRA		
		LBA	EI	SB
Baixa (+)	81 (68,1%)	36	44	1
Moderada (++)	34 (28,6%)	22	12	
Elevada (+++)	4 (3,3%)	4		

EI-expectoração induzida; LBA-lavado bronco-alveolar; SB-secreções brônquicas.

As 284 amostras negativas por IFI-AcM foram, posteriormente, submetidas à amplificação de DNA específico de *P. jirovecii*, nomeadamente de um fragmento de 263 pb do gene que codifica a mt(LSU)rRNA (figura 7) (Wakefield *et al.*, 1990, 1991; Tamburrini *et al.*, 1996). Das amostras negativas por IFI-AcM, 141 (49,6%) foram positivas por PCR e 143 (50,4%) foram negativas.

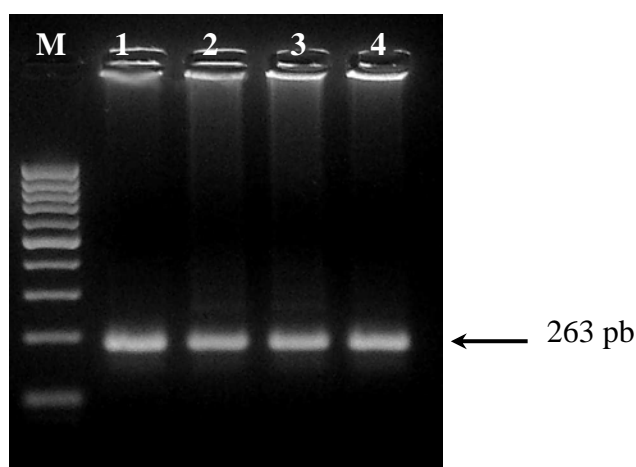


FIGURA 7. Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR “nested” de um fragmento de 263 pb do gene que codifica a subunidade grande do rRNA mitocondrial. M: Marcador de pesos moleculares (“100 bp ladder”, Fermentas).

No total, 260 (64,5%) das 403 amostras estudadas foram positivas para *P. jirovecii* (quadro XX). Estas 260 amostras de secreções pulmonares foram recolhidas de 209 doentes imunocomprometidos e correspondiam a 220 episódios de PPc. Ao longo do período de estudo, em 10 doentes, foi feito o diagnóstico de mais do que um episódio de PPc. Em nove doentes foram detectados dois episódios e num doente foram diagnosticados três episódios de pneumocistose.

QUADRO XX. Identificação de *P. jirovecii*, por técnicas parasitológicas e moleculares, em 403 amostras de secreções pulmonares.

IDENTIFICAÇÃO DE <i>P. JIROVECI</i>	POSITIVA	NEGATIVA
	IFI-AcM (N=403)	119 (29,5%)
mt(LSU)rRNA-PCR (N=284)	141 (49,6%)	143 (50,4%)

Dos 209 doentes parasitados, 131 (62,7%) pertenciam ao sexo masculino e 78 (37,3%) ao sexo feminino. A idade dos doentes variou entre os dois meses e os 70 anos (mediana=36 anos). Cento e setenta e seis doentes eram seropositivos para VIH e 19 eram seronegativos (quatro receptores de transplante de órgãos, quatro com doença neoplásica, quatro recém-nascidos, um toxicodependente e seis adultos com causa de imunossupressão desconhecida). Nos restantes 14 doentes, não havia informação sobre a serologia para VIH.

Nos 176 doentes seropositivos para VIH, a categoria de transmissão de VIH estava documentada em 108 doentes, sendo 53 heterossexuais, 10 homossexuais, 44 toxicodependentes e uma criança que adquiriu a infecção por VIH por transmissão vertical. Nestes doentes, a contagem de linfócitos TCD4⁺ foi superior a 200 células/mm³ em 16 (9,1%) doentes, inferior ou igual a 200 células/mm³ em 39 (22,1%) doentes e inferior a 50 células/mm³ em 63 (37,8%) doentes. Em 58 (32,9%) doentes não era conhecida a contagem de linfócitos TCD4⁺.

Dos 209 doentes com infecção por *P. jirovecii*, 39 (18,6%) estavam sob profilaxia anti-*P. jirovecii* (35 com TMP-SMX e quatro com pentamidina), 127 (60,8%) não faziam profilaxia e em 43 (20,6%) não havia informação sobre o uso de profilaxia.

Na figura 8, pode-se observar a distribuição mensal dos casos de PPC diagnosticados, no período compreendido entre Março de 2001 e Outubro de 2004.

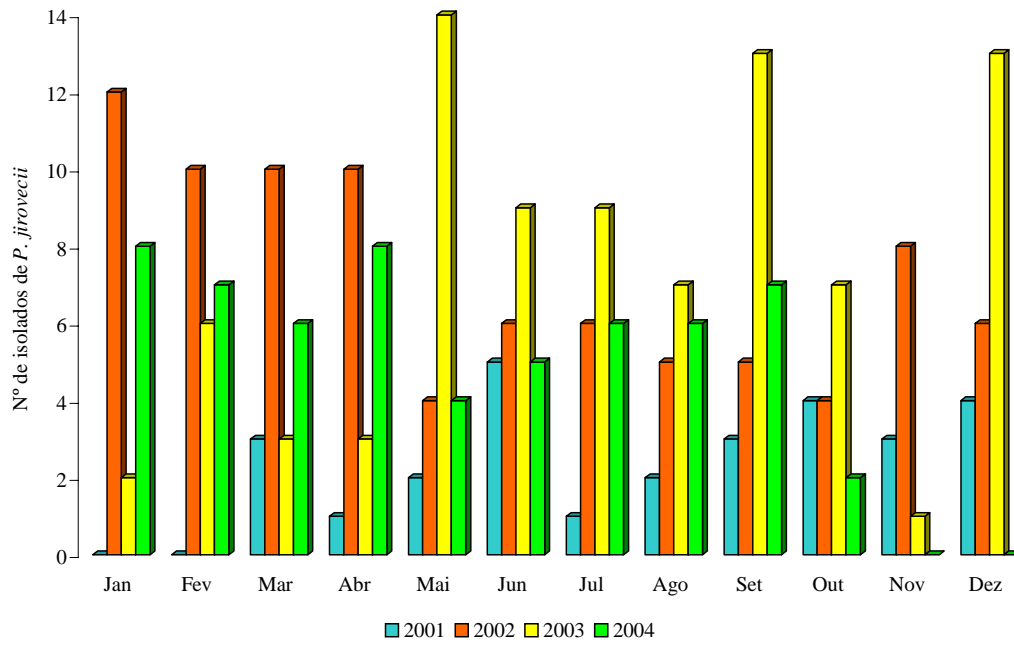


FIGURA 8. Representação gráfica do número de isolados de *P. jirovecii*, identificados por técnicas parasitológicas e moleculares, entre Março de 2001 e Outubro de 2004, em função dos meses do ano.

Os resultados representados mostram que, para o período estudado, foram identificados mais isolados de *P. jirovecii* nos anos de 2002 e 2003. Nos meses de Setembro, Junho e Maio foi detectado o maior número de isolados, no entanto esta diferença não foi, estatisticamente, significativa ($P>0,8$).

3. DISCUSSÃO

Até à recente aplicação das técnicas de biologia molecular, nomeadamente, da PCR, na detecção de *P. jirovecii*, o diagnóstico da PPC fundamentava-se, exclusivamente, no quadro clínico e na identificação do parasita, através de colorações citoquímicas ou fluorescentes, em amostras biológicas, do aparelho respiratório, como ou a biopsia de tecido pulmonar ou as secreções pulmonares. Actualmente, o uso generalizado da profilaxia anti-*P. jirovecii*, em doentes de risco, contribuiu para a redução do número de microrganismos presentes nas secreções pulmonares, o que dificulta o diagnóstico pelas técnicas parasitológicas, isto é, a identificação morfológica de *P. jirovecii*. Assim, as técnicas de detecção de DNA de *P. jirovecii* têm sido os métodos mais utilizados, quer no diagnóstico, quer em investigação, devido à sua sensibilidade e especificidade elevadas.

No presente trabalho, *P. jirovecii* foi detectado em 64,5% das amostras estudadas. Através da técnica parasitológica identificou-se *P. jirovecii* em 29,4% e, pela técnica molecular, em 49,6% das amostras estudadas. No total de doentes estudados, a percentagem de isolados de *P. jirovecii* identificados, por IFI-AcM, foi semelhante à observada em outros estudos efectuados em Portugal (Matos *et al.*, 1995; Diogo, 1999) e reflecte o decréscimo da frequência de *P. jirovecii* em amostras de secreções pulmonares, em doentes imunocomprometidos, reportado por vários autores (Palella *et al.*, 1998). O decréscimo observado na frequência de identificação de isolados de *P. jirovecii* está, provavelmente, relacionada com o decréscimo do número de casos de infecção VIH/SIDA, diagnosticados em Portugal desde 2000, em virtude do efeito da HAART, no atraso da progressão da infecção por VIH para SIDA (Antunes e Doroana,

2003; Centro de Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmissíveis, 2005). De facto, a introdução da HAART e o uso generalizado da profilaxia anti-*P. jirovecii* tem contribuído, largamente, para a diminuição da prevalência da pneumocistose, nos países industrializados (Kaplan *et al.*, 2000).

Por outro lado, e ao contrário do observado por outros autores, os isolados de *P. jirovecii* foram identificados de forma semelhante em todos os meses ao longo do ano, não se verificando distribuição sazonal ou mensal (Miller *et al.*, 1992; Lubis *et al.*, 2003; Varela *et al.*, 2004). Alguns estudos, reportaram maior incidência de casos de pneumocistose em alguns meses (por exemplo, em Janeiro) ou em determinadas estações do ano, como o Inverno, provavelmente relacionada com o valor mais baixo da média da temperatura mínima (Lubis *et al.*, 2003; Varela *et al.*, 2004). No entanto, o mesmo não se verificou, no estudo efectuado.

A aplicação duma técnica de PCR, para o diagnóstico da PPc, pode ser, particularmente, útil para os casos em que o número de microrganismos, nas secreções pulmonares, é baixo, como é o caso dos doentes sob profilaxia e naqueles com infecção subclínica (sem sintomatologia) (Leibovitz *et al.*, 1995a). A técnica de PCR pode aumentar a sensibilidade e a especificidade da detecção de *P. jirovecii*, em amostras obtidas por métodos não invasivos, como é o caso da expectoração induzida, do lavado oral e do soro (Lipschik *et al.*, 1992; Helweg-Larsen *et al.*, 1998; Matos *et al.*, 1999, 2000). Sendo, por isso, um método importante no diagnóstico da pneumocistose e, também, na monitorização dos doentes sob profilaxia ou terapêutica.

CAPÍTULO IV

DETECÇÃO DO GENE DA DHPS DE *P. JIROVECI*

IV. DETECÇÃO DO GENE DA DHPS DE *P. JIROVECI*

1. INTRODUÇÃO

A inexistência de um sistema de cultura *in vitro*, para *P. jirovecii*, que seja eficaz e reprodutível tem dificultado o estudo da resistência ao cotrimoxazol, por parte deste parasita. Actualmente, este estudo é efectuado pela análise da associação entre os polimorfismos da DHPS de *P. jirovecii*, detectados por técnicas de biologia molecular, e a resistência clínica ao cotrimoxazol. Estes métodos baseiam-se na capacidade de isolar e detectar o DNA específico de *P. jirovecii*, a partir de amostras clínicas. No entanto, a amplificação por PCR do gene da DHPS, um gene de cópia única (Lundgren & Wakefield, 1998), tem sido dificultada pelo estudo de amostras pulmonares de obtenção menos invasiva, geralmente com uma carga parasitária menor, e pela presença de inibidores da PCR, como o DNA humano (DNA hospedeiro), presente nas amostras pulmonares. De facto, o excesso de DNA exógeno ou do hospedeiro, presente nas amostras pulmonares, pode ser inibitório da reacção de PCR (Rossen *et al.*, 1992; Wilson, 1997).

Neste estudo, com o objectivo de melhorar a detecção das mutações, descritas no gene da DHPS de *P. jirovecii*, em amostras pulmonares de doentes com co-infecção VIH/SIDA e PPc, propomo-nos avaliar um método de microfiltração para a remoção

das células humanas, de forma a reduzir a contaminação por DNA não específico, e testar um protocolo de PCR “nested”, desenvolvido para a amplificação do gene da DHPS, em amostras com baixa carga parasitária.

2. RESULTADOS

No presente estudo, com o objectivo de avaliar a detecção de um fragmento do gene da DHPS de *P. jirovecii*, foram estudadas 40 amostras de secreções pulmonares, de 40 doentes com co-infecção VIH/*P. jirovecii*, parasitologicamente, positivas. Das 40 amostras estudadas, 30 (75%) apresentaram baixa carga parasitária, 7 (17,5%) tinham carga moderada e as restantes 3 (7,5%) apresentaram elevada carga parasitária.

Uma alíquota de cada amostra foi submetida a um método de microfiltração, com o objectivo de remover as células humanas e, assim, reduzir a contaminação com DNA não específico. Também, para melhorar a amplificação do gene da DHPS, em amostras com baixa carga parasitária, foi desenvolvido um protocolo de PCR “nested”, posteriormente, aplicado a todas as amostras.

No grupo de amostras não filtradas, a amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii* por PCR “touchdown” foi positiva em cinco (12,5%) e negativa em 35 (87,5%) (quadro XXI). Na segunda fase de amplificação, 31 (77,5%) amostras foram positivas, inclusive as cinco positivas por PCR “touchdown”, e nove (22,5%) foram negativas. A amplificação do gene da β -globina humana foi obtida em todas as 40 (100%) amostras não filtradas.

QUADRO XXI. Amplificação por PCR do gene da DHPS de *P. jirovecii* em 40 doentes seropositivos para VIH.

PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	AMPLIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS					
	DHPS PCR “touchdown”		DHPS PCR “nested”		β-Globina PCR	
	<i>Positiva</i>	<i>Negativa</i>	<i>Positiva</i>	<i>Negativa</i>	<i>Positiva</i>	<i>Negativa</i>
Não filtradas	5 (12,5%) ^b	35 (87,5%) ^b	31 (77,5%) ^{a,c}	9 (22,5%) ^{a,c}	40 (100%)	0 (0%)
<i>Carga parasitária moderada (++) e elevada (+++)</i>	4	6	10	0	10	0
<i>Carga parasitária baixa (+)</i>	1	29	21	9	30	0
Filtradas	0 (0%)	40 (100%)	13 (32,5%)	27 (67,5%) ^a	36 (90%)	4 (10%)
<i>Carga parasitária moderada (++) e elevada (+++)</i>	0	10	9	1	9	1
<i>Carga parasitária baixa (+)</i>	0	30	4	26	27	3

^aP<0,001 quando comparada com PCR “touchdown”.

^bP<0,05 quando comparada com as amostras filtradas nas mesmas condições experimentais.

^cP<0,001 comparada com as amostras filtradas nas mesmas condições experimentais.

No grupo de amostras filtradas, não foi possível amplificar o gene da DHPS por PCR “touchdown”. Na PCR “nested”, 13 (32,5%) amostras foram positivas e 27 (67,5%) foram negativas (quadro XXI). O gene da β -globina humana foi amplificado em 36 (90%) amostras filtradas.

A amplificação do gene da DHPS, de *P. jirovecii*, foi, significativamente, mais elevada nas amostras não filtradas do que nas filtradas, tanto com a PCR “touchdown” como com a PCR “nested” ($P < 0,05$ e $< 0,001$, respectivamente).

Como o gene da β -globina humana foi amplificado, na maioria das amostras, procedeu-se à monitorização do efeito inibitório do DNA humano. Assim, foi adicionado DNA humano, em concentrações crescentes, a cinco amostras, positivas por PCR “touchdown”. As amostras com o DNA humano adicionado, em concentrações de 20×10^{-6} a 140 ng/ μ l, foram, posteriormente, submetidas a PCR “touchdown” e “nested”.

Três destas amostras foram positivas por PCR “touchdown”, após a adição de DNA humano até à concentração de 80 ng/ μ l (quadro XXII). No entanto, a adição de 100 ng/ μ l levou à inibição total da amplificação do gene da DHPS, nas cinco amostras estudadas. Em relação à PCR “nested”, este efeito pareceu ser menos significativo uma vez que, apenas, uma amostra apresentou inibição da amplificação, após a adição de 140 ng/ μ l de DNA humano.

QUADRO XXII. Efeito da adição de DNA humano, na eficiência da amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii*, em cinco amostras pulmonares.

CONCENTRAÇÃO DE DNA HUMANO	AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA DHPS DE <i>P. JIROVECII</i>	
	PCR “touchdown” Amostras positivas	PCR “nested” Amostras positivas
20×10^{-6} ng/ μ l	5	5
20×10^{-5} ng/ μ l	5	5
20×10^{-4} ng/ μ l	5	5
20×10^{-3} ng/ μ l	4	5
20×10^{-2} ng/ μ l	4	5
20×10^{-1} ng/ μ l	4	5
20 ng/ μ l	4	5
40 ng/ μ l	4	5
60 ng/ μ l	3	5
80 ng/ μ l	3	5
100 ng/ μ l	0	5
120 ng/ μ l	0	5
140 ng/ μ l	0	4

2.1. Quantificação do DNA exógeno

Com o objectivo de avaliar a quantidade de DNA, não alvo, presente nas amostras pulmonares, o DNA genómico total foi quantificado em 24 das amostras estudadas, incluindo as cinco descritas no quadro XXII. O valor total de DNA quantificado foi dividido pela carga parasitária para o cálculo da razão (R).

Nas amostras estudadas, o R variou entre 0,66 e 40 (mediana=6,5). Catorze (58,3%) amostras apresentaram um R inferior ou igual a 6,5 e 10 (41,3%) apresentaram

o R maior que 6,5. Nas 14 amostras com R inferior ou igual a 6,5, o gene da DHPS foi amplificado em 11 (78,6%) por PCR “touchdown” e em 12 (85,7%) por PCR “nested” (quadro XXIII). Nas restantes 10 amostras com R maior que 6,5, a PCR “touchdown” foi positiva em uma amostra (4,1%) e a PCR “nested” foi positiva em três amostras (12,5%). Os resultados obtidos sugeriram que a amplificação do gene da DHPS foi, significativamente, maior nas amostras com R inferior ou igual a 6,5 do que nas amostras com R maior que 6,5, quer na PCR “touchdown” quer na “nested” ($P=0,003$ e $P=0,010$, respectivamente).

QUADRO XXIII. Quantificação do DNA genómico total em 24 amostras pulmonares não filtradas.

AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA DHPS DE <i>P. JIROVECHII</i>	QUANTIFICAÇÃO DE DNA		<i>P</i>
	R ≤ 6,5	R > 6,5	
PCR “touchdown”			
Positiva	11	1	0,003
Negativa	3	9	
PCR “nested”			
Positiva	12	3	0,01
Negativa	2	7	

R-razão (quociente entre o DNA genómico total quantificado e a carga parasitária).

A análise da razão (R) entre a concentração de DNA medido (ng/μl) e carga parasitária, nas 24 amostras estudadas, parece sugerir que este é um factor crucial na

eficiência da detecção do DNA de *P. jirovecii*. De facto, foi observado que o R inferior ou igual a 6,5 estava, significativamente, associada à taxa de amplificação mais elevada na PCR “touchdown” ($P=0,003$) e, também, na PCR “nested” ($P<0,01$).

3. DISCUSSÃO

Neste estudo, com o objectivo de melhorar a detecção dos polimorfismos da DHPS, foram avaliadas duas intervenções diferentes, nomeadamente, um método de microfiltração, antes da extracção de DNA para a remoção da contaminação por células do hospedeiro, e a amplificação por PCR “nested”, do gene da DHPS de *P. jirovecii*.

No presente trabalho, a amplificação do gene da DHPS, por PCR “touchdown”, foi, significativamente, maior nas amostras não filtradas (5/40, 12,5%) do que nas filtradas (0/40, 0%) ($P<0,05$). O mesmo efeito foi, também, observado com a PCR “nested”, com a qual se amplificou um maior número de amostras positivas, no grupo das amostras não filtradas (31/40, 77,5%), do que no grupo das amostras filtradas (13/40, 32,5%) ($P<0,001$). Esta observação pode dever-se à perda de quistos de *P. jirovecii*, durante o processo de filtração, e/ou à presença de inibidores, que não foram removidos, durante o processamento das amostras. De facto, nas amostras filtradas, a remoção das células humanas, aparentemente, não foi bem sucedida, uma vez que, o DNA humano foi amplificado pela β -globina PCR, em 90% (36/40) das amostras.

A ocorrência de perda de *P. jirovecii* durante a remoção das células do hospedeiro é um fenómeno provável, uma vez que estes microrganismos podem estar associados aos pneumócitos do tipo I e, também, podem ser fagocitados pelos

macrófagos alveolares. Assim, no estudo efectuado, a tentativa de eliminar a contaminação por células do hospedeiro, por microfiltração das amostras, conduziu, provavelmente, à perda de organismos ou DNA de *P. jirovecii*. Num estudo realizado por Icenhour *et al.* (2001), um método semelhante foi aplicado ao isolamento de *Pneumocystis*, a partir de pulmão do rato, de forma a prevenir a contaminação por células do hospedeiro. Nesse estudo, foram obtidos melhores resultados do que os apresentados por nós, provavelmente devido ao facto de os ratos poderem estar infectados com uma carga parasitária maior e não terem sido submetidos a nenhum tratamento. Também, nesse estudo, todo o pulmão do rato foi processado, o que pode ter contribuído para o melhor isolamento do microrganismo, pela técnica efectuada.

Assim, apesar da microfiltração não resolver o problema da inibição da amplificação de DNA específico de *P. jirovecii*, pela contaminação por DNA humano, foi obtida a maior frequência de amplificação, PCR “nested”. No nosso estudo, 77,5% das amostras foi amplificada por PCR “nested”, o que é um resultado semelhante ao descrito em estudos anteriores (Helweg-Larsen *et al.*, 1999, Ma *et al.*, 2002).

Para além dos dados apresentados anteriormente, relacionados com o efeito da filtração na detecção do DNA de *P. jirovecii*, o presente trabalho demonstra, também, que a detecção dos polimorfismos da DHPS de *P. jirovecii* pode ser, significativamente, melhorada com o uso da técnica de PCR “nested”, que levou ao aumento significativo da detecção nas amostras filtradas e não filtradas ($P < 0,001$ em ambas as condições), quando comparada com a PCR “touchdown”.

A quantidade de DNA pode ser um factor crítico na análise por PCR e o excesso de DNA pode ser inibidor da reacção de amplificação (Rossen *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1997). Os resultados obtidos, pela adição de DNA humano exógeno, sugerem que a

presença de DNA do hospedeiro pode ser perturbador da amplificação de DNA específico de *P. jirovecii*. De facto, os dados apresentados no quadro XXII demonstram que a adição de DNA do hospedeiro diminui a sensibilidade da PCR “touchdown”, efeito que é menos visível na PCR “nested”. Esta hipótese é, também, sustentada pelos dados provenientes do cálculo da razão (R) entre o DNA total quantificado e a carga parasitária, nas várias amostras estudadas. Foi observado que um valor de R superior a 6,5 estava associado à diminuição significativa no número de amostras positivas, obtidas por PCR “touchdown”. O valor limite de 6,5 foi seleccionado por se considerar ser este o mais próximo da mediana de R, obtida para as várias amostras estudadas. Assim, de acordo com os resultados obtidos, a presença de DNA do hospedeiro parece ser um dos factores mais relevantes na eficácia da amplificação por PCR, uma vez que a natureza das amostras clínicas utilizadas, na extracção de DNA (LBA ou EI), não afectou a taxa de amplificação do DNA do parasita.

Considerando estes dados, é possível que desenvolvimentos adicionais, no processamento de amostras, no sentido de promover a eliminação do DNA do hospedeiro, possam promover a utilização de uma metodologia baseada na PCR “nested”, com maior sensibilidade e especificidade, de forma a ultrapassar as limitações provenientes da actual inexistência de testes de sensibilidade aos fármacos *in vitro*.

CAPÍTULO V

ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA DA DHPS DE *P. JIROVECI*

V. ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA DA DHPS DE *P. JIROVECII*

1. INTRODUÇÃO

Apesar da aplicação generalizada de profilaxia anti-*P. jirovecii*, a pneumocistose é, ainda, uma das infecções oportunistas mais frequentes em doentes com infecção VIH/SIDA e outras imunodeficiências (Kaplan *et al.*, 2000).

Em Portugal, a PPc continua a ser uma das infecções oportunistas mais notificadas (Diogo, 1999), nos doentes com SIDA, não obstante a disponibilidade da quimioprofilaxia. As razões para este fracasso podem estar relacionadas com o desenvolvimento de microrganismos resistentes aos fármacos da família das sulfas, a sua biodisponibilidade reduzida e a depressão profunda do sistema imunitário, que dificulta a destruição dos microrganismos (Epstein *et al.*, 1994; Kazanjian *et al.*, 1998; Mei *et al.*, 1998).

Ao longo dos últimos anos, mutações descritas nos codões 55 e 57 do gene da DHPS de *P. jirovecii* têm sido associadas ao desenvolvimento de resistência aos fármacos da família das sulfas, em particular ao cotrimoxazol (Kazanjian *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 1999; Kazanjian *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Visconti *et al.*, 2001; Ma *et al.*, 2002). Estas mutações parecem estar implicadas na resistência à profilaxia da pneumocistose com sulfamidas, em doentes com infecção

VIH/SIDA e parecem, também, estar associadas ao aumento da mortalidade nestes doentes (Helweg-Larsen *et al.*, 1999). Como tal, o estudo da variabilidade genética da DHPS de *P. jirovecii* pode contribuir para o esclarecimento do papel deste gene no desenvolvimento de resistência aos fármacos.

Desta forma, no presente estudo pretendeu-se efectuar a caracterização genética da enzima DHPS de *P. jirovecii*, em isolados recolhidos entre 1995 e 2004, e estudar a potencial associação entre as sequências identificadas e as características epidemiológicas e clínicas, nomeadamente, o período de estudo, a idade, a serologia para VIH, o valor de pressão arterial de oxigénio, o radiograma do tórax, a contagem de linfócitos TCD4⁺ e, em particular, o uso da profilaxia anti-*P. jirovecii* com cotrimoxazol.

2. RESULTADOS

No presente trabalho, 260 isolados de *P. jirovecii*, identificados por técnicas parasitológicas (N=119) e moleculares (N=141), recolhidos entre Março de 2001 e Outubro de 2004, foram submetidos à análise, por PCR-RFLP, do gene da DHPS, para a identificação das mutações descritas nos codões 55 e 57. Também, 30 isolados, recolhidos entre 1995 e 2000, cuja identificação foi anterior ao presente trabalho (Matos, 1999), foram submetidos ao estudo da variação genética da DHPS de *P. jirovecii*.

Todas as amostras foram submetidas a PCR “touchdown” e, posteriormente, a PCR “nested”, e os respectivos produtos de amplificação foram sujeitas a hidrólise pelas

endonucleases de restrição *AccI* e *HaeIII*, para detecção dos polimorfismos nos codões 55 e 57.

Dos 260 isolados, recolhidos entre 2001 e 2004, foi possível amplificar, por PCR “touchdown”, o DNA genómico de *P. jirovecii* em 32 (12,3%) e em 228 (87,7%) não foi possível amplificar o fragmento de 785 pb do gene da DHPS de *P. jirovecii* (quadro XXIV). Por PCR “nested”, foi possível amplificar o gene da DHPS em 189 (72,7%) isolados e em 71 (27,3%) isolados não foi possível amplificar esta região. No estudo efectuado, todos os isolados com amplificação positiva por PCR “touchdown” também foram amplificados por PCR “nested”.

QUADRO XXIV. Amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii* em 260 isolados, recolhidos entre Março de 2001 e Outubro de 2004 e identificados por técnicas parasitológicas e moleculares.

AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA DHPS		ISOLADOS DE <i>P. JIROVECII</i>		
		IFI-AcM (N=119)	mt(LSU)rRNA-PCR (N=141)	Total (N=260)
PCR “touchdown”	Positiva	30 (25,2%)	2 (1,4%)	32 (12,3%)
	Negativa	89 (74,8%)	139 (98,6%)	228 (87,7%)
PCR “nested”	Positiva	85 (71,4%)	104 (73,8%)	189 (72,7%)
	Negativa	34 (28,6%)	37 (26,2%)	71 (27,3%)

Nas 30 amostras recolhidas entre 1995 e 2000, a amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii* foi positiva em todas as amostras estudadas, quer por PCR “touchdown” quer por PCR “nested”.

Assim, no total, 219 isolados de *P. jirovecii*, correspondentes a 189 amostras, recolhidas no período 2001–2004, e 30 amostras, obtidas no período 1995–2000, foram submetidos à hidrólise, com as endonucleases de restrição *AccI* e *HaeIII*, para a detecção dos polimorfismos descritos nos codões 55 e 57, respectivamente. A análise por RFLP, do gene da DHPS, permitiu a detecção dos polimorfismos identificados, nos codões 55 e 57, descritos na literatura (Helweg-Larsen *et al.*, 2000; Costa *et al.*, 2003a, 2005) (figura 9).

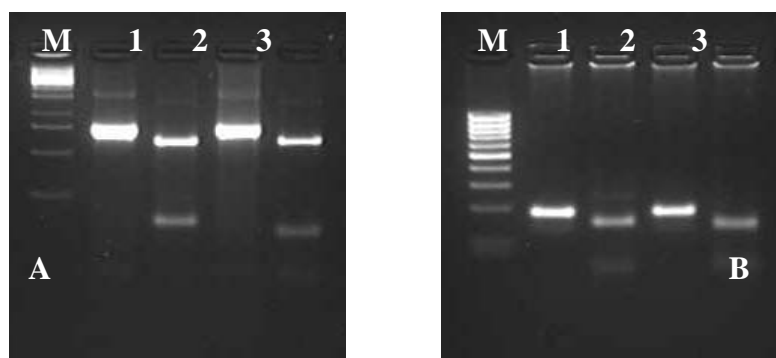


FIGURA 9. Electroforese em gel de agarose de produtos de amplificação e hidrólise pelas endonucleases de restrição *AccI* e *HaeIII* de um fragmento do gene da DHPS de *P. jirovecii*. A- Análise por PCR “touchdown”-RFLP do gene da DHPS. M: marcador de pesos moleculares “1 Kb DNA ladder” (Fermentas); 1: genótipo mutante do codão 55 (785 pb); 2: genótipo selvagem do codão 55 (157 e 628 pb); 3: genótipo mutante do codão 57 (785 pb); 4: genótipo selvagem do codão 57 (165 e 620 pb). B- Análise por PCR “nested”-RFLP do gene da DHPS. M: marcador de pesos moleculares “100 bp DNA ladder” (Fermentas); 1: genótipo mutante do codão 55 (186 pb); 2: genótipo selvagem do codão 55 (38 e 148 pb); 3: genótipo mutante do codão 57 (186 pb); 4: genótipo selvagem do codão 57 (46 e 140 pb).

Nos 219 isolados de *P. jirovecii*, a análise por RFLP do gene da DHPS permitiu a detecção do genótipo selvagem em 185 (84,5%) isolados e a identificação de genótipos mutantes em 34 (15,5%) (quadro XXV).

QUADRO XXV. Caracterização genética do gene da DHPS em 219 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 1995 e 2004.

PERÍODO	GENÓTIPO DA DHPS	Nº DE ISOLADOS
1995–2000 (N=30)	Selvagem	22 (73,3%)
	Mutante	4 (13,3%)
	Mutação 55 e 57	4
	Genótipos mistos	4 (13,3%)
	Selvagem 55 e mutação 55 e 57	3
	Selvagem e mutação 55 e 57	1
2001–2004 (N=189)	Selvagem	163 (86,2%)
	Mutante	8 (4,2%)
	Mutação 55 e 57	5
	Mutação 55	3
	Genótipos mistos	18 (9,5%)
	Selvagem e mutação 55 e 57	15
	Selvagem e mutação 55	2
Selvagem 55 e mutação 55 e 57	1	

Entre os 30 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 1995 e 2000, 22 (73,3%) apresentaram sequências do tipo selvagem do gene da DHPS e em oito (26,6%) foram identificados polimorfismos, nos codões 55 e 57 (quadro XXV). Em quatro (13,3%) isolados foram detectadas mutações nos codões 55 e 57 e nos restantes quatro (13,3%)

foi identificada uma mistura de genótipos (duplo mutante e selvagem no codão 55 em três isolados e duplo mutante e selvagem em um isolado).

Entre os isolados recolhidos no período 2001–2004, 163 (86,2%) apresentaram sequências do tipo selvagem do gene da DHPS (quadro XXV). Nos restantes 26 (13,7%) isolados, de *P. jirovecii*, foram identificados genótipos mutantes do gene da DHPS. Dos oito (4,2%) isolados onde foram detectadas mutações nos codões 55 e 57, cinco apresentaram mutações nos dois codões e três, apenas, no codão 55. Em 18 (9,5%) isolados, foi observada uma mistura de genótipos selvagem e mutantes da DHPS: 15 isolados apresentaram os genótipos de duplo mutante e selvagem; dois apresentaram o genótipo selvagem e mutação, no codão 55; e num isolado foram detectados os genótipos de duplo mutante e selvagem no codão 55.

Do conjunto de 32 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 2001–2004, 10 fragmentos de DNA de 785 pb, amplificados pela PCR “touchdown”, foram sequenciados, nos dois sentidos, com o objectivo de confirmar os genótipos obtidos por análise de PCR-RFLP e identificar novos polimorfismos. Em seis isolados as sequências obtidas eram idênticas ao do tipo selvagem e em quatro confirmou-se a presença simultânea de mutações nos codões 55 e 57.

No gráfico da figura 10, está representada a distribuição dos genótipos selvagem e mutantes do gene da DHPS de *P. jirovecii*, ao longo dos anos estudados. Apesar, do número de isolados estudados nos vários anos, ser diferente, pode-se observar uma diminuição da frequência dos genótipos mutantes, em comparação com a frequência das sequências do tipo selvagem da DHPS.

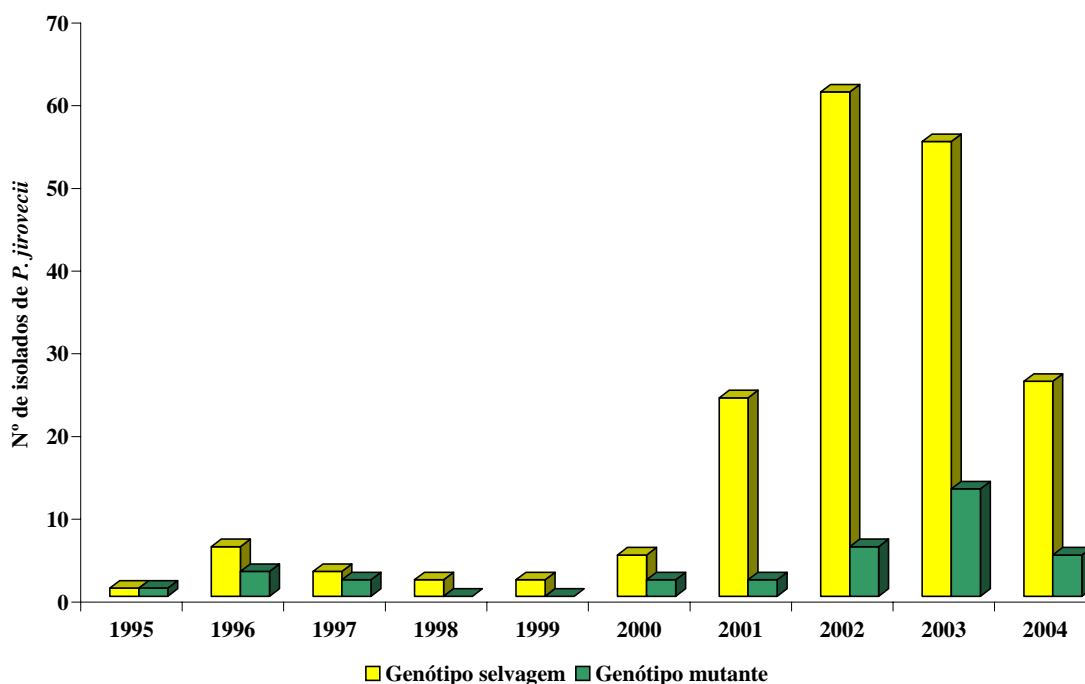


FIGURA 10. Representação gráfica da distribuição dos genótipos da DHPS de *P. jirovecii*, ao longo do período de tempo estudado.

Os 219 isolados de *P. jirovecii*, com o gene da DHPS caracterizado, correspondem a 184 episódios de PPc, em 177 doentes imunocomprometidos. Ao longo do segundo período de estudo (2001–2004), em seis doentes foi diagnosticado mais do que um episódio de PPc. Em cinco doentes foram observados dois episódios e num doente foram diagnosticados três episódios (quadro XXVI). Dos seis doentes, com mais do que um episódio de pneumocistose, quatro eram do sexo masculino e dois do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 25 e os 58 anos. Todos estes doentes eram seropositivos para VIH e a contagem de linfócitos TCD4⁺ variava entre as 11 e as 226 células/mm³.

QUADRO XXVI. Características clínicas e epidemiológicas de seis doentes com mais do que um episódio de pneumocistose documentado.

DOENTES	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS				EPISÓDIO DE	USO DE FÁRMACOS ANTI- <i>PNEUMOCYSTIS</i>		GENÓTIPO DHPS
	Sexo	Idade (anos)	Imunodeficiência	Linfócitos TCD ₄ ⁺ (células/mm ³)		PPC	Profilaxia	
D1	M	25	VIH	nd	1º	Não	Cotrimoxazol	Selvagem
				11	2º	Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	Selvagem
D2	F	58	VIH	173	1º	Não	Cotrimoxazol	Selvagem
				174	2º	Não	Cotrimoxazol	Selvagem
D3	M	43	VIH	77	1º	Não	Cotrimoxazol	Selvagem
				40	2º	Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	Selvagem
D4	M	28	VIH	223	1º	Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	Selvagem
				226	2º	Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	Selvagem
D5	F	43	VIH	nd	1º	Não	Cotrimoxazol	Selvagem
				nd	2º	Não	Cotrimoxazol	Selvagem
				150	3º	Não	Cotrimoxazol	Selvagem
D6	M	37	VIH	nd	1º	Não	Cotrimoxazol	Selvagem
				85	2º	Não	Cotrimoxazol	Mutação 55 e 57

F–Feminino; M–Masculino; nd–Não disponível

Destes seis doentes, três não estavam sujeitos a profilaxia anti-*P. jirovecii*, dois doentes não estavam sob profilaxia durante o primeiro episódio, mas estavam durante o segundo episódio, e um doente foi submetido a profilaxia, em ambos os episódios estudados. Todos os doentes foram submetidos a terapêutica anti-*P. jirovecii*, com cotrimoxazol. Destes seis doentes, cinco apresentaram sempre o mesmo genótipo da DHPS e num doente foi detectado o genótipo selvagem, no primeiro episódio, e no segundo o genótipo da DHPS foi observado o genótipo mutante (quadro XXVI).

Dos 177 doentes estudados, em 29 foram genotipadas amostras de secreções pulmonares repetidas. A recolha das amostras de secreções pulmonares seriadas, foi efectuada na altura do diagnóstico, entre o oitavo e o 12º dia após o início do tratamento da PPc e, sempre que possível, após a conclusão do tratamento. Em 20 doentes foram estudadas duas amostras, em sete foram tipadas três amostras e em dois doentes foram tipadas quatro amostras. Destes 29 doentes, 26 apresentaram, nas primeiras amostras recolhidas, sequências do gene da DHPS do tipo selvagem e três uma mistura de genótipo mutante e selvagem do gene da DHPS (quadro XXVII). Em quatro doentes detectou-se uma mudança de genótipo selvagem, nas primeiras amostras de secreções pulmonares estudadas, para genótipo mutante nas segundas amostras de secreções pulmonares. Noutro doente observou-se o contrário, as duas primeiras amostras de secreções pulmonares apresentaram uma mistura de genótipo selvagem e duplo mutante e na terceira amostra foi identificado, apenas, o genótipo selvagem (quadro XXVII). Nos restantes 24 doentes, o genótipo da DHPS permaneceu o mesmo, durante o episódio de pneumocistose.

QUADRO XXVII. Genótipos da DHPS de *P. jirovecii* em 29 doentes com amostras repetidas ao longo do episódio de PPC.

NÚMERO DE DOENTES	GENÓTIPO DA DHPS			
	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra	4ª amostra
1	Selvagem	Selvagem	Selvagem	Selvagem
6	Selvagem	Selvagem	Selvagem	—
15	Selvagem	Selvagem	—	—
1	Selvagem	Selvagem	Selvagem	Selvagem e mutação 55
1	Selvagem, mutação 55 e 57	Selvagem, mutação 55 e 57	Selvagem	—
2	Selvagem	Selvagem, mutação 55 e 57	—	—
1	Selvagem	Mutação 55 e 57	—	—
1	Selvagem, mutação 55 e 57	Selvagem, mutação 55 e 57	—	—
1	Selvagem e mutação 55	Selvagem e mutação 55	—	—

No quadro XXVIII, encontram-se resumidos os resultados do estudo da associação entre algumas características epidemiológicas e clínicas e o genótipo da DHPS, identificado nos 177 doentes estudados. Assim, observou-se maior frequência de mutações, no gene da DHPS de *P. jirovecii*, nos isolados recolhidos entre 1995 e 2000 do que nos isolados obtidos entre 2001 e 2004 (26,7% e 12,9%, respectivamente, $P=0,056$). Entre os 177 doentes, 14 (7,9%) eram crianças com idades compreendidas entre os dois meses e os 10 anos (mediana=3 anos). Os restantes 163 doentes (92.1%) eram adultos, com idades compreendidas entre os 20 e os 68 anos (mediana=37 anos). Neste estudo, a frequência de mutações no gene da DHPS foi menor nos isolados obtidos nas crianças do que nos adultos, no entanto, a diferença observada não foi estatisticamente significativa (7, 1% e 16%, respectivamente, $P=0,379$). Apenas, uma criança apresentou uma mistura de genótipo selvagem e mutação no codão 55.

Na população estudada, 149 (84,2%) doentes eram seropositivos para VIH e 16 (9%) doentes eram seronegativos. Nos restantes 12 (6,8%) doentes não havia informação sobre a serologia para VIH. Os genótipos da DHPS mutantes foram identificados em 16, 1% (24/149) dos seropositivos para VIH e em 12,5% (2/16) dos doentes seronegativos para VIH, não se tendo verificado correlação significativa entre a ocorrência de mutações no gene da DHPS e a infecção por VIH ($P=0,707$).

No presente estudo, o valor de pressão arterial de oxigénio (PaO_2) e a presença de um padrão radiológico compatível com pneumocistose, variáveis consideradas como medidas da gravidade da PPc, foram analisadas em função dos genótipos DHPS identificados. Como se pode observar no quadro XXVIII, os genótipos mutante e selvagem foram identificados em percentagens não muito diferentes entre os doentes com um valor de PaO_2 inferior ou igual a 65 mm Hg e os doentes com um valor superior a 65 mm Hg ($P=0,251$). Da mesma forma, não se verificou correlação entre a presença de genótipos mutantes e a apresentação de um padrão radiológico compatível com pneumocistose ($P=0,911$).

Entre os 177 doentes, 95 (53,7%) tinham um valor de contagem de linfócitos TCD4^+ inferior ou igual a 200 células/ mm^3 , em 15 (8,5%) foi observado um valor superior a 200 células/ mm^3 e nos restantes 67 (37,8%) doentes esta informação não estava disponível. Não foram identificados genótipos mutantes entre os doentes com contagem de linfócitos TCD4^+ superior a 200 células/ mm^3 – nos 15 doentes analisados todos apresentaram o genótipo selvagem do gene da DHPS.

QUADRO XXVIII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos da DHPS de *P. jirovecii* isolados a partir de 177 doentes imunocomprometidos com pneumocistose.

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS		GENÓTIPOS DHPS		P
		Selvagem	Mutante	
Período (N=177)	1995-2000	22 (73,3%)	8 (26,7%)	0,056
	2001-2004	128 (87,1%)	19 (12,9%)	
Idade (N=177)	≤ 18 anos	13 (92,9%)	1 (7,1%)	0,379
	>18 anos	137 (84%)	26 (16%)	
VIH (N=165)	Sim	125 (83,9%)	24 (16,1%)	0,707
	Não	14 (87,5%)	2 (12,5%)	
PaO₂ (mm Hg, N=124)	≤ 65	71 (86,6%)	11 (13,4%)	0,251
	> 65	33 (78,6%)	9 (21,4%)	
Rx Tórax (anormal, N=147)	Sim	101 (84,9%)	18 (15,1%)	0,911
	Não	24 (85,7%)	4 (14,3%)	
Linfócitos TCD4⁺ (células/mm ³ , N=110)	≤ 200	76 (80%)	19 (20%)	0,057
	> 200	15 (100%)	0 (0%)	
Profilaxia PPc (cotrimoxazol, N=150)	Sim	29 (82,9%)	6 (17,1%)	0,932
	Não	96 (83,5%)	19 (16,5%)	

Trinta e sete doentes (20,9%) estavam sob profilaxia anti-*P. jirovecii* (35 com cotrimoxazol e dois com pentamidina) e 113 (63,8%) não estavam submetidos a profilaxia. Nos restantes 27 (15,3%) não estava documentado o uso de profilaxia anti-*P. jirovecii*. Neste estudo, 17,1% (6/35) dos doentes sob profilaxia, com cotrimoxazol, apresentaram genótipos mutantes no gene da DHPS e em 16,5% (19/115) dos doentes não submetidos a profilaxia, ou que recebiam pentamidina em dose profiláctica, foram

identificadas mutações nos codões 55 e 57 do gene da DHPS (quadro XXVIII). Portanto, no estudo efectuado, não se observou correlação entre o uso de profilaxia, com cotrimoxazol, e a ocorrência de mutações no gene da DHPS de *P. jirovecii*.

3. DISCUSSÃO

No conjunto de 260 isolados, submetidos à caracterização por PCR-RFLP do gene da DHPS de *P. jirovecii*, 12,3% foram amplificados por PCR “touchdown” e 72,7% foram amplificados por PCR “nested”. A taxa de amplificação obtida foi semelhante à observada em estudos realizados por outros autores, em particular no que se refere à da PCR “nested” (Kazanjian *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2002).

No total, foram submetidos à análise por RFLP, 219 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 1995 e 2004, pertencentes a 177 doentes imunocomprometidos. Nestes doentes, as sequências mutantes do gene da DHPS foram mais frequentes entre os 30 analisados retrospectivamente (1995–2000), do que entre os 147 doentes cujos isolados foram recolhidos entre 2001 e 2004 (26,7% e 12,9%, respectivamente, $P=0,056$). Em estudos anteriores, foi demonstrada a diminuição significativa da frequência das mutações no gene da DHPS em isolados obtidos depois de 1998, após a introdução da HAART (Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Costa *et al.*, 2003a). Nos indivíduos com infecção por VIH, a introdução da HAART promoveu a melhoria substancial do estado imunológico e clínico dos doentes o que pode contribuir para uma menor utilização da profilaxia anti-*P. jirovecii*. Assim, a diminuição da frequência das mutações no gene da DHPS de *P. jirovecii* pode estar associada à menor exposição ao cotrimoxazol.

Com o objectivo de avaliar a estabilidade dos genótipos da DHPS identificados, procedeu-se ao estudo de secreções pulmonares seriadas recolhidas antes e durante o tratamento anti-*P. jirovecii*. As sequências da DHPS foram identificadas em 29 doentes e em 24 destes não se observou nenhuma alteração do genótipo identificado na primeira amostra. Em cinco doentes, foi detectada a alteração do genótipo da DHPS identificado nas primeiras amostras de secreções pulmonares. Num estudo anterior, entre os 12 doentes, com amostras seriadas de secreções pulmonares o genótipo da DHPS manteve-se estável ao longo do episódio de pneumocistose (Costa *et al.*, 2003). Outros autores observaram, também, que, na maioria dos doentes, o genótipo da DHPS mantém-se estável, mesmo que estes doentes estejam sob tratamento anti-*P. jirovecii* com cotrimoxazol ou com outros fármacos da família das sulfas (Helweg-Larsen *et al.*, 1999)

No presente trabalho, em cinco dos seis doentes com mais do que um episódio de pneumocistose, foi identificado o mesmo genótipo da DHPS. Apenas num doente observou-se a alteração das sequências do gene da DHPS, no primeiro episódio foi identificado o genótipo selvagem e no segundo foram detectadas mutações nos codões 55 e 57. Em estudos anteriores, que analisaram a heterogeneidade genética das regiões ITS, observaram-se, também, alterações nos genótipos identificados, em doentes com diferentes episódios de PPc (Keely & Stringer, 1996, 1997; Helweg-Larsen *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2003a). A identificação de genótipos diferentes no mesmo doente, em alturas diferentes, pode ser devida à infecção por tipos diferentes de *P. jirovecii* (Keely *et al.*, 1995; Keely & Stringer, 1996, 1997). Porém, pode ser devida, também, à existência de mais do que um tipo genético, no mesmo doente, sendo apenas identificado o tipo predominante no primeiro episódio.

No entanto, no estudo efectuado, a análise por PCR-RFLP permite a detecção da mistura de genótipos em, virtualmente, todas as amostras estudadas. Assim, a identificação de um genótipo diferente da DHPS, no segundo episódio de pneumocistose, pode ser devida à infecção um tipo diferente de *P. jirovecii*, assim como, à acção de pressão selectiva do tratamento com cotrimoxazol.

Neste estudo, entre os 219 isolados submetidos à caracterização genética da DHPS, de 177 doentes com pneumocistose, não se observou nenhuma associação, estatisticamente, significativa entre a presença de mutações nos codões 55 e 57 e características epidemiológicas ou clínicas analisadas. A frequência de mutações no gene da DHPS foi mais elevada entre os doentes seropositivos para VIH e nos doentes com contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior ou igual a 200 células/mm³, no entanto a diferença observada não foi, estatisticamente, significativa ($P=0,707$ e $0,057$, respectivamente). Também, não se verificou nenhuma correlação entre a presença de mutações no gene da DHPS e o uso de cotrimoxazol, na profilaxia anti-*P. jirovecii*, à semelhança do que foi observado em estudos anteriores, numa população de doentes Portugueses imunocomprometidos e em outros países (Navin *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2003a; Matos *et al.*, 2003a; Riebold *et al.*, 2006). Num estudo recente, foi elaborada uma revisão sistemática dos trabalhos publicados sobre a ocorrência de mutações no gene da DHPS de *P. jirovecii* e a sua relação com o insucesso da profilaxia e tratamento com cotrimoxazol ou com outras sulfas (Stein *et al.*, 2004). Os autores verificaram que, pelos resultados apresentados na maioria dos estudos, a probabilidade de *P. jirovecii* apresentar mutações no gene da DHPS era maior entre os doentes sob profilaxia do que entre aqueles que não estavam sob profilaxia com cotrimoxazol ou outros com fármacos da família das sulfas ($P<0,001$). No entanto, a correlação entre a presença de mutações

DHPS e o insucesso da profilaxia parece ser menor entre os isolados de *P. jirovecii* recolhidos após 1996, o que pode resultar da maior frequência de mutações nos doentes não expostos ao cotrimoxazol e a outras sulfas, ou decréscimo do uso da profilaxia anti-*P. jirovecii* (Stein *et al.*, 2004).

Estudos recentes demonstraram, através de ensaios de expressão homóloga e heteróloga, das mutações descritas no gene da DHPS de *P. jirovecii* em *E. coli* e *S. cerevisiae*, que as células com os polimorfismos nos codões 55 e 57 são mais resistentes às sulfas, do que as células portadoras do genótipo selvagem da DHPS (Meneau *et al.*, 2003; Iliades *et al.*, 2004, 2004a; Meneau *et al.*, 2004; Iliades *et al.*, 2005, 2005a). No entanto, estudos efectuados com o intuito de avaliar o papel das mutações identificadas no gene da DHPS, no sucesso terapêutico das sulfas e no desenrolar clínico da pneumocistose, apresentaram resultados contraditórios (Kazanjian *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 1999; Kazanjian *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2000; Visconti *et al.*, 2001; Navin *et al.*, 2001; Crothers *et al.*, 2005). De facto, na maioria destes estudos, os doentes portadores de mutações no gene da DHPS de *P. jirovecii* responderam com sucesso ao tratamento e não apresentaram formas mais graves de PPC, quando comparados com doentes infectados com *P. jirovecii* com DHPS do tipo selvagem. De facto, em consequência dos resultados contraditórios, apresentados pelos vários grupos de investigadores, é importante realizar mais estudos, com maior número de doentes, de forma a avaliar o papel das mutações do gene da DHPS de *P. jirovecii* no insucesso terapêutico com cotrimoxazol e estimar a ocorrência de outros factores, que podem levar ao desenvolvimento de resistência aos fármacos por parte deste parasita.

Neste estudo, em 16,5% dos doentes, que não estavam sob profilaxia anti-*P. jirovecii* foram identificadas mutações no gene da DHPS. Os resultados de estudo

anteriores mostraram, também, a ocorrência de mutações entre os doentes não expostos ao cotrimoxazol ou a outros fármacos da família das sulfas (Takahashi *et al.*, 2000; Visconti *et al.*, 2001; Costa *et al.*, 2003a). Também, no presente estudo, os polimorfismos do gene da DHPS foram detectados entre doentes seronegativos para VIH e em crianças (12,5% e 7, 1%, respectivamente), à semelhança do que foi observado por outros autores (Totet *et al.*, 2004, 2004a, 2004b; Zar *et al.*, 2004; Beard *et al.*, 2005). A ocorrência de mutações do gene da DHPS em isolados de doentes não expostos ao cotrimoxazol e a outros fármacos da família das sulfas, sugere que estes polimorfismos possam ser adquiridos acidentalmente, através de uma fonte ambiental ou por transmissão pessoa-a-pessoa.

Ao longo dos últimos anos, diversos estudos foram realizados no sentido de caracterizar geneticamente a enzima DHPS, assim como, avaliar o seu contributo no desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol. Apesar de parecer ser consensual que as mutações no gene da DHPS possam ser devidas à acção da pressão selectiva exercida pelos fármacos da família das sulfas, não está esclarecido, ainda, o seu papel no insucesso no tratamento da pneumocistose. De futuro, será necessário efectuar novos estudos de caracterização da DHPS e de outros marcadores genéticos, com maior número de doentes sob regimes profilácticos e terapêuticos com cotrimoxazol, com o intuito de clarificar o desenvolvimento de resistência, assim como contribuir para o estudo da transmissão e epidemiologia da pneumocistose.

CAPÍTULO V

ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA DA DHFR DE *P. JIROVECII*

V. ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA DA DHFR DE *P. JIROVECII*

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos últimos anos, vários autores têm analisado a ocorrência de mutações no gene da DHPS de *P. jirovecii* e avaliado a sua contribuição para o desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol e a outras sulfamidas. No entanto, ainda está, completamente, esclarecido o papel destes polimorfismos na evolução clínica da pneumocistose, nem o fenótipo de resistência ao cotrimoxazol está caracterizado. Assim, alguns investigadores iniciaram o estudo de outros *loci* genéticos com o intuito de clarificar as causas do potencial desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol, em *P. jirovecii*.

Recentemente, alguns estudos têm analisado a heterogeneidade genética da DHFR em *P. jirovecii*. Actualmente, estão descritas 25 substituições na sequência do gene da DHFR, 19 delas não sinónimas, que resultam na alteração da sequência da proteína, e cinco sinónimas, que mantêm igual a sequência de aminoácidos (Ma *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2002a; Nahimana *et al.*, 2004; Robberts *et al.*, 2005). No entanto, apenas um estudo demonstrou a existência de correlação entre a ocorrência de polimorfismos não sinónimos e o insucesso profiláctico com inibidores da DHFR, nomeadamente com o trimetoprim e a pirimetamina (Nahimana *et al.*, 2004).

O presente trabalho, teve por finalidade o estudo da caracterização genética da DHFR de *P. jirovecii* em isolados de doentes imunocomprometidos, obtidos entre 1995 e 2004, e estudar a potencial associação entre as sequências identificadas e as características epidemiológicas e clínicas, em particular com o uso da profilaxia anti-*P. jirovecii* com cotrimoxazol.

2. RESULTADOS

Duzentos e sessenta isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre Março de 2001 e Outubro de 2004, foram submetidos à amplificação de um fragmento de 798 pb da região codificante do gene da DHFR de *P. jirovecii*. Da mesma forma, 30 isolados, cuja identificação do parasita foi obtida antes do início do presente estudo, entre 1995 e 2000, foram, também, sujeitos à amplificação do gene da DHFR. Os produtos da PCR “nested” (figura 11) foram, posteriormente, submetidos à análise da sequência de DNA, por sequenciação directa.

Dos 260 isolados, identificados por técnicas parasitológicas (N=119) e moleculares (N=141), 89 (34,2%) foram positivos por PCR “nested” e 171 (65,8%) foram negativos (quadro XXIX). Os 30 isolados, recolhidos no período 1995–2000, foram todos positivos por PCR “nested”.

As sequências do gene da DHFR dos 119 isolados de *P. jirovecii*, positivos por PCR “nested”(89 pertencentes ao período 2001–2004 e 30 pertencentes ao período 1995–2000), foram alinhadas e comparadas com a sequência do tipo selvagem depositada na base de dados do GenBank (número de acesso AF090368).

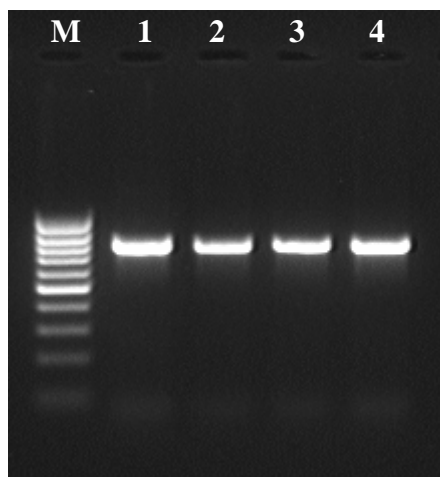


FIGURA 11. Electroforese em gel de agarose do produto de amplificação de um fragmento do gene da DHFR de *P. jirovecii*. M: Marcador de pesos moleculares “100 bp DNA ladder” (Fermentas); 1-4: Fragmento de 798 pb do gene da DHFR de *P. jirovecii*.

QUADRO XXIX. Amplificação do gene da DHFR de *P. jirovecii* em 260 isolados, recolhidos entre Março de 2001 e Outubro de 2004 e identificados por técnicas parasitológicas e moleculares.

AMPLIFICAÇÃO DO GENE DA DHFR		ISOLADOS DE <i>P. JIROVECI</i>		
		IFI-AcM (N=119)	mtLSUrRNA-PCR (N=141)	Total (N=260)
PCR “nested”	Positiva	49 (41,2%)	40 (28,4%)	89 (34,2%)
	Negativa	70 (58,8%)	101 (71,6%)	171 (65,8%)

Do total de 119 isolados estudados, 82 (68,9%) apresentaram sequências do tipo selvagem e 37 (31,1%) revelaram polimorfismos na sequência do gene da DHFR (quadro XXX). Dos 82, isolados que apresentaram sequências do tipo selvagem da DHFR, 61 (74,4%) foram recolhidos entre 2001 e 2004 e 21 (25,6%) foram obtidos no período 1995–2000. Entre os 37 isolados, em que foram identificados polimorfismos no gene da DHFR, 28 (75,7%) foram recolhidos entre 2001 e 2004 e 9 (24,3%) foram diagnosticados entre 1995 e 2000 (quadro XXX).

No presente estudo, foram identificados nove locais com substituições de nucleótidos. Foram observadas quatro substituições sinónimas nas posições nucleotídicas 201 (substituição de timina por adenina), 272 (timina por citosina), 312 (timina por citosina) e 381 (citosina por timina) em 33 isolados (quadro XXX). Também foram detectadas cinco substituições nucleotídicas não sinónimas nas posições 38 (timina por citosina), 68 (adenina por guanina), 92 (citosina por timina), 154 (adenina por timina) e 200 (citosina por timina), em cinco isolados, respectivamente. As substituições não sinónimas resultaram na alteração de aminoácidos nos codões 13 (alteração de uma leucina por uma serina), 23 (aspargina por serina), 31 (serina por fenilalanina), 52 (metionina por leucina) e 67 (alanina por valina). Um isolado apresentou, simultaneamente, um polimorfismo sinónimo na posição 272 e uma substituição não sinónima no codão 31 (quadro XXX).

À excepção das substituições identificadas nas posições nucleotídicas 312 e 200, os polimorfismos detectados, neste estudo, foram observados pela primeira vez e as respectivas sequências foram depositadas na base dados do GenBank, com os números de acesso DQ417355 até DQ417360 (Costa *et al.*, 2006a).

QUADRO XXX. Caracterização genética do gene da DHFR em 119 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 1995 e 2004.

PERÍODO	SEQUÊNCIAS DO GENE DA DHFR DE <i>P. JIROVECI</i>	Nº DE ISOLADOS
1995–2000 (N=30)	Selvagem	21 (70%)
	Polimorfismos	9 (30%)
	Sinónimos	
	312 (T/C)	6
	Não sinónimos	
	38 (T/C) Leucina 13 Serina	1
	68 (A/G) Aspargina 23 Serina	1
200 (C/T) Alanina 67 Valina	1	
2001–2004 (N=89)	Selvagem	61 (68,5%)
	Polimorfismos	28 (31,5%)
	Sinónimos	
	312 (T/C)	22
	381 (C/T)	3
	201 (T/A)	1
	272 (T/C)	1 ^a
Não sinónimos		
92 (C/T) Serina 31 Fenilalanina	1 ^a	
154 (A/T) Metionina 52 Leucina	1	

“a”-Polimorfismos identificados no mesmo isolado; A-adenina; C-citosina, G-guanina; T-timina.

Os produtos de amplificação de 10 isolados, seleccionados aleatoriamente, foram submetidos a clonagem e as sequências obtidas foram, posteriormente, sequenciadas. Todas as sequências clonadas, de cada um dos isolados, apresentaram o mesmo genótipo, não se tendo identificado nenhuma mistura de sequências da DHFR.

Dos 10 isolados, cujos produtos de PCR foram sujeitos a amplificação, em cinco foram detectados polimorfismos sinónimos na posição nucleotídica 312, dois apresentaram substituições sinónimas na posição 381 e três revelaram sequências do tipo selvagem.

Os 119 isolados de *P. jirovecii*, com as sequências de DHFR caracterizadas, foram obtidos de 108 doentes imunocomprometidos e correspondem a 109 episódios de PPc. Num doente foram diagnosticados dois episódios de PPc separados por oito meses. Este doente apresentou no primeiro isolado uma substituição sinónima na posição nucleotídica 312 (T/C) e no segundo foi detectado o tipo selvagem da sequência do gene da DHFR. Este doente não estava a fazer profilaxia quando ocorreu o primeiro episódio de PPc e no segundo episódio estava sob profilaxia com pentamidina em aerossol. Em ambos os episódios foi tratado, com sucesso, com cotrimoxazol.

Em sete dos 108 doentes estudados, foram recolhidas amostras de secreções pulmonares seriadas. Em quatro foi possível recolher duas amostras seriadas e em três foram obtidas três amostras seriadas (quadro XXXI). A recolha das amostras foi efectuada altura do diagnóstico, entre o oitavo e o 12º dia após o início do tratamento da PPc e, sempre que possível, após a conclusão do tratamento. Nos sete doentes com amostras seriadas, quatro apresentaram sequências do tipo selvagem da DHFR e em três foram detectados polimorfismos sinónimos, na posição nucleotídica 312, em dois, e na posição 381, num doente. Destes sete doentes com amostras seriadas, apenas num se observou uma alteração do tipo de sequência da DHFR – nas duas primeiras amostras de secreções pulmonares foi identificada uma substituição sinónima na posição nucleotídica 312 e na terceira amostra foram detectadas, apenas, sequências do tipo selvagem (quadro XXXI). Destes doentes, apenas um, que apresentou o genótipo selvagem da DHFR, estava sob profilaxia anti-*P. jirovecii*.

QUADRO XXXI. Caracterização genética da DHFR de *P. jirovecii*, isolado a partir de sete doentes com amostras repetidas ao longo do episódio de PPc.

NÚMERO DE DOENTES	SEQUÊNCIA DA DHFR		
	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra
2	Selvagem	Selvagem	Selvagem
2	Selvagem	Selvagem	—
1	312 (T/C)	312 (T/C)	Selvagem
1	312 (T/C)	312 (T/C)	—
1	381 (C/T)	381 (C/T)	—

A-adenina; C-citosina, G-guanina; T-timina.

Entre os 108 doentes, cujos isolados foram submetidos à caracterização genética da DHFR, 69 (63,9%) eram ao sexo masculino e 39 (36,1%) eram do sexo feminino. A idade dos doentes estudados variou entre os sete meses e os 69 anos (mediana=36 anos). Doze (11,1%) doentes eram crianças, com idades compreendidas entre os sete meses e os 10 anos, e 96 (88,9%) eram adultos, entre os 24 e os 69 anos de idade. Dos 108 doentes, 91 (84,3%) eram seropositivos para VIH, nove (8,3%) eram seronegativos para VIH e nos restantes oito (7,4%) doentes era desconhecida a informação sobre a serologia para VIH. Em relação ao valor da pressão arterial de oxigénio, 63 (58,3%) doentes apresentaram um valor inferior ou a igual a 65 mm Hg, 25 (23,1%) tinham um valor superior a 65 mm Hg e nos restantes 20 (18,5%) doentes esta informação não era conhecida. Dos 108 doentes, 80 (74,1%) apresentavam um padrão radiológico compatível com pneumocistose, 14 (13%) não apresentavam um padrão radiológico compatível e nos restantes 14 (13%) não existia essa informação. Relativamente à

contagem de linfócitos TCD4⁺, em 43 (39,8%) doentes era inferior a 50 células/mm³, em 21 (19,4%) era inferior ou igual a 200 células/mm³ e em oito (7,4%) era superior a 200 células/mm³. Nos restantes 36 (33,3%) doentes não foi possível obter esta informação. Do total de doentes estudados, 20 (18,5%) estavam sob profilaxia anti-*P. jirovecii* (19 com cotrimoxazol e um com pentamidina) e 74 (68,5%) doentes não estavam sob profilaxia. Em 14 (13%) doentes não estava documentado o uso de profilaxia.

No quadro XXXII, está resumido o estudo da associação entre algumas características epidemiológicas e clínicas e a ocorrência das sequências do gene da DHFR identificadas nos 108 doentes analisados. Neste trabalho, foi feito um estudo da associação entre o período de recolha das amostras (1995–2000 e 2001–2004), a idade dos doentes, o estado de seropositividade para VIH, o valor da pressão arterial de oxigénio, o padrão radiológico apresentado, o valor da contagem de linfócitos TCD4⁺ e o uso de profilaxia, com cotrimoxazol, com a presença de polimorfismos sinónimos e não sinónimos no gene da DHFR.

Assim, observou-se menor frequência de polimorfismos sinónimos nos isolados obtidos entre 1995–2000, do que nos isolados recolhidos entre 2001–2004 (20% e 30,8%, respectivamente). No entanto, detectou-se o inverso em relação aos polimorfismos não sinónimos, cuja a frequência foi mais elevada no período 1995–2000, do que entre 2001 e 2004 (10% e 2,6%, respectivamente).

Os polimorfismos sinónimos foram menos frequentes entre os isolados de *P. jirovecii* recolhidos em crianças do que os obtidos em adultos (16,7% e 21,2%, respectivamente). Pelo contrário, as alterações não sinónimas foram mais frequentes no

grupo de isolados recolhido em crianças do que no grupo de isolados obtido nos adultos (8,3% e 4,2%, respectivamente).

As substituições nucleotídicas sinónimas foram observadas em percentagens não muito diferentes, entre o grupo de doentes seropositivos para VIH e o grupo de seronegativos (28,6% e 22,2%, respectivamente). Por outro lado, as substituições não sinónimas foram detectadas em 11,1% dos seronegativos para VIH e 4,2% dos seropositivos.

Por outro lado, verificou-se maior frequência de polimorfismos, sinónimos e não sinónimos, no gene da DHFR, no grupo de doentes que apresentavam um valor de PaO₂ superior a 65 mm Hg e no grupo de doentes que não tinha o padrão radiológico compatível com a pneumocistose. No entanto, a diferença observada só foi, estatisticamente, significativa em relação à ocorrência de polimorfismos não sinónimos em doentes com um valor de PaO₂ superior a 65 mm Hg ($P=0,021$).

Em relação à contagem de linfócitos TCD4⁺, observou-se maior percentagem de polimorfismos, sinónimos e não sinónimos, entre os doentes com contagem inferior ou igual a 200 células/mm³, no entanto a diferença observada não foi, estatisticamente, significativa ($P=0,693$ e $1,000$, respectivamente).

Entre os 108 doentes estudados, 19 (17, 6%) estavam sob profilaxia com cotrimoxazol. Setenta e cinco (69,4%) não estavam sob profilaxia (74 doentes) ou recebiam pentamidina em doses profiláticas (um doente). As substituições sinónimas do gene da DHFR foram mais frequentes entre os doentes que não estavam sob profilaxia com cotrimoxazol. Por outro lado, os polimorfismos não sinónimos foram observados com maior frequência nos doentes que recebiam cotrimoxazol, em regime profilático.

QUADRO XXXII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos da DHFR de *P. jirovecii* isolado de 108 doentes imunocomprometidos com PPc.

CARACTERÍSTICAS		SEQUÊNCIAS DO GENE DA DHFR DE <i>P. JIROVECII</i>				
		Selvagem	Polimorfismos sinónimos ^a	P	Polimorfismos não sinónimos ^a	P
EPIDEMIOLOGÍCAS E CLÍNICAS						
Período (N=108)	1995–2000	21 (70%)	6 (20%)	0,263	3 (10%)	0,130
	2001–2004	53 (67,9%)	24 (30,8%)		2 (2,6%)	
Idade (N=108)	≤18 anos	9 (75%)	2 (16,7%)	0,362	1 (8,3%)	0,517
	>18 anos	65 (67,7%)	28 (21,2%)		4 (4,2%)	
VIH (N=100)	Sim	62 (68,3%)	26 (28,6%)	0,565	3 (4,4%)	0,345
	Não	6 (66,7%)	2 (22,2%)		1 (11,1%)	
PaO₂ (mm Hg, N=88)	≤ 65	47 (74,6%)	16 (25,4%)	0,320	0 (0%)	0,021
	> 65	13 (52%)	9 (36%)		3 (12%)	
Rx Tórax (anormal, N=94)	Sim	59 (73,8%)	19 (23,8%)	0,430	2 (2,5%)	0,387
	Não	6 (42,9%)	7 (50%)		1 (7,1%)	
Linfócitos TCD4⁺ (células/mm ³ , N=72)	≤ 200	44 (68,8%)	18 (28,1%)	0,639	2 (3,1%)	1,000
	> 200	6 (75%)	2 (25%)		0 (0%)	
Profilaxia PPc (cotrimoxazol, N=94)	Sim	14 (73,7%)	4 (21%)	0,616	1 (5,3%)	1,000
	Não	52 (69,3%)	20 (26,7%)		3 (4%)	

“a”– Um doente apresentou simultaneamente uma alteração sinónima e outra não sinónima na sequência do gene da DHFR de *P. jirovecii*.

Entre os isolados de *P. jirovecii* obtidos em doentes que estavam sob profilaxia com cotrimoxazol, quatro apresentaram uma substituição sinónima na posição nucleotídica 312 e num foi detectada uma substituição não sinónima na posição nucleotídica 38, correspondente à substituição de uma leucina por uma serina no codão 13. No entanto, as diferenças verificadas entre estes dois grupos de doentes não foram, estatisticamente, significativas (quadro XXXII).

No presente estudo, a sequência da proteína DHFR de *P. jirovecii* foi alinhada com a sequência homóloga de outros microrganismos e procedeu-se à comparação entre as cinco substituições não sinónimas, que resultaram na alteração da sequência de aminoácidos, com as mutações que causam resistência ao trimetoprim e à pirimetamina em outros microrganismos, nomeadamente, *S. aureus* (Dale *et al.*, 1997), *S. pneumoniae* (Maskell *et al.*, 2001) e *P. falciparum* (Khalil *et al.*, 2003) (figura 12). Os locais de substituição identificados nos codões 13, 23 e 52 encontram-se em regiões conservadas da proteína, em *Pneumocystis* isolado de outros hospedeiros (*P. carinii*). No entanto, as mutações observadas na nossa população não estão relacionadas com as que causam resistência aos inibidores da DHFR, em outros microrganismos (Dale *et al.*, 1997; Maskell *et al.*, 2001; Khalil *et al.*, 2003).

3. DISCUSSÃO

No presente trabalho, 119 isolados de *P. jirovecii*, correspondentes a 109 episódios de PPc, em 108 doentes foram submetidos à amplificação de um fragmento do gene da DHFR e os produtos de amplificação foram sujeitos à análise da sequência

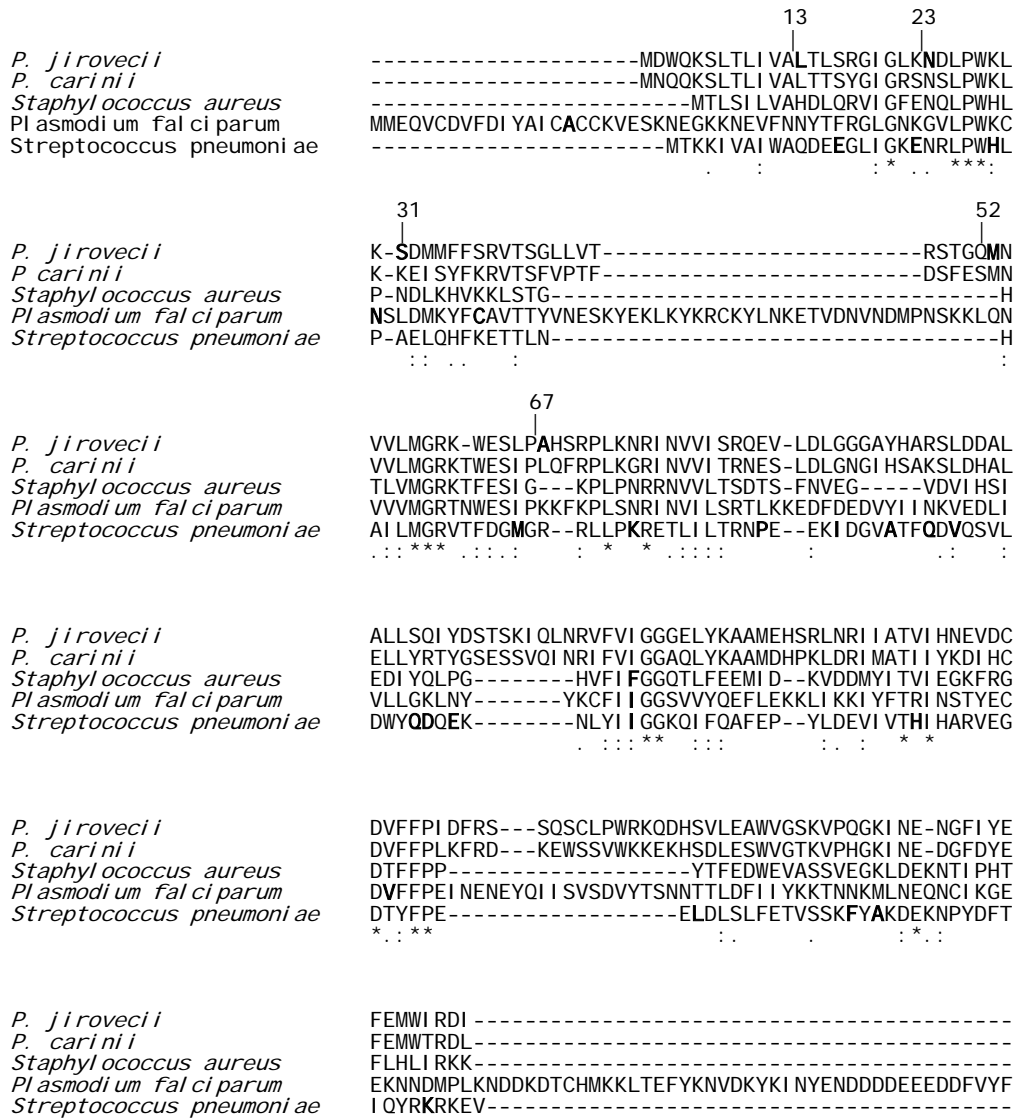


FIGURA 12. Alinhamento das seqüências de aminoácidos da dihidrofolato redutase de *P. jirovecii* e de outros microrganismos. As posições onde ocorrem alterações na seqüência de aminoácidos da DHFR que conferem resistência ao trimetoprim e à pirimetamina em *S. aureus*, *S. pneumoniae* e em *P. falciparum* estão representadas a negro. As alterações na seqüência de aminoácidos da DHFR de *P. jirovecii*, identificadas, no presente estudo, encontram-se, também, marcadas a negro. A escala, representada no topo do alinhamento, corresponde à numeração dos aminoácidos da DHFR de *P. jirovecii*. Os resíduos de aminoácidos idênticos, muito ou pouco conservados, estão indicados com asteriscos, dois pontos e um ponto, respectivamente. Os traços indicam os resíduos de aminoácidos em falta.

de DNA, por sequenciação directa dos produtos de PCR.

As sequências obtidas foram comparadas com a sequência do tipo selvagem de *P. jirovecii*, através do programa BLAST, e foram alinhadas pelo programa informático Clustall W. Nos 119 isolados, 37 (31,1%) apresentaram polimorfismos na sequência do gene da DHFR de *P. jirovecii*. No total, nove locais de substituição, quatro alterações sinónimas e cinco não sinónimas, foram identificados.

Os polimorfismos, identificados no presente estudo, à excepção da substituição sinónima na posição 312 e da alteração não sinónima detectada no codão 67 (substituição de uma alanina por uma valina), foram observados pela primeira vez (Ma *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2002a; Nahimana *et al.*, 2004; Robberts *et al.*, 2005). Num estudo anterior, foi observada uma substituição não sinónima no codão 52, que resultou na alteração de uma metionina por um resíduo de isoleucina (Nahimana *et al.*, 2004). No presente trabalho, foi identificada a substituição do resíduo de metionina na posição 52, por uma leucina.

Até agora, poucos estudos têm avaliado a variação genética do gene da DHFR de *P. jirovecii* e a sua relação com o insucesso da profilaxia e tratamento com os inibidores da DHFR (trimetoprim ou pirimetamina) (Ma *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2002a; Nahimana *et al.*, 2004). No presente trabalho, não foi observada uma associação, estatisticamente, significativa entre o insucesso da profilaxia com cotrimoxazol e a presença de polimorfismos, sinónimos e não sinónimos, da DHFR de *P. jirovecii*. Dos cinco doentes que apresentaram substituições não sinónimas, na sequência do gene da DHFR, apenas um estava sob profilaxia com cotrimoxazol. No estudo efectuado por Nahimana e colegas (2004), foi observada uma associação significativa entre a ocorrência de várias mutações no gene da DHFR de *P. jirovecii* e o insucesso da

profilaxia para a pneumocistose. Na análise realizada, estes autores não avaliaram o efeito da presença de cada uma das mutações descritas, considerando apenas o conjunto de alterações. Também, a maioria dos doentes estudados estava sob profilaxia anti-*P. jirovecii*, utilizando a pirimetamina como inibidor da DHFR, em conjunto com a sulfadoxina ou com a atovaquona. Estes fármacos são agentes profiláticos e terapêuticos alternativos, raramente utilizados. Os autores sugeriram que a pirimetamina possa exercer uma maior pressão sobre o gene da DHFR, quando comparada com o trimetoprim. De facto, estudos realizados *in vitro* sugerem que a pirimetamina tem uma acção inibidora sobre a DHFR de *Pneumocystis* maior do que o trimetoprim (Ma *et al.*, 2000).

Também, através do alinhamento da sequência da DHFR de *P. jirovecii*, com a sequência homóloga de outros microrganismos, verificou-se que os polimorfismos não sinónimos, que foram identificados, não estão relacionados, nem se encontram em posições semelhantes, às mutações responsáveis pelo desenvolvimento de resistência aos inibidores da DHFR (trimetoprim e pirimetamina), em outros microrganismos.

No presente estudo, apesar de não ter sido identificada correlação entre a presença de polimorfismos, sinónimos e não sinónimos, com o insucesso profilático, observou-se uma frequência de alterações, relativamente, elevada. Os resultados obtidos, sugerem, então, que um estudos adicionais, a diversidade genética da DHFR de *P. jirovecii*, e de outros marcadores, numa maior população de doentes, podem contribuir para o esclarecimento e melhor caracterizar o papel deste gene no desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol.

CAPÍTULO VII

ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA DAS REGIÕES ITS DO rRNA

NUCLEAR DE *P. JIROVECI*

VII. ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA DAS REGIÕES ITS DO rRNA NUCLEAR DE *P. JIROVECII*

1. INTRODUÇÃO

A inexistência de um método de cultura *in vitro*, de *P. jirovecii*, que seja eficaz e reprodutível, tem constituído um obstáculo importante no estudo da transmissão e da epidemiologia da pneumocistose. Ao longo dos últimos anos, a aplicação de técnicas de biologia molecular, na caracterização genética de *P. jirovecii*, permitiu o desenvolvimento de métodos de identificação genótipos, indispensáveis na clarificação de alguns aspectos fundamentais da epidemiologia deste parasita. Assim, a observação de diferentes tipos genéticos de *P. jirovecii* tem contribuído para o esclarecimento de algumas questões importantes como o modo de aquisição da infecção (activação de infecção latente ou re-infecção) ou o mecanismo de transmissão deste microrganismo.

A genotipagem das regiões ITS do rRNA nuclear é método muito informativo e discriminatório, utilizado no estudo da epidemiologia molecular da pneumocistose, devido ao elevado número de diferentes sequências que é capaz de diferenciar (Lee *et al.* 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 2001; Nimri *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2003a). A tipagem das regiões ITS, do rRNA nuclear de *P. jirovecii*, consiste na amplificação por PCR, sendo, posteriormente, o fragmento amplificado analisado por hibridização e/ou

análise da sequência de DNA, por sequenciação automática. Inicialmente, os genótipos ITS eram identificados por sequenciação directa dos produtos de PCR. No entanto, este método não permite a identificação de múltiplos genótipos, em isolados que podem conter mais do que um genótipo. No caso da sequenciação automática, a identificação de múltiplos genótipos pode ser efectuada através da clonagem dos produtos de PCR, num vector adequado, seguida da sequenciação directa dos clones obtidos.

No presente estudo, pretendeu-se identificar os genótipos ITS, presentes nos isolados de *P. jirovecii*, detectados numa população de doentes imunocomprometidos e relacionar os genótipos observados com algumas características epidemiológicas e clínicas, nomeadamente, com o valor da pressão arterial de oxigénio inferior a 65 mm Hg e o radiograma do tórax, que podem estar associadas a maior virulência deste microrganismo.

2. RESULTADOS

No presente trabalho, 260 isolados de *P. jirovecii*, identificados por técnicas parasitológicas e moleculares, foram recolhidos entre Março de 2001 e Outubro de 2004 e submetidos ao estudo de caracterização genética das regiões ITS, do gene do rRNA nuclear, por sequenciação automática. Para tal, um fragmento de 550 pb, que inclui a região ITS1, o gene que codifica o 5.8S rRNA e a região ITS2 foi amplificado por PCR “nested” (figura 13) e os produtos amplificados foram submetidos à análise da sequência de DNA, por sequenciação automática directa. Onze produtos de PCR,

seleccionados aleatoriamente, foram clonados e os clones foram sequenciados, nos dois sentidos, da sequência de DNA.

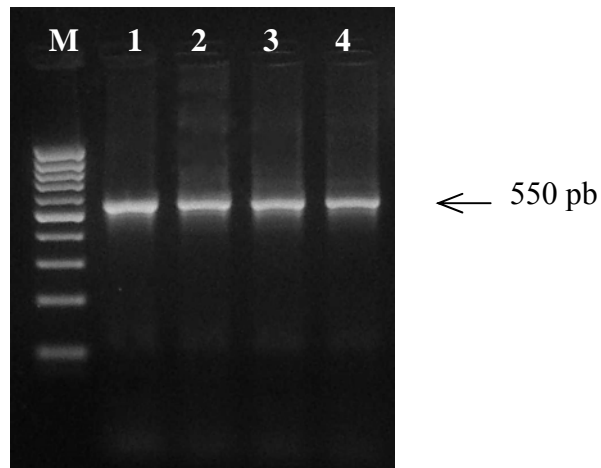


FIGURA 13. Electroforese em gel de agarose do produto de amplificação de um fragmento das regiões ITS do gene de rRNA de *P. jirovecii*. M: Marcador de pesos moleculares “100 bp DNA ladder” (Fermentas); 1-4: Fragmento de 550 pb das regiões ITS do gene de rRNA de *P. jirovecii*.

Dos 260 isolados, foi possível amplificar, por PCR “nested”, um fragmento das regiões ITS do gene que codifica o rRNA nuclear de *P. jirovecii*, em 136 (52,3%). Nos 124 (47,7%) isolados restantes não se obteve amplificação, por PCR (quadro XXXIII). Àquele conjunto, foram, também, adicionados os 30 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 1995 e 2000 (Matos, 1999). Desta forma, um total de 166 isolados, cujas regiões ITS foram amplificadas com sucesso, foram sequenciadas. As sequências obtidas foram alinhadas e comparadas com os genótipos publicados através do programa informático Clustall W, de forma a identificar os genótipos.

QUADRO XXXIII. Amplificação de um fragmento de 550 pb das regiões ITS do gene que codifica o rRNA nuclear de *P. jirovecii* em 260 isolados, recolhidos entre Março de 2001 e Outubro de 2004 e identificados por técnicas parasitológicas e moleculares.

AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES ITS		ISOLADOS DE <i>P. JIROVECII</i>		
		IFI-AcM (n=119)	mtLSUrRNA-PCR (n=141)	Total (n=260)
PCR “nested”	Positiva	61 (51,3%)	75 (53,2%)	136 (52,3%)
	Negativa	58 (48,7%)	66 (46,8%)	124 (47,7%)

No total dos 166 isolados, foram identificados 11 tipos de sequências da região ITS1 (A, B, C, D, E, G, H, “H”, J, N e O) e 13 tipos de sequências da região ITS2 (a, b, c, e, f, g, h, i, l, k, m, n e “o”). Considerando as sequências identificadas nos dois fragmentos, foram detectados 30 genótipos ITS distintos (resultantes da combinação do tipo de sequências identificadas nas regiões ITS1 e ITS2), entre os 166 isolados. Em ambos os períodos de tempo, o genótipo Eg foi o predominante, tendo sido identificado em 80 (48,2%) isolados (quadro XXXIV).

Os segundo e terceiro genótipos mais frequentes foram o Cg (em 15 isolados, 9%) e o Gg (em 14 isolados, 8,4%). Os restantes genótipos identificados foram o Bi (em seis isolados, 3,6%), o Ce (em cinco isolados, 3%), o Ai, o Eb, o Eh e o Ne (em quatro isolados cada, 2,4% cada), o Cn, o Hg, o Jf e o Og (em três isolados cada, 1,8% cada), o Dg, o Ec, o Ei e o Em (em dois isolados cada, 1,2% cada) e o Al, o Bk, o Bl, o De, o Ea, o Ee, o En, o Hi, o “Ho”, o Jb, o Ng, o Nn e o Oe (em um isolado cada, 0,6% cada).

QUADRO XXXIV. Caracterização genética das regiões ITS do gene que codifica o rRNA nuclear em 166 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 1995 e 2004.

PERÍODO	GÉNOTIPO ITS	NÚMERO DE ISOLADOS
1995–2000 (N=30)	Eg	8
	Cg	4
	Ne	3
	Bi, Ce, Gg	2
	Al, Bl, Cn, Ea, Eb, Eh, Jb, Jf, Nn	1
2001–2004 (N=136)	Eg	72
	Gg	12
	Cg	11
	Ai, Bi	4
	Ce, Eb, Eh, Hg, Og	3
	Cn; Dg, Ec, Ei, Em, Jf	2
Bk, De, Ee, En, Hi, “Ho”, Ne, Ng, Oe	1	

Dos 166 fragmentos de DNA amplificados, 11 foram clonados e os produtos de clonagem foram sequenciados nos dois sentidos. Sete (63,6%) dos 11 fragmentos clonados apresentaram sequências ITS idênticas em todos os clones e quatro (36,4%) apresentaram dois genótipos ITS diferentes (quadro XXXV). Dois isolados apresentaram os genótipos Eg e Gg, em simultâneo, num detectaram-se os genótipos Eg e Ee e no quarto isolado foram identificados os genótipos Eg e Og.

QUADRO XXXV. Caracterização genética das regiões ITS do gene que codifica o rRNA nuclear, nos fragmentos clonados de 11 isolados de *P. jirovecii*.

ISOLADOS COM FRAGMENTOS CLONADOS	GENÓTIPO ITS
1	Ai, Ai, Ai, Ai
2	Eg, Eg, Eg, Ee
3	Eg, Eg, Eg, Eg
4	Eg, Eg, Eg, Eg, Eg
5	Og, Eg, Eg, Eg
6	Eg, Eg, Eg, Eg
7	Eg, Eg, Eg, Eg, Eg, Gg
8	Gg, Gg, Eg, Eg
9	Eg, Eg, Eg
10	Eg, Eg, Eg
11	Eg, Eg, Eg, Eg, Eg

Os 166 isolados em que foi feita a tipagem das regiões ITS, reportam a 148 doentes imunocomprometidos e correspondem a 149 episódios de PPc. Num doente, adulto, seropositivo para VIH, foram diagnosticados dois episódios de PPc, com um intervalo de 10 meses. Neste doente, foi identificado, no primeiro episódio de PPc, o genótipo Gg e, no segundo foi detectado o genótipo Cg. Este doente não fazia profilaxia anti-*P. jirovecii* no primeiro episódio, foi, posteriormente, tratado com cotrimoxazol e antes do segundo episódio de PPc recebia cotrimoxazol, em regime profilático.

Em 14 dos 149 episódios de pneumocistose, foi possível recolher amostras de secreções pulmonares seriadas e proceder à identificação do genótipo ITS de *P. jirovecii*. A recolha das amostras de secreções pulmonares seriadas, foi efectuada na altura do diagnóstico, entre o oitavo e o 12º dia após o início do tratamento da PPc e,

QUADRO XXXVI. Caracterização genética das regiões ITS de *P. jirovecii* isolado nas secreções pulmonares seriadas em 14 episódios de PPc de 14 doentes seropositivos para VIH.

EPISÓDIOS	CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS						GENÓTIPO ITS			
	PPC	Sexo	Idade (anos)	Imunodeficiência	Linfócitos TCD ₄ ⁺ (células/mm ³)	Profilaxia	Tratamento	1ª amostra	2ª amostra	3ª amostra
E1	M	47	VIH	nd	Não	Cotrimoxazol	Cg	Eb		
E2	F	35	VIH	32	Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	Cg	Gg		
E3	F	58	VIH	173	Não	Cotrimoxazol	Gg	Gg		
E4	F	24	VIH	120	Não	Cotrimoxazol	Ai	Eb		
E5	M	41	VIH	5	Não	Cotrimoxazol	Oe	Hg		
E6	F	38	VIH	21	Não	Cotrimoxazol	Eg	Eg,Gg	Eg	
E7	F	64	VIH	89	Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	Ne	Eg		
E8	M	36	VIH	5	Não	Cotrimoxazol	Ei	Eg		
E9	M	30	VIH	16	Não	Cotrimoxazol	Ce	Eg		
E10	M	24	VIH	90	Não	Cotrimoxazol	Eg	Eg		
E11	M	33	VIH	21	Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	Eg	Eg		
E12	M	37	VIH	107	Não	Cotrimoxazol	Cg	Cn	Eg	
E13	F	37	VIH	39	Cotrimoxazol	Cotrimoxazol	Ei	Hg		
E14	M	66	VIH	13	Não	Cotrimoxazol	Cn	Eg	Eg	

F–Feminino; M–Masculino; nd–Não disponível

sempre que possível, após a conclusão do tratamento. Em três episódios foram recolhidas três amostras de secreções pulmonares e em 11 foram recolhidas duas amostras (quadro XXXVI). Dos 14 doentes com mais do que um episódio de PPc estudado, oito eram do sexo masculino e oito do sexo feminino, com idades compreendidas entre os 24 e os 66 anos. Todos estes doentes eram seropositivos para VIH e em 13 doentes o valor da contagem de linfócitos TCD4⁺ era conhecido, variando entre 5 e 173 células/mm³. Destes 14 doentes, dez não estavam sob profilaxia anti-*P. jirovecii* e quatro doentes estavam sob profilaxia com cotrimoxazol. Todos os doentes foram submetidos a terapêutica anti-*P. jirovecii*, com cotrimoxazol. O genótipo ITS, identificado nas secreções pulmonares repetidas de cada doente, foi idêntico em três episódios de PPc (Gg e Eg, em um e dois episódios, respectivamente). Noutra doente, todas as secreções pulmonares apresentaram o genótipo Eg e a segunda amostra apresentou uma mistura dos genótipos Eg e Gg (quadro XXXVI). Num outro doente foi detectada, na primeira amostra, o genótipo Cn e na segunda e terceira amostras foi identificado o genótipo Eg. Nos restantes nove episódios de PPc, todas as amostras de secreções pulmonares repetidas apresentaram genótipos ITS distintos.

Entre os 148 doentes com o genótipo ITS identificado, 97 (65,5%) eram do sexo masculino e 51 (34,5%) eram do sexo feminino. A idade dos doentes estudados variou entre os dois meses e os 70 anos (mediana=35 anos). Cento e vinte e seis (85,1%) doentes eram seropositivos para VIH, 12 (8,1%) eram seronegativos e nos restantes 10 (6,8%) doentes era desconhecida a informação sobre a serologia para VIH.

Dos 148 doentes imunocomprometidos, 70 (47,3%) apresentaram um valor de PaO₂ menor ou igual a 65 mm Hg, em 43 (29,1%) este valor era maior que 65 mm Hg e nos restantes 35 (23,6%) era desconhecido. Também, entre os doentes estudados, 100

(67,6%) apresentavam um padrão radiológico compatível com pneumocistose, 24 (16,2%) não apresentavam este padrão e nos restantes 24 (16,2%) não estava disponível esta informação. Relativamente ao valor da contagem de linfócitos TCD4⁺, em 56 (37,8%) doentes era inferior a 50 células/mm³, em 29 (19,6%) era inferior ou igual a 200 células/mm³ e em oito (5,4%) observou-se um valor superior a 200 células/mm³. Nos restantes 55 (37,2%) não foi possível obter esta informação.

No total de doentes estudados, 33 (22,3%) faziam profilaxia para a pneumocistose (29 com cotrimoxazol e quatro com pentamidina) e 93 (62,8%) não recebiam profilaxia anti-*P. jirovecii*. Em 22 (14,9%) não estava documentado o uso de profilaxia para a PPc.

No quadro XXXVII, está sumarizado o estudo da associação entre algumas características epidemiológicas e clínicas e os genótipos ITS, identificados nos 148 doentes com pneumocistose. O estudo da associação entre o período de recolha das amostras (1995–2000 e 2001–2004), a idade, o estado de seropositividade para VIH, o valor da pressão arterial de oxigénio (PaO₂), o padrão radiológico, o valor da contagem de linfócitos TCD4⁺ e o uso de profilaxia anti-*P. jirovecii*, com cotrimoxazol, foi efectuado, apenas, em relação aos genótipos ITS mais frequentes, presentes em mais do que quatro doentes, nomeadamente, o Eg (70 doentes), o Cg (14 doentes), o Gg (11 doentes), o Bi (seis doentes), o Ce (cinco doentes), o Ai, o Eh e o Ne (quatro doentes cada).

Entre os períodos de estudo 1995–2000 e 2001–2004, os genótipos Eg, Gg e Ai aumentaram a sua frequência, enquanto os genótipos Cg, Bi, Ce, Eh e Ne diminuíram a sua incidência. De facto, verificou-se que o genótipo Eg foi, significativamente, mais

frequente entre 2001–2004, do que entre 1995–2000 ($P=0,011$). Por outro lado, o genótipo Ne foi mais frequente no período 1995–2000 ($P=0,026$).

Neste estudo, 8,8% (13/148) dos isolados de *P. jirovecii* pertenciam a crianças, com idades compreendidas entre os 2 meses e os 10 anos (mediana=4 anos), e 91,2% a adultos, com idades entre os 24 e os 70 anos (mediana=36 anos). Em relação aos genótipos ITS mais frequentes, os genótipos Ai e Ne foram observados, exclusivamente, na população adulta, enquanto que os genótipos Eg, Cg, Gg, Bi, Ce e Eh foram identificados em isolados recolhidos em adultos e em crianças.

Nesta população, 12 (8,1%) doentes eram seronegativos para VIH e 126 (85,1%) eram seropositivos. Os genótipos Ai, Gg e Ne foram detectados, unicamente, em isolados de doentes seropositivos para VIH. Os genótipos Eg, Cg, Bi, Ce e Eh foram identificados em ambas as populações de doentes.

Em relação ao valor de PaO₂, os genótipos Ai e Ne foram identificados, apenas, em doentes com um valor inferior ou igual a 65 mm Hg.

O genótipo Eg foi, significativamente mais, frequente entre os doentes com um valor de PaO₂ superior a 65 mm Hg ($P= 0,010$). Os restantes genótipos foram identificados em frequências semelhantes nos doentes com PaO₂ superior a 65 mm Hg e inferior ou igual a 65 mm Hg.

Da mesma forma, os genótipos Ai, Ce, Gg, Eh e Ne foram observados, apenas, em doentes com radiograma do tórax compatível com pneumocistose, enquanto que os genótipos Bi, Cg, Eg foram detectados em todos doentes, com radiograma do tórax compatível, ou não, com pneumocistose.

QUADRO XXXVII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos ITS de *P. jirovecii* isolado de 148 doentes imunocomprometidos com PPc.

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS		GENÓTIPOS ITS								
		Eg			Cg			Gg		
		Sim	Não	<i>P</i>	Sim	Não	<i>P</i>	Sim	Não	<i>P</i>
Período (N=148)	1995–2000	8 (26,7%)	22 (73,3%)	0,011	4 (13,3%)	26 (86,7%)	0,515	2 (6,7%)	28 (93,3%)	0,982
	2001–2004	62 (52,5%)	56 (47,5%)		11 (9,3%)	107 (90,7%)		8 (6,8%)	110 (93,2%)	
Idade (N=148)	≤ 18 anos	3 (23,1%)	10 (76,9%)	0,067	2 (15,4%)	11 (84,6%)	0,511	1 (7,7%)	12 (92,3%)	0,888
	> 18 anos	67 (49,6%)	68 (50,4%)		13 (9,6%)	122 (90,4%)		9 (6,7%)	126 (93,3%)	
VIH (N=138)	Sim	60 (47,6%)	66 (52,4%)	0,693	11 (8,7%)	115 (85,2%)	0,368	9 (7,1%)	117 (92,9%)	0,338
	Não	5 (41,7%)	7 (58,3%)		2 (16,7%)	10 (83,3%)		0 (0%)	12 (100%)	
PaO₂ (mm Hg, N=113)	≤ 65	25 (35,7%)	45 (64,3%)	0,010	6 (8,6%)	64 (91,4%)	0,894	5 (7,1%)	65 (92,9%)	0,707
	> 65	26 (60,5%)	17 (39,5%)		4 (9,3%)	39 (90,7%)		2 (4,7%)	41 (95,3%)	
Rx Tórax (anormal, N=124)	Sim	41 (41%)	59 (59%)	0,243	9 (9%)	91 (91%)	0,271	9 (9%)	91 (91%)	0,127
	Não	13 (54,2%)	11 (45,8%)		4 (16,7%)	20 (83,3%)		0 (0%)	24 (100%)	
Linfócitos TCD4⁺ (células/mm ³ , N=93)	≤ 200	35 (41,2%)	50 (58,8%)	0,371	7 (8,2%)	78 (91,8%)	0,399	9 (10,6%)	76 (89,4%)	0,333
	> 200	2 (25%)	6 (75%)		0 (0%)	8 (100%)		0 (0%)	8 (100%)	
Profilaxia PPc (cotrimoxazol, N=126)	Sim	11 (37,9%)	18 (62,1%)	0,421	4 (13,8%)	25 (86,2%)	0,483	1 (3,4%)	28 (96,6%)	0,379
	Não	45 (46,4%)	52 (53,6%)		9 (9,3%)	88 (90,7%)		8 (8,2%)	89 (91,8%)	

QUADRO XXXVII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos ITS de *P. jirovecii* isolado de 148 doentes imunocomprometidos com PPc (continuação).

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS		GENÓTIPOS ITS								
		Bi			Ce			Ai		
		Sim	Não	<i>P</i>	Sim	Não	<i>P</i>	Sim	Não	<i>P</i>
Período (N=148)	1995–2000	2 (6,7%)	28 (93,3%)	0,416	2 (6,7%)	28 (93,3%)	0,267	0 (0%)	30 (100%)	0,583
	2001–2004	4 (3,4%)	114 (96,6%)		3 (2,5%)	115 (97,5%)		4 (3,4%)	114 (96,6%)	
Idade (N=148)	≤ 18 anos	1 (7,7%)	12 (92,3%)	0,486	1 (7,7%)	12 (92,3%)	0,373	0 (0%)	13 (100%)	0,529
	> 18 anos	5 (3,7%)	130 (96,3%)		4 (3%)	131 (97%)		4 (3%)	131 (97%)	
VIH (N=138)	Sim	5 (4%)	121 (96%)	0,479	4 (3,2%)	122 (96,8%)	0,370	4 (3,2%)	122 (96,8%)	0,531
	Não	1 (8,3%)	11 (91,7%)		1 (8,3%)	11 (91,7%)		0 (0%)	12 (100%)	
PaO₂ (mm Hg, N=113)	≤ 65	2 (2,9%)	68 (97,1%)	0,367	3 (4,3%)	67 (95,7%)	0,584	3 (4,3%)	67 (95,7%)	0,287
	> 65	3 (7%)	40 (93%)		1 (2,3%)	42 (97,7%)		0 (0%)	43 (100%)	
Rx Tórax (anormal, N=124)	Sim	4 (4%)	96 (96%)	0,970	2 (2%)	98 (98%)	0,485	4 (4%)	96 (96%)	0,319
	Não	1 (4,2%)	23 (95,8%)		0 (0%)	24 (100%)		0 (0%)	24 (100%)	
Linfócitos TCD4⁺ (células/mm ³ , N=93)	≤ 200	2 (2,4%)	83 (97,6%)	0,661	3 (3,5%)	82 (96,5%)	0,589	4 (4,7%)	81 (95,3%)	0,531
	> 200	0 (0%)	8 (100%)		0 (0%)	8 (100%)		0 (0%)	8 (100%)	
Profilaxia PPc (cotrimoxazol, N=126)	Sim	1 (3,4%)	28 (96,6%)	0,924	2 (7%)	27 (93%)	0,193	1 (3,4%)	28 (96,6%)	0,924
	Não	3 (3,1%)	94 (96,9%)		2 (2%)	95 (98%)		3 (3,1%)	94 (96,9%)	

QUADRO XXXVII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos ITS de *P. jirovecii* isolado de 148 doentes imunocomprometidos com PPc (continuação).

CARACTERÍSTICAS		Genótipos ITS					
		Eh		P	Ne		P
EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS		Sim	Não		Sim	Não	
Período (N=148)	1995–2000	1 (3,3%)	29 (96,7%)	0,811	3 (10%)	27 (90%)	0,026
	2001–2004	3 (2,5%)	115 (97,5%)		1 (0,8%)	117 (99,2%)	
Idade (N=148)	≤ 18 anos	1 (7,7%)	12 (92,3%)	0,310	0 (0%)	13 (100%)	0,529
	>18 anos	3 (2,2%)	132 (0%)		4 (3%)	131 (97%)	
VIH (N=138)	Sim	2 (1,6%)	124 (98,4%)	0,240	4 (3,2%)	122 (96,8%)	0,531
	Não	1 (8,3%)	11 (91,7%)		0 (0%)	12 (100%)	
PaO₂ (mm Hg, N=113)	≤ 65	2 (2,9%)	68 (97,1%)	0,864	4 (5,7%)	66 (94,3%)	0,296
	> 65	1 (2,3%)	42 (97,7%)		0 (0%)	43 (100%)	
Rx Tórax (anormal, N=124)	Sim	4 (4%)	96 (96%)	0,319	4 (4%)	96 (96%)	0,319
	Não	0 (0%)	24 (100%)		0 (0%)	24 (100%)	
Linfócitos TCD4⁺ (células/mm ³ , N=93)	≤ 200	2 (2,4%)	83 (97,6%)	0,661	3 (3,5%)	82 (96,5%)	0,307
	> 200	0 (0%)	8 (100%)		1 (12,5%)	7 (87,5%)	
Profilaxia PPc (cotrimoxazol, N=126)	Sim	1 (3,4%)	28 (96,6%)	0,924	2 (7%)	27 (93%)	0,193
	Não	3 (3,1%)	94 (96,9%)		2 (2%)	95 (98%)	

Também, em relação à contagem de linfócitos TCD4⁺, apenas os genótipos Eg e Ne, foram observados em doentes com níveis de linfócitos TCD4⁺ superiores a 200 células/mm³. Os outros genótipos, nomeadamente, o Cg, o Gg, o Bi, o Ce, o Ai e o Eh, foram identificados, apenas, em doentes com contagens de linfócitos TCD4⁺ inferiores a 200 células/ mm³.

Neste estudo, 29 (19,5%) dos 148 doentes estudados estavam sob profilaxia, com cotrimoxazol. Noventa e três (65,5%) dos doentes não faziam profilaxia e quatro estavam sob profilaxia, com pentamidina. Todos os genótipos avaliados foram identificados tanto nos doentes que faziam, como nos que não faziam profilaxia com cotrimoxazol, não se verificando nenhuma associação, estatisticamente, significativa (quadro XXXVII).

3. DISCUSSÃO

No presente estudo, 166 isolados de *P. jirovecii* de 148 doentes com pneumocistose e correspondentes a 149 episódios de PPc foram submetidos ao estudo das regiões ITS do gene de rRNA nuclear, por amplificação por PCR seguida de sequenciação de DNA.

Entre os 166 isolados, recolhidos em dois intervalos de tempo, 1995–2000 e 2001–2004, 30 genótipos distintos foram identificados, resultantes da combinação de 11 sequências ITS1 e 13 sequências ITS2. O genótipo mais frequente foi o Eg, presente em 48,2% dos isolados, seguido dos genótipos Ai, Bi, Cg, Gg, Ce, Eb, Eh e Ne. Em estudos anteriores, entre nós, foi observada maior frequência dos genótipos Eg, Eb, Ne e Bi

(Matos, 1999; Matos *et al.*, 2003a). Posteriormente, outro estudo reportou os genótipos Bi, Cg, Cn e Eg, como os mais frequentes (Lucas *et al.*, 2004). No entanto, em ambos os casos, o genótipo Eg foi o predominante, tendo sido identificado entre 23 a 24% das amostras estudadas, respectivamente.

Nos diversos estudos efectuados, na Europa, nos E.U.A. e na Ásia, os genótipos Eg, Eb, Ne e Ai estão presentes em mais de 50% das sequências identificadas (Tsolaki *et al.*, 1996; Latouche *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 1998; Tsolaki *et al.*, 1998; Hosoya *et al.*, 2000; Atzori *et al.*, 2001; Helweg-Larsen *et al.*, 2001; Nimri *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2003; Robberts *et al.*, 2004). Estes estudos demonstram que alguns genótipos de *P. jirovecii*, em particular o Eg, são ubíquos na natureza, sendo identificados em isolados de diversos países e em anos variados. Da mesma forma, no presente estudo, o genótipo Eg foi o mais frequente, em ambos os períodos de tempo estudados. Esta observação comprova que o genótipo Eg apresenta-se distribuído, igualmente, nos doentes estudados e ao longo do tempo. Em 2004, um estudo filogenético, fundamentado na análise do rRNA de *P. jirovecii*, sugeriu que o genótipo Eg poderia ser um tipo ancestral, donde, por recombinação, vários genótipos ITS teriam divergido, sendo essa uma das explicações para a vasta distribuição, geográfica e temporal, deste genótipo (Robberts *et al.*, 2004).

Num doente foram diagnosticados dois episódios de PPc e à semelhança do que foi observado nos outros *loci*, e em estudos realizados por outros autores (Keely *et al.*, 1995; Helweg-Larsen *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2003), foram identificados genótipos diferentes, em cada episódio. A alteração de genótipo, em diferentes episódios de pneumocistose, pode sugerir que a doença seja devida a uma re-infecção (*de novo*) (Keely *et al.*, 1995). Outros autores, que defendem que a pneumocistose seja causada

pela reactivação de uma infecção latente, sugerem que o doente pode estar infectado com uma população, geneticamente, heterogénea de *P. jirovecii*, sendo detectados genótipos diferentes, em cada episódio, provavelmente, devido à incapacidade das técnicas de recolha de amostras respiratórias e das técnicas de tipagem serem capazes de distinguir todos os genótipos ITS presentes no pulmão (Stringer & Walzer, 1996). De facto, num estudo realizado por Helweg-Larsen e colegas (2001a), os autores verificaram que os vários isolados de *P. jirovecii*, recolhidos de várias porções do pulmão, apresentavam diversos genótipos, de três regiões genómicas, que não tinham sido identificados nas secreções respiratórias, durante o diagnóstico da PPC. Estes autores sugeriram que diferentes tipos de *P. jirovecii*, podem coexistir em diversos segmentos do pulmão.

No presente estudo, em 36,4% dos fragmentos das regiões ITS clonados foram identificados dois genótipos diferentes. Como o gene de rRNA nuclear de *P. jirovecii* parece ter apenas uma cópia no genoma (Tang *et al.*, 1998; Nahimana *et al.*, 2000), a maioria dos autores sugere que a presença de múltiplos genótipos esteja relacionada com a ocorrência de infecções mistas (Lee *et al.*, 1998; Helweg-Larsen *et al.*, 2001). Nos estudos de genotipagem, a frequência de infecções mistas varia entre 17 e 70%, em função, principalmente, do método de tipagem utilizado (Tsolaki *et al.*, 1996; Latouche *et al.*, 1997; Beard *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2001; Helweg-Larsen *et al.*, 2001). No presente estudo, apesar de não ter sido possível efectuar a clonagem da totalidade dos isolados estudados, a frequência de infecções mistas observada é semelhante à verificada por outros autores.

Ao longo dos últimos anos, diversos trabalhos têm tido por objectivo correlacionar diferentes genótipos ITS com várias características clínicas dos doentes

com PPc. A associação entre o genótipo Ne e uma forma mais severa de pneumocistose foi sugerida, pela primeira vez, por Miller & Wakefield (1999). Estes autores observaram que o genótipo Ai era mais frequente em formas moderadas e graves de PPc, enquanto o genótipo Ne era associado à forma ligeira da doença e a episódios recorrentes da PPc (Miller & Wakefield, 1999). Nesse estudo, o genótipo Eg era, muitas vezes, identificado nos primeiros episódios de PPc, mas não nos episódios subsequentes, ao contrário do que se verificava com o genótipo Ne. Estes resultados sugeriram que o genótipo Ne fosse mais persistente e transmissível.

Em Portugal, num estudo efectuado, em 2003, por Matos e colaboradores, o genótipo Ne foi identificado em 11,6% dos doentes e estava, estatisticamente, associado a uma resposta negativa ao tratamento anti-*P. jirovecii* ($P < 0,001$) e à ocorrência de morte dos doentes, 120 dias após o diagnóstico de pneumocistose ($P = 0,025$).

No presente estudo, à excepção da correlação entre a presença do genótipo Eg e o valor da PaO₂ superiores a 65 mm Hg ($P = 0,010$), não foi possível associar outros genótipos com as características clínicas em estudo. Tal, pode-se dever à elevada frequência do genótipo Eg (48,2%) na população estudada, comparada com a dos restantes genótipos. No entanto, outros autores não verificaram, também, a ocorrência de associação entre os genótipos ITS e características clínicas, indicadoras de virulência (Atzori *et al.*, 2001; Helweg-Larsen *et al.*, 2001).

Também, genótipos ITS semelhantes foram observados em diferentes populações de doentes, como por exemplo, os seropositivos e os seronegativos para VIH. Esta observação sugere que diferentes tipos genéticos de *P. jirovecii* circulam entre diferentes populações de indivíduos. O mesmo se verificou em relação aos genótipos ITS de *P. jirovecii* identificados em crianças e adultos, no presente estudo.

Estudos de genotipagem das regiões ITS de *P. jirovecii*, em doentes imunocomprometidos e em indivíduos saudáveis, adultos e crianças, identificaram genótipos ITS semelhantes, nas várias populações observadas (Totet *et al.*, 2003, 2004, 2006).

Assim, para além da elevada diversidade genética observada neste *locus*, a presença de genótipos comuns, em populações distintas de doentes, sugere que estes sejam expostos a fontes comuns de infecção. Desta forma, comprova-se que a identificação de tipos distintos de *P. jirovecii* através da genotipagem ITS, contribui, de forma evidente, para o estudo da transmissão e da epidemiologia da pneumocistose.

CAPÍTULO VIII

ANÁLISE GENÉTICA MULTILOCUS DE *P. JIROVECI*

VIII. ANÁLISE GENÉTICA MULTILOCUS DE *P. JIROVECI*

1. INTRODUÇÃO

Até ao momento, alguns estudos de genotipagem, de diversas regiões genómicas (multilocus) têm sido efectuados, tendo como principal objectivo o estudo da transmissão e da epidemiologia da infecção por *P. jirovecii*, assim como o estudo da correlação entre os vários genótipos identificados nos diferentes *loci* (Meshnick *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2003; Totet *et al.*, 2003, 2004; Miller *et al.*, 2003).

No presente trabalho, pretendeu-se correlacionar os genótipos identificados em três regiões genómicas em estudo – nomeadamente, os genes da DHPS e da DHFR e as regiões ITS do gene de rRNA– e estudar a associação entre os vários conjuntos de genótipos, ou alelos, observados (haplótipos) com as características epidemiológicas e clínicas.

2. RESULTADOS

No presente trabalho, 30 isolados, recolhidos entre 1995 e 2000, e 260 isolados, obtidos entre 2001 e 2004, identificados por técnicas parasitológicas e moleculares,

foram submetidos ao estudo de caracterização genética de três *loci* –os genes da DHPS e da DHFR e as regiões ITS do gene do rRNA nuclear.

No primeiro grupo de 30 isolados foi possível amplificar, por PCR, todos os fragmentos e proceder à análise, por RFLP, do gene da DHPS e à análise, por sequenciação do DNA, do gene da DHFR e das regiões ITS. No segundo grupo de 260 isolados, a amplificação simultânea dos três *loci* em estudo foi positiva em 70 (26,9%) isolados. Nos restantes 190 (73,1%) isolados não foi possível amplificar, pelo menos, um dos *loci* em análise.

No quadro XXXVIII, estão representadas as sequências identificadas nos 100 isolados de *P. jirovecii*, nas regiões genómicas em estudo. Em relação ao gene da DHPS, a sequência de tipo selvagem foi a mais frequente, estando presente em 84 (84%) isolados. As sequências do gene da DHPS, com genótipo mutante, foram observadas em 16 (16%) isolados – 10 isolados apresentaram genótipo mutante e em seis foram detectados genótipos mutantes e selvagem.

No gene da DHFR, as sequências do tipo selvagem foram observadas em 68 (68%) isolados e em 32 (32%) foram identificadas substituições nucleotídicas, na sequência de DNA. Oito locais de substituição nucleotídica foram observados, de que resultaram quatro alterações não sinónimas nos codões 13, 23, 31 e 67 e quatro alterações sinónimas nas bases 201, 272, 312, 381 (*vide* Capítulo VI).

QUADRO XXXVIII. Caracterização genética de três *loci* em 100 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 1995 e 2004.

<i>LOCUS</i>	SEQUÊNCIAS OBTIDAS	Nº ISOLADOS
DHPS	Selvagem	84 (84%)
	Mutante	10 (10%)
	Mutação codão 55	2
	Mutação codão 55 e 57	8
	Genótipos mistos	6 (6%)
	Selvagem e mutação codão 55 e 57	3
	Selvagem 55 e mutação 55 e 57	3
DHFR	Selvagem	68 (68%)
	Polimorfismos não sinónimos	4 (4%)
	38 (T/C) Leucina 13 Serina	1
	68 (A/G) Aspargina 23 Serina	1
	92 (C/T) Serina 31 Fenilalanina	1 ^a
	200 (C/T) Alanina 67 Valina	1
	Polimorfismos sinónimos	29 (29%)
	201 (T/A)	1
	272 (T/C)	1 ^a
	312 (T/C)	24
381 (C/T)	3	
ITS	Eg	41
	Cg	8
	Gg	6
	Bi, Ce	5
	Cn	4
	Eb, Eh, Hg, Ne, Og	3
	Ai, Dg, Ei	2
	Al, Bl, De, Ea, Ee, Em, En, Hi, “Ho”, Jb, Jf, Ng, Nn, Oe	1

“a”–Presentes no mesmo doente; A-adenina; C-citosina, G-guanina; T-timina.

Em relação à diversidade genética, observada nas regiões ITS do gene de rRNA nuclear de *P. jirovecii*, 28 genótipos ITS, resultantes das sequências identificadas nas regiões ITS1 e ITS2, foram observados nos 100 isolados. O genótipo Eg foi o mais frequente, sendo detectado em 41 (41%) isolados, logo seguido dos genótipos Cg, em oito (8%) e Gg, em seis (6%) isolados. Os restantes genótipos observados foram o Bi e o Ce (em cinco isolados cada, 5% cada), o Cn (em quatro isolados, 4% cada), os genótipos Eb, Eh, Hg, Ne e Og (em três isolados cada, 3% cada), Ai, Dg e Ei (em dois isolados cada, 2% cada) e os genótipos Al, Bl, De, Ea, Ee, Em, En, Hi, “Ho”, Jb, Jf, Ng, Nn e Oe (em um isolado cada, 1% cada).

Entre os 68 isolados de *P. jirovecii*, que apresentaram sequências do tipo selvagem do gene da DHFR, em 55 (80,9%) foi detectado o genótipo selvagem do gene da DHPS e em 13 (19,1%) foi detectado o genótipo mutante (quadro XXXIX). Entre os 29 isolados, que apresentaram polimorfismos sinónimos no gene da DHFR, em 26 (89,7%) foi observado o genótipo selvagem do gene da DHPS e em 3 (10,3%) foi detectado o genótipo mutante. Nos quatro isolados de *P. jirovecii*, onde foram identificados polimorfismos não sinónimos na sequência do gene da DHFR, apenas o genótipo selvagem do gene da DHPS foi observado. Assim, na população estudada, não se observou nenhuma correlação entre os genótipos do gene da DHPS e os polimorfismos sinónimos e não sinónimos identificados no gene da DHFR ($P=1,000$, em ambos os casos).

Também, não se observou nenhuma variação significativa na distribuição das sequências polimórficas identificadas nos genes da DHPS e DHFR, entre os vários genótipos ITS detectados (figura 14).

QUADRO XXXIX. Associação entre as sequências de DNA identificadas nos genes que codificam as enzimas DHPS e DHFR de *P. jirovecii*, em 100 isolados recolhidos entre 1995 e 2004.

SEQUÊNCIA DA DHFR	GENÓTIPO DHPS		P
	Selvagem	Mutante	
Selvagem	55 (80,9%)	13 (19,1%)	
Polimorfismos sinónimos ^a	26 (89,7%)	3 (10,3%)	1,000
Polimorfismo não sinónimos ^a	4 (100%)	0 (0%)	1,000

^a“a”–Presentes no mesmo doente.

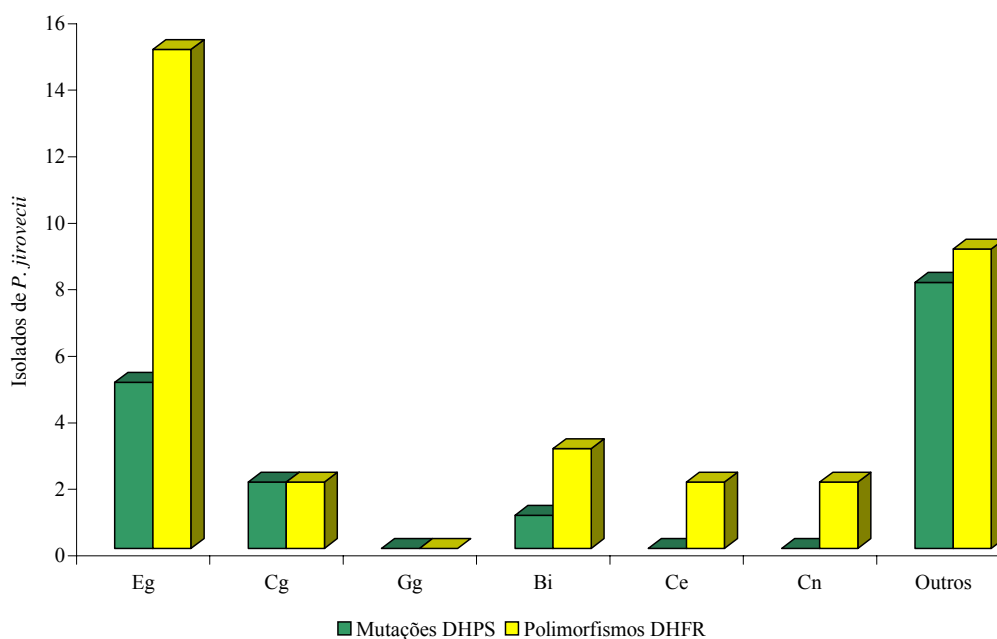


FIGURA 14. Representação gráfica da distribuição das sequências polimórficas dos genes da DHPS e DHFR entre os genótipos ITS, em 100 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 1995 e 2004.

Entre os genótipos ITS mais frequentes, nos 100 isolados de *P. jirovecii* (Eg, Cg, Gg, Bi, Ce, Cn), apenas naqueles que apresentaram o genótipo Gg não foram identificadas seqüências polimórficas dos genes da DHPS e da DHFR (quadro XL). Também, nos isolados que apresentaram os genótipos Ce e Cn não foram detectados genótipos mutantes do gene da DHPS.

QUADRO XL. Associação entre os genótipos identificados nos genes que codificam as enzimas DHPS e DHFR e os genótipos ITS detectados em 100 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos entre 1995 e 2004.

GENÓTIPO ITS	GENÓTIPO DHPS		P	GENÓTIPO DHFR		P	
	Selvagem	Mutações		Selvagem	Polimorfismos		
Eg	Sim	36 (87,8%)	5 (12,2%)	0,387	26 (63,4%)	15 (36,6%)	0,413
	Não	48 (81,4%)	11 (18,6%)		42 (71,2%)	17 (28,8%)	
Cg	Sim	6 (75%)	2 (25%)	0,611	6 (75%)	2 (25%)	1,000
	Não	78 (84,8%)	14 (15,2%)		62 (67,4%)	30 (32,6%)	
Gg	Sim	6 (100%)	0 (0%)	0,586	6 (100%)	0 (0%)	0,173
	Não	78 (83%)	16 (17%)		62 (66%)	32 (34%)	
Bi	Sim	4 (80%)	1 (20%)	1,000	2 (40%)	3 (60%)	0,324
	Não	80 (84,2%)	15 (15,8%)		66 (69,5%)	29 (30,5%)	
Ce	Sim	5 (100%)	0 (0%)	1,000	3 (60%)	2 (40%)	0,654
	Não	79 (83,2%)	16 (16,8%)		65 (68,4%)	30 (31,6%)	
Cn	Sim	4 (100%)	0 (0%)	1,000	2 (50%)	2 (50%)	0,591
	Não	80 (83,3%)	16 (16,7%)		66 (68,8%)	30 (31,3%)	
Outros	Sim	27 (77,1%)	8 (22,9%)	0,170	26 (74,3%)	9 (25,7%)	0,323
	Não	57 (87,7%)	8 (12,3%)		42 (64,4%)	23 (35,4%)	

No entanto, não foi observada nenhuma associação, estatisticamente significativa, entre a presença de um determinado genótipo ITS e a ocorrência de polimorfismos nos genes da DHPS e da DHFR (quadro XL).

No presente estudo, foram identificados cinco genótipos distintos do gene da DHPS, nove tipos de sequências do gene da DHFR e 28 genótipos ITS, entre os 100 isolados em análise (*vide* quadro XXXVIII). Da combinação dos vários genótipos observados, nestas três regiões genômicas, foram identificados 50 haplótipos diferentes, que foram numerados de 1 a 50, conforme descrito no quadro XLI. A combinação de genótipos multilocus mais frequente foi o **haplótipo 1**, que foi observado em 22 isolados e corresponde à combinação dos genótipos selvagem nos genes da DHPS e da DHFR com o genótipo Eg. O **haplótipo 25** que foi identificado em 12 isolados, sendo constituído pela combinação do genótipo selvagem da DHPS, sequências com a substituição sinónima na base nucleotídica 312 no gene da DHFR e do genótipo Eg. Os **haplótipos 2 e 3**, correspondentes à combinação dos genótipos selvagem nos genes da DHPS e da DHFR, com os genótipos Gg e Cg, respectivamente, foram observados em seis (haplótipo 2) e em quatro (haplótipo 3) isolados. As conjunções de genótipos correspondentes aos **haplótipos 4, 5, 26 e 39** foram observados em três isolados cada. Os restantes haplótipos foram menos frequentes e foram identificados em menos de dois isolados cada (quadro XLI).

Os 100 isolados de *P. jirovecii*, com as sequências dos três *loci* em estudo caracterizadas, foram obtidos de 92 doentes imunocomprometidos, com pneumocistose. Em seis destes doentes foram recolhidas amostras de secreções pulmonares seriadas, na altura do diagnóstico, entre o oitavo e o 12º dia após o início do tratamento da PPc e, sempre que possível, após a conclusão do tratamento.

QUADRO XLI. Combinações alélicas dos genes da DHPS e da DHFR e das regiões ITS do gene de rRNA, observadas em 100 isolados de *P. jirovecii*.

DHPS	HAPLÓTIPOS			Nº DE ISOLADOS	Nº HAPLÓTIPO
	DHFR	ITS			
Selvagem	Selvagem		Eg	22	1
			Gg	6	2
			Cg	4	3
			Ce	3	4
			Eh	3	5
			Ai, Cn, Dg, Ei, Hg	2	6-10
			Bi, Bl, Eb, Ee, Hi, "Ho", Jf, Ne, Nn, Og	1	11-20
Selvagem	Polimorfismo não sinónimo	Serina 31 Fenilalanina	Eg	1	21
		Alanina 67 Valina	Eg	1	22
		Aspargina 23 Serina	Ce	1	23
		Aspargina 23 Serina	Cg	1	24
Selvagem	Polimorfismo sinónimo	312 (T/C)	Eg	12	25
		312 (T/C)	Bi	3	26
		312 (T/C)	Cn	2	27
		312 (T/C)	Al, Ce, Cg, Eb, Jb, Og	1	28-33
		201 (T/A)	Hg	1	34
		381 (C/T)	Oe	1	35
		381 (C/T)	Og	1	36
Mutação 55	Selvagem		Eg	1	37
Mutação 55	Polimorfismo sinónimo	312 (T/C)	Eg	1	38
Mutação 55 e 57	Selvagem		Eg	3	39
Mutação 55 e 57	Selvagem		Cg, De, Em, Ne	1	40-43
Mutação 55 e 57	Polimorfismo sinónimo	381 (C/T)	Ng	1	44
Selvagem 55 e mutação 55 e 57	Selvagem		Bi, Cg	1	45, 46
Selvagem 55 e mutação 55 e 57	Polimorfismo sinónimo	312	Ne	1	47
Selvagem e mutação 55 e 57	Selvagem		Ea, Eb, En	1	48-50

Destes seis doentes, em quatro foram recolhidas duas amostras de secreções pulmonares e em dois foram recolhidas três amostras (quadro XLII).

QUADRO XLII. Caracterização genética multilocus em seis doentes imunocomprometidos com PPc, com amostras de secreções pulmonares seriadas.

DOENTES	SECREÇÕES PULMONARES	HAPLÓTIPOS	SEQUÊNCIAS DOS ALELOS
A	1ª Amostra	35	DHPS: selvagem; DHFR: 381 (C/T); ITS: Oe
	2ª Amostra	34	DHPS: selvagem; DHFR: 381 (C/T); ITS: Hg
B	1ª Amostra	1	DHPS: selvagem; DHFR: selvagem; ITS: Eg
	2ª Amostra	1 e 2	DHPS: selvagem; DHFR: selvagem; ITS: Eg e Gg
	3ª Amostra	1	DHPS: selvagem; DHFR: selvagem; ITS: Eg
C	1ª Amostra	9	DHPS: selvagem; DHFR: selvagem; ITS: Ei
	2ª Amostra	1	DHPS: selvagem; DHFR: selvagem; ITS: Eg
D	1ª Amostra	29	DHPS: selvagem; DHFR: 312 (T/C); ITS: Ce
	2ª Amostra	25	DHPS: selvagem; DHFR: 312 (T/C); ITS: Eg
E	1ª Amostra	9	DHPS: selvagem; DHFR: selvagem; ITS: Ei
	2ª Amostra	10	DHPS: selvagem; DHFR: selvagem; ITS: Hg
F	1ª Amostra	27	DHPS: selvagem; DHFR: 312 (T/C); ITS: Cn
	2ª Amostra	25	DHPS: selvagem; DHFR: 312 (T/C); ITS: Eg
	3ª Amostra	1	DHPS: selvagem; DHFR: selvagem; ITS: Eg

C-citosina; T-timina.

Nestes seis doentes, em, apenas, um se observou a mesma combinação de genótipos nos três *loci*, durante o episódio de pneumocistose. Nos restantes cinco doentes, os haplótipos foram distintos ao longo do episódio de PPc. No entanto, o gene

da DHPS apresentou o genótipo mais estável, dado que todos os doentes apresentaram o mesmo genótipo (selvagem) ao longo do episódio de pneumocistose. No gene da DHFR, também se observou estabilidade dos genótipos identificados, à excepção de um doente que apresentou uma substituição sinónima (na posição 312, T/C) nas duas primeiras amostras de secreções pulmonares recolhidas e na terceira apresentou sequências do tipo selvagem. Em relação às regiões ITS, observou-se maior diversidade genética, entre as amostras seriadas de cada episódio de PPc. Dos seis doentes analisados, em apenas dois observou-se genótipos ITS semelhantes. Um doente apresentou o genótipo Eg, nas três amostras de secreções pulmonares recolhidas e noutro doente foi identificado o genótipo Cn, na primeira amostra, e o genótipo Eg, na segunda e terceira amostras.

No quadro XLIII, encontram-se sumarizadas as características epidemiológicas e clínicas referentes aos doentes que apresentam os haplótipos mais frequentes, nomeadamente, os haplótipos **1**, **2**, **3** e **25**. Em relação ao período de estudo, em ambos os intervalos de tempo foram detectados os quatro haplótipos mais frequentes, não se verificando nenhuma associação significativa entre a data de recolha das amostras e a combinação de genótipos multilocus identificada.

Sete doentes tinham entre os oito meses e os 10 anos de idade e os restantes 85 tinham idades compreendidas entre os 24 e os 68 anos. Nos isolados de *P. jirovecii* recolhidos nas setes crianças, foram observados sete haplótipos diferentes, nomeadamente, o **1**, o **2**, o **3**, o **11**, o **20**, o **23** e o **31**.

QUADRO XLIII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos multilocus de *P. jirovecii* isolado de 92 doentes imunocomprometidos com PPc.

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS		HAPLÓTIPOS					
		1		P	2		P
		Sim	Não		Sim	Não	
Período (N=92)	1995-2000	3 (10%)	27 (90%)	0,108	2 (6.7%)	28 (93.3%)	0,660
	2001-2004	15 (24.2%)	47 (75.8%)		3 (4.8%)	59 (95.2%)	
Idade (N=92)	≤ 18 anos	1 (14.3%)	6 (85.7%)	1,000	1 (14.3%)	6 (85.7%)	0,333
	>18 anos	17 (20%)	68 (80%)		4 (4.7%)	81 (95.3%)	
VIH (N=85)	Sim	15 (19%)	64 (81%)	0,595	5 (6.3%)	74 (93.7%)	1,000
	Não	2 (33.3%)	4 (66.7%)		0 (0%)	6 (100%)	
PaO₂ (mm Hg, N=77)	≤ 65	11 (19.3%)	46 (80.7%)	1,000	5 (8.8%)	52 (91.2%)	0,319
	> 65	4 (20%)	16 (80%)		0 (100%)	20 (100%)	
Rx Tórax (anormal, N=81)	Sim	15 (22.1%)	53 (77.9%)	0,447	5 (7.4%)	63 (92.6%)	0,587
	Não	1 (7.7%)	12 (92.3%)		0 (0%)	13 (100%)	
Linfócitos TCD4⁺ (células/mm ³ , N=65)	≤ 200	12 (20%)	48 (80%)	1,000	5 (8.3%)	55 (91.7%)	1,000
	> 200	1 (20%)	4 (80%)		0 (0%)	5 (100%)	
Profilaxia PPc (cotrimoxazol, N=81)	Sim	2 (11.8%)	15 (88.2%)	0,726	1 (5.9%)	16 (94.1%)	1,000
	Não	13 (20.3%)	51 (79.7%)		4 (6.3%)	60 (93.7%)	

Os 85 isolados de *P. jirovecii* recolhidos de doentes adultos, apresentaram 46 diferentes combinações de genótipos multilocus. Nestes isolados, foram observados os conjuntos de genótipos **1** (17 doentes), **25** (10 doentes), **2** (quatro doentes), **3**, **4**, **5**, **26** e **39** (três doentes, cada) e as combinações de genótipos **6**, **7**, **8**, **9**, **10** e **27** (2 doentes,

cada). Os restantes haplótipos, descritos anteriormente no quadro XXXVII, foram observados em um doente cada.

QUADRO XLIII. Associação entre as principais características epidemiológicas e clínicas e os genótipos multilocus de *P. jirovecii* isolado de 92 doentes imunocomprometidos com PPc (continuação).

CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS E CLÍNICAS		HAPLÓTIPOS					
		3		P	25		P
		Sim	Não		Sim	Não	
Período (N=92)	1995-2000	2 (6.7%)	28 (93.3%)	0,594	1 (3.3%)	29 (96.7%)	0,158
	2001-2004	2 (3.2%)	60 (96.8%)		9 (14.5%)	53 (85.5%)	
Idade (N=92)	≤ 18 anos	1 (14.3%)	6 (85.7%)	0,275	0 (0%)	7 (100%)	1,000
	>18 anos	3 (3.5%)	82 (96.5%)		10 (11.8%)	75 (88.2%)	
VIH (N=85)	Sim	2 (2.5%)	77 (97.5%)	0,199	9 (11.4%)	70 (88.6%)	1,000
	Não	1 (16.7%)	5 (83.3%)		0 (0%)	6 (100%)	
PaO₂ (mm Hg, N=77)	≤ 65	3 (5.3%)	54 (94.7%)	0,564	8 (14%)	49 (86%)	1,000
	> 65	0 (0%)	20 (100%)		2 (10%)	18 (90%)	
Rx Tórax (anormal, N=81)	Sim	2 (2.9%)	66 (97.1%)	0,413	6 (8.8%)	62 (91.2%)	0,153
	Não	1 (7.7%)	12 (92.3%)		3 (23.1%)	10 (76.9%)	
Linfócitos TCD4⁺ (células/mm ³ , N=65)	≤ 200	1 (1.7%)	59 (98.3%)	1,000	6 (10%)	54 (90%)	1,000
	> 200	0 (0%)	5 (100%)		0 (0%)	5 (100%)	
Profilaxia PPc (cotrimoxazol, N=81)	Sim	1 (5.9%)	16 (94.1%)	1,000	2 (11.8%)	15 (88.2%)	1,000
	Não	3 (4.7%)	61 (95.3%)		7 (10.9%)	57 (89.1%)	

Entre os 92 doentes, 79 (85,9%) eram seropositivos para VIH e seis (6,5%) eram seronegativos. Em sete (7,6%) doentes não havia informação sobre a serologia para VIH. Nos seis doentes seronegativos para VIH (cinco crianças e um adulto), foram observadas as combinações de genótipos **1** (dois doentes), **3**, **11**, **23**, **31** (um doente, cada). Nos 79 doentes seropositivos para VIH, foram identificados os restantes conjuntos de genótipos multilocus, à excepção das combinações **21** e **37**, que foram identificadas, separadamente, em doentes cuja a serologia para VIH era desconhecida. Neste estudo, não se observou nenhuma correlação entre a infecção VIH e algum conjunto de genótipos identificado.

Em relação à características clínicas, nomeadamente, o valor de pressão arterial de oxigénio, o padrão radiológico, a contagem de linfócitos TCD4⁺ e a exposição ao cotrimoxazol, em regime profiláctico, não se observou nenhuma correlação entre estas variáveis e a presença dos haplótipos mais frequentes (quadro XLIII). Apesar de alguns conjuntos de genótipos ocorrerem, exclusivamente, em doentes com um valor de PaO₂ inferior ou igual a 65 mm de Hg (haplótipos **2** e **3**), com um padrão radiológico compatível com pneumocistose (haplótipo **2**) e com contagem de linfócitos TCD4⁺ inferior ou igual a 200 células/mm³ (haplótipos **2**, **3** e **25**) a diferença observada não foi, estatisticamente, significativa.

3. DISCUSSÃO

Ao longo dos últimos anos, o estudo da diversidade genética da DHPS e da DHFR tem sido realizado com o intuito de avaliar a ocorrência de mutações, nas

sequências destas enzimas, que possam contribuir para o desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol. Por outro lado, apesar das regiões ITS do gene de rRNA apresentarem elevada heterogeneidade genética, com um amplo número de genótipos identificados, poucos estudos conseguiram correlacionar genótipos específicos com parâmetros clínicos, como a virulência.

Recentemente, alguns estudos têm avaliado a diversidade genética intra-específica de *P. jirovecii*, através da caracterização genética de vários fragmentos genômicos, em particular do gene da DHPS e das regiões ITS (Meshnick *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2003a; Totet *et al.*, 2003, 2004; Miller *et al.*, 2003).

No presente estudo, de um conjunto de 290 isolados de *P. jirovecii*, identificados por técnicas parasitológicas e moleculares, e recolhidos entre 1995 e 2004, em 100 isolados foi possível efectuar a caracterização de três *loci*, designadamente, os genes da DHPS e da DHFR e as regiões ITS do gene que codifica o rRNA nuclear.

Nos 100 isolados, foram identificados cinco tipos de sequências diferentes do gene da DHPS, nove tipos de sequências do gene da DHFR e 28 sequências distintas das regiões ITS. Posteriormente, foi realizado o estudo da relação entre as mutações observadas nos codões 55 e 57, do gene da DHPS, com a presença de polimorfismos, sinónimos e não sinónimos, do gene da DHFR e com os genótipos ITS observados. Neste estudo, não se observou nenhuma relação, estatisticamente, significativa entre a presença de mutações no gene da DHPS com os polimorfismos da DHFR e com os genótipos ITS.

Em 2001, num estudo efectuado por Meshnick e colaboradores, entre 37 isolados de *P. jirovecii* foram observados 10 genótipos ITS e 15 (40.5%) isolados apresentaram mutações no gene da DHPS. Estes autores observaram a associação,

estatisticamente, significativa entre os isolados que apresentaram genótipos mutantes do gene da DHPS e os isolados onde foram detectados os genótipos Ee, Ne ou Eg, que constituíam o grupo de genótipos mais frequentes, na população estudada.

No presente estudo, com um número maior de isolados de *P. jirovecii* analisado, não se observou a associação significativa entre os genótipos mutantes da DHPS e os genótipos ITS. Da mesma forma, num estudo efectuado anteriormente, os genótipos mutantes da DHPS distribuíram-se igualmente pelos genótipos ITS mais frequentes, não se observando nenhuma associação entre os dois *loci* (Matos *et al.*, 2003a). Assim, a ausência de correlação entre os genótipos da DHPS e das regiões ITS, observada no presente trabalho, está de acordo com o reportado na maioria dos estudos, o que sugere que estes dois *loci* são independentes e que as mutações no gene da DHPS surgem, separadamente, entre os vários tipos de *P. jirovecii* (Ma & Kovacs *et al.*, 2001; Matos *et al.*, 2003a; Totet *et al.*, 2003, 2004).

Também, em relação ao gene da DHFR, não se observou nenhuma associação significativa entre as sequências identificadas e os genótipos observados no gene da DHPS e nas regiões ITS. Até ao momento, existem poucos estudos que tenham caracterizado, geneticamente, a DHFR de *P. jirovecii* e nenhum analisou a ocorrência de associação entre as sequências do gene da DHFR e os genótipos da DHPS ou das regiões ITS. Num estudo preliminar, efectuado com uma população de doentes imunocomprometidos com PPC, entre 68 isolados de *P. jirovecii*, seis (8,8%) apresentaram genótipos mutantes da DHPS, em 23 (33,8%) foram detectados vários polimorfismos, na sequência do gene da DHFR, e 19 diferentes tipos de ITS foram descritos (Costa *et al.*, 2006). À semelhança do observado no presente trabalho, e, apesar, da elevada variabilidade genética demonstrada, os genótipos mutantes da DHPS

e da DHFR distribuíram-se de forma semelhante pela maioria dos genótipos ITS identificados, não se verificando nenhuma associação significativa entre as sequências identificadas, nos *loci* em estudo.

No presente estudo, a conjunção dos genótipos identificados nas três regiões genómicas em análise – os genes da DHPS e da DHFR e as regiões ITS do gene de rRNA – permitiu a diferenciação de 50 haplótipos, entre 100 isolados de *P. jirovecii*. No total de 92 doentes imunocomprometidos, observou-se que nos doentes com secreções pulmonares seriadas a maioria apresentava conjuntos de genótipos diferentes, apesar de, individualmente, os genótipos da DHPS e da DHFR se manterem estáveis na maioria dos doentes. De facto, a variabilidade dos conjuntos de alelos observada, nestes doentes, foi devida, principalmente, à elevada diversidade de genótipos ITS.

Apesar da elevada heterogeneidade genética observada nos isolados de *P. jirovecii* analisados, não se verificou nenhuma associação entre os haplótipos identificados e as características epidemiológicas e clínicas examinadas. De futuro, serão necessários mais estudos de caracterização genética, envolvendo, provavelmente, regiões genómicas adicionais, e fenotípica de *P. jirovecii* com o intuito de esclarecer os factores que conduzem ao desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol.

CAPÍTULO IX

CONCLUSÕES

IX. CONCLUSÕES

No presente estudo, decorrido entre 2001 e 2004, foram estudadas, prospectivamente, amostras de secreções pulmonares de indivíduos imunocomprometidos com sintomatologia respiratória. Também, foram incluídos no estudo 30 isolados de *P. jirovecii* obtidos, retrospectivamente, entre 1995 e 2000.

O principal objectivo do trabalho consistiu na caracterização genética de isolados de *P. jirovecii* em três *loci* –os genes da DHPS e da DHFR e as regiões ITS do gene de rRNA– e no estudo da relação entre os genótipos identificados e as características epidemiológicas e clínicas.

No período compreendido entre Março de 2001 e Outubro de 2004, no conjunto de 403 amostras de secreções pulmonares estudadas, a percentagem de infecção por *P. jirovecii* foi de 64,5%. Pela técnica parasitológica, identificou-se *P. jirovecii* em 29,4% das amostras e pela técnica molecular, detectou-se em 49,6%, das amostras estudadas. Apesar de um maior número de isolados ter sido identificado nos anos de 2002 e 2003, assim como nos meses de Setembro, Junho e Maio, não se verificou nenhuma variação sazonal significativa na identificação de *P. jirovecii*.

Do total dos isolados identificados no período de 2001–2004 (260) e dos isolados obtidos entre 1995–2000 (30), 290 foram submetidos ao estudo de caracterização genética, nos três *loci* em estudo.

Inicialmente, com o objectivo de melhorar a técnica de amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii*, procedeu-se à filtração das amostras de secreções pulmonares, para remoção de DNA contaminante do hospedeiro, e elaborou-se um protocolo de amplificação adicional deste *locus* – a PCR “nested”. Em 40 amostras de secreções pulmonares, verificou-se que o processo de microfiltração não contribuía para a melhor amplificação do DNA específico de *P. jirovecii*, e, de facto, o DNA humano continuava a estar presente nas amostras respiratórias, mesmo após a filtração. No entanto, a amplificação do gene da DHPS de *P. jirovecii*, com o protocolo de PCR “nested”, foi, significativamente, maior, tanto nas amostras filtradas, como nas não filtradas ($P < 0,001$, em ambas as condições), quando comparado com a PCR “touchdown”.

No que se refere ao estudo da variação genética da DHPS, este foi efectuado em 219 isolados de *P. jirovecii*, obtidos entre 1995 e 2004. O genótipo selvagem foi o mais frequente, estando presente em 84,5% de isolados. Em 15,5% dos isolados, observou-se a presença de genótipos mutantes nos codões 55 e 57, detectados em conjunto, ou não, com sequências do tipo selvagem, do gene da DHPS. Os genótipos mutantes foram mais frequentes entre o período de estudo 1995–2000, do que entre 2001–2004, no entanto esta diferença não foi, estatisticamente, significativa. Apesar, dos genótipos mutantes da DHPS terem sido mais frequentes entre os doentes seropositivos para VIH e nos doentes com contagem de linfócitos TCD4⁺, não foram observadas correlações significativas entre as variáveis epidemiológicas e clínicas, em estudo, e os genótipos identificados no gene da DHPS.

Em relação ao gene da DHFR, foi possível caracterizar 119 isolados de *P. jirovecii*, recolhidos nos dois períodos de estudo. Do total dos 119 isolados, 68,9% apresentaram sequências do tipo selvagem e 31,1% revelaram polimorfismos na

sequência do gene da DHFR. No total, nove locais de substituição foram identificados na população estudada. Foram observadas quatro substituições sinónimas, que não resultaram em alterações da sequência de aminoácidos, nas posições nucleotídicas 201, 272, 312 e 381. Também, foram detectadas cinco substituições nucleotídicas não sinónimas, nas posições nucleotídicas 38, 68, 92, 154 e 200 que resultaram na alteração dos codões 13, 23, 31, 52 e 67, respectivamente. À semelhança do que se observou no gene da DHPS, não se verificou nenhuma correlação entre as características epidemiológicas e clínicas e os polimorfismos observados no gene da DHFR, em particular com o uso de profilaxia com cotrimoxazol. No entanto, em contraste com a maioria dos estudos efectuados, identificou-se elevado número de polimorfismos, entre os isolados estudados, o que sugere um nível extenso de heterogeneidade genética.

No presente estudo, foi, também, efectuada a avaliação da variação genética das regiões ITS de *P. jirovecii*. Entre os 166 isolados, sequenciados com sucesso, 30 genótipos diferentes foram identificados, o que comprova o elevado grau de diversidade genética destas regiões e o seu potencial no estudo da transmissão e epidemiologia da pneumocistose. Neste estudo, o genótipo mais frequente foi o Eg, logo seguido do Cg e do Gg. O genótipo Ne foi, significativamente, mais frequente entre 1995–2000, enquanto que genótipo Eg foi mais frequente entre 2001–2004 ($P= 0,026$ e $0,011$, respectivamente). Também, se observou que a presença do genótipo Eg estava correlacionada com o valor de PaO₂ superior a 65 mm Hg ($P=0.010$).

No presente estudo, foi efectuada combinação dos alelos identificados nos *loci* em estudo, de forma a identificar os haplótipos mais frequentes na população. Na análise multilocus, apesar da grande variabilidade, demonstrada pelos 50 haplótipos identificados em 100 isolados de *P. jirovecii*, não se observou nenhuma correlação entre

estes e as variáveis epidemiológicas e clínicas em estudo. No entanto, a análise genética efectuada demonstrou que as regiões genómicas estudadas, são, aparentemente, *loci* independentes, não existindo nenhuma ligação entre si.

Em relação ao estudo de resistência ao cotrimoxazol, em *P. jirovecii*, o trabalho efectuado demonstra que os genótipos da DHPS e da DHFR, associados à resistência, não estão correlacionados com o uso da profilaxia com este fármaco. Também, observou-se que os genótipos mutantes ocorrem em doentes não expostos ao cotrimoxazol. Estes resultados sugerem que estes polimorfismos possam ser transmitidos pessoa-a-pessoa, e não, apenas, seleccionados por acção dos fármacos. Assim, os resultados obtidos, na diversidade genética de *P. jirovecii*, para além de melhorar a compreensão sobre o possível desenvolvimento de resistência ao cotrimoxazol, podem, ainda, contribuir para a caracterização intra-específica deste parasita e para o estudo da transmissão da infecção por *P. jirovecii*.

CAPÍTULO X

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUYA, Y. L., BEAUMEL, A., LUCAS, S., DAGO-AKRIBI, A., COULIBALY, G., N'DHATZ, M., KONAN, J. B., YAPI, A., DE COCK, K. M. (1992). *Pneumocystis carinii* pneumonia. An uncommon cause of death in African patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 145 (3): 617-20.
- ACHARI, A., SOMERS, D. O., CHAMPNESS, J. N., BRYANT, P. K., ROSEMOND, J., STAMMERS, D. K. (1997). Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nat Struct Biol* 4 (6): 490-7.
- AFESSA, B., GREEN, W. R., WILLIAMS, W. A., HAGLER, N. G., GUMBS, R. V., HACKNEY, R. L., FREDERICK, W. R. (1988). *Pneumocystis carinii* pneumonia complicated by lymphadenopathy and pneumothorax. *Arch Intern Med* 148 (12): 2651-4.
- ALIOUAT, E. M., MAZARS, E., DEI-CAS, E., DELCOURT, P., BILLAUT, P., CAMUS, D. (1994). *Pneumocystis* cross infection experiments using SCID mice and nude rats as recipient host, showed strong host-species specificity. *J Eukaryot Microbiol* 41 (5): 71S.
- ANEKTHANANON, T., RATANASUWAN, W., TECHASATHIT, W., RONGRUNGRUANG, Y., SUWANAGOOL, S. (2004). HIV infection/acquired immunodeficiency syndrome at Siriraj Hospital, 2002: time for secondary prevention. *J Med Assoc Thai* 87 (2): 173-9.
- ANSARI, N. A., KOMBE, A. H., KENYON, T. A., HONE, N. M., TAPPERO, J. W., NYIRENDA, S. T., BINKIN, N. J., LUCAS, S. B. (2002). Pathology and causes of death in a group of 128 predominantly HIV-positive patients in Botswana, 1997-1998. *Int J Tuberc Lung Dis* 6 (1): 55-63.
- ANSARI, N. A., KOMBE, A. H., KENYON, T. A., MAZHANI, L., BINKIN, N., TAPPERO, J. W., GEBREKRISTOS, T., NYIRENDA, S., LUCAS, S. B. (2003). Pathology and causes of death in a series of human immunodeficiency virus-positive and -negative pediatric referral hospital admissions in Botswana. *Pediatr Infect Dis J* 22 (1): 43-7.

- ANTUNES, F., DOROANA, M. (2003). Infecção VIH-SIDA. In: *Manual Sobre Doenças Infeciosas*, F. Antunes ed., Lisboa, Permanyer Portugal, pp.179-234.
- ARCENAS, R. C., UHL, J. R., BUCKWALTER, S. P., LIMPER, A. H., CRINO, D., ROBERTS, G. D., WENGENACK, N. L. (2006). A real-time polymerase chain reaction assay for detection of *Pneumocystis* from bronchoalveolar lavage fluid. *Diagn Microbiol Infect Dis* 54 (3): 169-75.
- ASAI, S. (1998). Radiographic imaging of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Radiat Med* 16 (6): 431-40.
- ATZORI, C., LU, J. J., JIANG, B., BARTLETT, M. S., ORLANDO, G., QUEENER, S. F., SMITH, J. W., CARGNEL, A., LEE, C. H. (1995). Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients by using polymerase chain reactions on serum specimens. *J Infect Dis* 172 (6): 1623-6.
- ATZORI, C., VALERIO A., FANTONI G., DRAGO L., GISMONDO M. R., CARGNEL A. (2001). *Pneumocystis carinii* ITS typing: doubtful evidence of genotype-related virulence. *J Eukaryot Microbiol Suppl* : 147S.
- BANERJI, S., LUGLI, E. B., MILLER, R. F., WAKEFIELD, A. E. (1995). Analysis of genetic diversity at the *arom* locus in isolates of *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 42 (6): 675-9.
- BANERJI, S., WAKEFIELD, A. E., ALLEN, A. G., MASKELL, D. J., PETERS, S. E., HOPKIN, J. M. (1993). The cloning and characterization of the *arom* gene of *Pneumocystis carinii*. *J Gen Microbiol* 139 (12): 2901-14.
- BARTLETT, M. S., LEE, C. H., LU, J. J., BAUER, N. L., BETTZ, J. F., McLAUGHLIN, G. L., SMITH, J. W. (1994). *Pneumocystis carinii* detected in air. *J Eukaryot Microbiol* 41 (5): 75S.

- BARTLETT, M. S., LU, J. J., LEE, C. H., DURANT, P. J., QUEENER, S. F., SMITH, J. W. (1996). Types of *Pneumocystis carinii* detected in air samples. *J Eukaryot Microbiol* 43 (5): 44S.
- BARTLETT, M. S., VERMUND, S. H., JACOBS, R., DURANT, P. J., SHAW, M. M., SMITH, J. W., TANG, X., LU, J. J., LI, B., JIN, S., LEE, C. H. (1997). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in air samples: likely environmental risk to susceptible persons. *J Clin Microbiol* 35 (10): 2511-3.
- BASELSKI, V. S., ROBISON, M. K., PIFER, L. W., WOODS, D. R. (1990). Rapid detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage samples by using Cellufluor staining. *J Clin Microbiol* 28 (2): 393-4.
- BATUNGWANAYO, J., TAELEMAN, H., LUCAS, S., BOGAERTS, J., ALARD, D., KAGAME, A., BLANCHE, P., CLERINX, J., VAN DE PERRE, P., ALLEN, S. (1994). 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* 149 (6): 1591-6.
- BAUER, H. M., TING, M. S., GREER, C. E., CHAMBERS, J. C., TASHIRO, C. J., CHIMERA, J., REINGOLD, A., MNAOS, M. (1991). Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 265 (4): 472-7.
- BAUER, N. L., PAULSRUD, J. R., BARTLETT, M. S., SMITH, J. W., WILDE, C. E. 3RD. (1991). Immunologic comparisons of *Pneumocystis carinii* strains obtained from rats, ferrets, and mice using convalescent sera from the same sources. *J Protozool* 38 (6): 166S-8S.
- BAUER, N. L., PAULSRUD, J. R., BARTLETT, M. S., SMITH, J. W., WILDE, C. E. 3RD. (1993). *Pneumocystis carinii* organisms obtained from rats, ferrets, and mice are antigenically different. *Infect Immun* 61 (4): 1315-9.

- BAUGHMAN, R. P. (1994). Current methods of diagnosis. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia., 2ª edição. Walzer P. D. (Editor). New York, Marcel Dekker: pp. 381-401.
- BAUGHMAN, R. P., STROHOFER, S. S., CLINTON, B. A., NICKOL, A. D., FRAME, P. T. (1989). The use of an indirect fluorescent antibody test for detecting *Pneumocystis carinii*. *Arch Pathol Lab Med* 113 (9): 1062-5.
- BEARD, C. B., CARTER, J. L., KEELY, S. P., HUANG, L., PIENIAZEK, N. J., MOURA, I. N., ROBERTS, J. M., HIGHTOWER, A. W., BENS, M. S., FREEMAN, A. R., LEE, S., STRINGER, J. R., DUCHIN, J. S., DEL RIO, C., RIMLAND, D., BAUGHMAN, R. P., LEVY, D. A., DIETZ, V. J., SIMON, P., NAVIN, T. R. (2000). Genetic variation in *Pneumocystis carinii* isolates from different geographic regions: implications for transmission. *Emerg Infect Dis* 6 (3): 265-72.
- BEARD, C. B., FOX, M. R., LAWRENCE, G. G., GUARNER, J., HANZLICK, R. L., HUANG, L., RIO, C. D., RIMLAND, D., DUCHIN, J. S., COLLEY, D. G. (2005). Genetic differences in *Pneumocystis* isolates recovered from immunocompetent infants and from adults with AIDS: Epidemiological Implications. *J Infect Dis* 192 (10): 1815-8.
- BELLOMO, A. R., PERLMAN, D. C., KAMINSKY, D. L., BRETTHOLZ, E. M., SARLIN, J. G. (1992). *Pneumocystis* colitis in a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Gastroenterol* 87 (6): 759-61.
- BENFIELD, T. L., LUNDGREN, J. D. (1998). The *Pneumocystis carinii* major surface glycoprotein (MSG): its potential involvement in the pathophysiology of pneumocystosis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22 (1-2): 129-34.
- BENSOUSAN, T., GARO, B., ISLAM, S., BOURBIGOT, B., CLEDES, J., GARRE, M. (1990). Possible transfer of *Pneumocystis carinii* between kidney transplant recipients. *Lancet* 336 (8722): 1066-7.

- BERNARD, E. M., SEPKOWITZ, K. A., TELZAK, E. E., ARMSTRONG, D. (1992). Pneumocystosis. *Med Clin North Am* 76 (1): 107-19.
- BIERHOFF, E., TRAN, A., PAKOS, E., ROCKSTROH, J., PFEIFER, U. (1996). Perforation of the small intestine in a patient with disseminated *Pneumocystis carinii* infection in AIDS. *Gen Diagn Pathol* 141 (3-4): 255-60.
- BISHOP, R., GURNELL, J., LAAKKONEN, J., WHITWELL, K., PETERS, S. (1997). Detection of *Pneumocystis* DNA in the lungs of several species of wild mammal. *J Eukaryot Microbiol* 44 (6): 57S.
- BLACK, J. R., FEINBERG, J., MURPHY, R. L., FASS, R. J., FINKELSTEIN, D., AKIL, B., SAFRIN, S., CAREY, J. T., STANSELL, J., PLOUFFE, J. F., WEILL, H. E., SHELTON, B., SATTLER, F. R. (1994). Clindamycin and primaquine therapy for mild-to-moderate episodes of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS: AIDS Clinical Trials Group 044. *Clin Infect Dis* 18 (6): 905-13.
- BOISELLE, P. M., CRANS, C. A. JR, KAPLAN, M. A. (1999). The changing face of *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients. *AJR Am J Roentgenol* 172 (5): 1301-9.
- BOOM, R., SOL, C. J. A., SALIMANS, M. M. M., JANSEN, C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN, P. M. E., NOORDAA J. V. D. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28 (3): 495-503.
- BOZZETTE, S. A. (1990). The use of corticosteroids in *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Infect Dis* 162 (6): 1365-9.
- BOZZETTE, S. A., FINKELSTEIN, D. M., SPECTOR, S. A., FRAME, P., POWDERLY, W. G., HE, W., PHILLIPS, L., CRAVEN, D., VAN DER HORST, C., FEINBERG, J. (1995). A randomized trial of three anti-*Pneumocystis* agents in patients with advanced human

- immunodeficiency virus infection. NIAID AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 332 (11): 693-9.
- BOZZETTE, S. A., SATTLER, F. R., CHIU, J., WU, A. W., GLUCKSTEIN, D., KEMPER, C., BARTOK, A., NIOSI, J., ABRAMSON, I., COFFMAN, J., HUGHLETT, C., LOYA, R., CASSENS, B., AKIL, B., TZE-CHIANG, M., BOYLEN, C. T., NIELSEN, D., RICHMAN, D. D., TILLES, J. G., LEEDOM, J., MCCUTCHAN, J. A. (1990). A controlled trial of early adjunctive treatment with corticosteroids for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. California Collaborative Treatment Group. *N Engl J Med* 323 (21): 1451-7.
- BRANCART, F., RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H., FONTEYNE, P. A., PERES-BOTA, D., LIESNARD, C. (2005). Quantitative TaqMan PCR for detection of *Pneumocystis jiroveci*. *J Microbiol Methods* 61 (3): 381-7.
- BROOKS, D.R., WANG, P., READ, M., WATKINS, W. M., SIMS, P. F., HYDE, J. E. (1994). Sequence variation of the hydromethyl-dihydropterin pyrophosphokinase: dihydropteroate synthase gene in lines of the human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, with differing resistance to sulphadoxine. *Eur J Biochem* 224 (2): 397-405.
- BROWN, P. D., FREEMAN, A., FOXMAN, B. (2002). Prevalence and predictors of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Michigan. *Clin Infect Dis* 34 (8): 1061-6.
- BUNDOW, D. L., ABOULAFIA, D. M. (1997). Skin involvement with *Pneumocystis* despite dapsone prophylaxis: a rare cause of skin nodules in a patient with AIDS. *Am J Med Sci* 313 (3): 182-6.
- BUTT, A. A., MICHAELS, S., KISSINGER, P. (2002). The association of serum lactate dehydrogenase level with selected opportunistic infections and HIV progression. *Int J Infect Dis* 6 (3): 178-81.

- CALIENDO, A. M., HEWITT, P. L., ALLEGA, J. M., KEEN, A., RUOFF, K. L., FERRARO, M. J. (1998). Performance of a PCR assay for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 36 (4): 979-82.
- CARETTE, M. F., MAYAUD, C., BIGOT, J. M. (1994). Imagerie thoracique ao cours de SIDA. *Review du Practicien (Paris)*, 44: 1056-67.
- CASANOVA-CARDIEL, L., LEIBOWITZ, M. J. (1997). Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol* 44 (6): 28S.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (1989). Guidelines for prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia for persons infected with human immunodeficiency virus. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 38 Suppl 5 : 1-9.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. (2004). Treating opportunistic infections among HIV-infected adults and adolescents: recommendations from CDC, the National Institutes of Health, and the HIV Medicine Association/Infectious Diseases Society of America. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 53 (RR-15): 5-8.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS (2005) – Infecção VIH/SIDA: a situação em Portugal a 31 de Dezembro de 2004 – Documento SIDA 133, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, 59 pp., <http://www.insarj.pt/site/resources/images/Docs/sida2004.pdf>.
- CERE, N., DROUET-VIARD, F., DEI-CAS, E., CHANTELOUP, N., COUDERT, P. (1997). *In utero* transmission of *Pneumocystis carinii* sp. f. *oryctolagi*. *Parasite* 4 (4): 325-30.
- CERE, N., POLACK, B. (1999). Animal pneumocystosis: a model for man. *Vet Res* 30 (1): 1-26.

- CHABE, M., VARGAS, S. L., EYZAGUIRRE, I., ALIOUAT, E. M., FOLLET-DUMOULIN, A., CREUSY, C., FLEURISSE, L., RECOURT, C., CAMUS, D., DEI-CAS, E., DURAND-JOLY, I. (2004). Molecular typing of *Pneumocystis jirovecii* found in formalin-fixed paraffin-embedded lung tissue sections from sudden infant death victims. *Microbiology* 150 (Pt 5): 1167-72.
- CHARIYALERTSAK, S., SIRISANTHANA, T., SAENGWONLOEY, O., NELSON, K. E. (2001). Clinical presentation and risk behaviors of patients with acquired immunodeficiency syndrome in Thailand, 1994-1998: regional variation and temporal trends. *Clin Infect Dis* 32 (6): 955-62.
- CHEN, W., GIGLIOTTI, F., HARMSSEN, A. G. (1993). Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 61 (12): 5406-9.
- CHINTU, C., MUDENDA, V., LUCAS, S., NUNN, A., LISHIMPI, K., MASWAHU, D., KASOLO, F., MWABA, P., BHAT, G., TERUNUMA, H., ZUMLA, A. (2002). Lung diseases at necropsy in African children dying from respiratory illnesses: a descriptive necropsy study. *Lancet* 360 (9338): 985-90.
- COHEN, O. J., STOECKLE, M. Y. (1991). Extrapulmonary *Pneumocystis carinii* infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Intern Med* 151 (6): 1205-14.
- CONTE, J. E. JR, GOLDEN, J. A. (1988). Concentrations of aerosolized pentamidine in bronchoalveolar lavage, systemic absorption, and excretion. *Antimicrob Agents Chemother* 32 (10): 1490-3.
- CONTINI, C., ROMANI, R., CULTRERA, R., ANGELICI, E., VILLA, M. P., RONCHETTI, R. (1997). Carriage of *Pneumocystis carinii* in children with chronic lung diseases. *J Eukaryot Microbiol* 44 (6): 15S.

- CONTINI, C., VILLA, M. P., ROMANI, R., MEROLLA, R., DELIA, S., RONCHETTI, R. (1998). Detection of *Pneumocystis carinii* among children with chronic respiratory disorders in the absence of HIV infection and immunodeficiency. *J Med Microbiol* 47 (4): 329-33.
- COSTA, M. C., ESTEVES, F., ANTUNES, F., MATOS O. (2006). Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in immunocompromised patients: preliminary results. *J Eukaryot Microbiol* (no prelo).
- COSTA, M. C., ESTEVES, F., ANTUNES, F., MATOS, O. (2006a). The genetic characterization of dihydrofolate reductase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portugal. *J Antimicrob Chemother* (no prelo).
- COSTA, M. C., GASPAR, J., MANSINHO, K., ESTEVES, F., ANTUNES, F., MATOS, O. (2005). Detection of *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms in patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Scand J Infect Dis* 37 (10): 766-71.
- COSTA, M. C., GASPAR, J., RIBEIRO, C., ANTUNES, F., MATOS, O. (2003). Dihydropteroate synthase (DHPS) genotyping by PCR-RFLP analysis of *Pneumocystis jirovecii* repeated isolates from HIV-infected patients: a preliminary study. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl : 607-8.
- COSTA, M. C., HELWEG-LARSEN, J., ANTUNES, F., LUNGREN, B., DIOGO, J., MATOS, O. (2001). PCR-RFLP analysis of the DHPS gene for the study of resistance of *Pneumocystis carinii* to sulpha drugs in patients with co-infection PCP/HIV. *J Eukaryot Microbiol* Suppl : 148S-149S.
- COSTA, M. C., HELWEG-LARSEN, J., LUNDGREN, B., ANTUNES, F., MATOS, O. (2003a). Mutations in the dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis jirovecii* isolates from Portuguese patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 22 (5): 516-20.

- CRANS, C. A. JR, BOISELLE, P. M. (1999). Imaging features of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Crit Rev Diagn Imaging* 40 (4): 251-84.
- CROTHERS, K., BEARD, C. B., TURNER, J., GRONER, G., FOX, M., MORRIS, A., EISER, S., HUANG, L. (2005). Severity and outcome of HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia containing *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene mutations. *AIDS* 19 (8): 801-5.
- CROTHERS, K., HUANG, L., MORRIS, A., FOX, M., GRONER, G., TURNER, J. R., MERRIFIELD, C., EISER, S., FRIEDLY, J., GRAVARI, E., ZUCCHI, P., BEARD, C. B. (2003). *Pneumocystis* dihydropteroate synthase mutations in patients with *Pneumocystis* pneumonia who are newly diagnosed with HIV infection. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl : 609-10.
- CUSHION, M. T., LINKE, M. J., COLLINS, M., KEELY, S. P., STRINGER, J. R. (1999). The minimum number of *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* organisms required to establish infections is very low. *J Eukaryot Microbiol* 46 (5): 111S.
- CUSHION, M. T., RUFFOLO, J. J., LINKE, M. J., WALZER, P. D. (1985). *Pneumocystis carinii*: growth variables and estimates in the A549 and WI-38 VA13 human cell lines. *Exp Parasitol* 60 (1): 43-54.
- CUSHION, M. T., STANFORTH, D., LINKE, M. J., WALZER, P. D. (1985a). Method of testing the susceptibility of *Pneumocystis carinii* to antimicrobial agents in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 28 (6): 796-801.
- DALE, G. E., BROGER, C., D'ARCY, A., HARTMAN, P. G., DEHOOGT, R., JOLIDON, S., KOMPIS, I., LABHARDT, A. M., LANGEN, H., LOCHER, H., PAGE, M. G., STUBER, D., THEN, R. L., WIPF, B., OEFNER, C. (1997). A single amino acid substitution in *Staphylococcus aureus* dihydrofolate reductase determines trimethoprim resistance. *J Mol Biol* 266 (1): 23-30.

- DALLAS, W. S., GOWEN, J. E., RAY, P. H., COX, M. J., DEV, I. K. (1992). Cloning, sequencing and enhanced expression of the dihydropteroate synthase of *Escherichia coli* MC4100. *J Bacteriol* 174 (18): 5961-70.
- DANKNER, W. M., LINDSEY, J. C., LEVIN, M. J. (2001). Correlates of opportunistic infections in children infected with the human immunodeficiency virus managed before highly active antiretroviral therapy. *Pediatr Infect Dis J* 20 (1): 40-8.
- DE LORENZO, L. J., HUANG, C. T., MAGUIRE, G. P., STONE, D. J. (1987). Roentgenographic patterns of *Pneumocystis carinii* pneumonia in 104 patients with AIDS. *Chest* 91 (3): 323-7.
- DE SOUZA, W., BENCHIMOL, M. (2005). Basic biology of *Pneumocystis carinii*: a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100 (8): 903-8.
- DEI-CAS, E. (2000). *Pneumocystis* infections: the iceberg? *Med Mycol* 38 Suppl 1 : 23-32.
- DEMANCHE, C., BERTHELEMY, M., PETIT, T., POLACK, B., WAKEFIELD, A. E., DEI-CAS, E., GUILLOT, J. (2001). Phylogeny of *Pneumocystis carinii* from 18 primate species confirms host specificity and suggests coevolution. *J Clin Microbiol* 39 (6): 2126-33.
- DEMANCHE, C., GUILLOT, J., BERTHELEMY, M., PETIT, T., ROUX, P., WAKEFIELD, A. E. (2002). Absence of mutations associated with sulfa resistance in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene from non-human primates. *Med Mycol* 40 (3): 315-8.
- DIETERICH, D. T., LEW, E. A., BACON, D. J., PEARLMAN, K. I., SCHOLLES, J. V. (1992). Gastrointestinal pneumocystosis in HIV-infected patients on aerosolized pentamidine: report of five cases and literature review. *Am J Gastroenterol* 87 (12): 1763-70.
- DIOGO, J. M. C. (1999). Estudo da pneumonia por *Pneumocystis carinii* em doentes infectados pelo vírus da imunodeficiência adquirida nos concelhos de Almada, Seixal e

- Sesimbra. Tese de dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pp. 132.
- DOHN, M. N., FRAME, P. T. (1994). Clinical manifestations in adults. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia., 2ª edição. Walzer P. D. (Editor). New York, Marcel Dekker: pp. 311-59.
- DOHN, M. N., WHITE, M. L., VIGDORTH, E. M., BUNCHE, R. C., HERTZBERG, V. S., BAUGHMAN, R. P., SMULIAN, G. A., WALZER, P. D. (2000). Geographic clustering of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (5): 1617-21.
- DUMOULIN, A., MAZARS, E., SEGUY, N., GARGALLO-VIOLA, D., VARGAS, S., CAILLIEZ, J. C., ALIOUAT, E. M., WAKEFIELD, A. E., DEI-CAS E. (2000). Transmission of *Pneumocystis carinii* disease from immunocompetent contacts of infected hosts to susceptible hosts. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 19 (9): 671-8.
- DWORKIN, M. S., HANSON, D. L., KAPLAN, J. E., JONES, J. L., WARD, J. W. (2000). Risk for preventable opportunistic infections in persons with AIDS after antiretroviral therapy increases CD4⁺ T lymphocyte counts above prophylaxis thresholds. *J Infect Dis* 182 (2): 611-5.
- DYER, M., VOLPE, F., DELVES, C. J., SOMIA, N., BURNS, S., SCAIFE, J. G. (1992). Cloning and sequence of a beta-tubulin cDNA from *Pneumocystis carinii*: possible implications for drug therapy. *Mol Microbiol* 6 (8): 991-1001.
- DYKSTRA, C. C., TIDWELL, R. R. (1991). Inhibition of topoisomerases from *Pneumocystis carinii* by aromatic dicationic molecules. *J Protozool* 38 (6): 78S-81S.

- EDLIND, T. D., BARTLETT, M. S., SMITH, J. W. (1991). Characterization of the beta-tubulin gene of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 38 (6): 62S-63S.
- EDLIND, T. D., BARTLETT, M. S., WEINBERG, G. A., PRAH, G. N., SMITH, J. W. (1992). The beta-tubulin gene from rat and human isolates of *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol* 6 (22): 3365-73.
- EDMAN, J. C., EDMAN, U., CAO, M., LUNDGREN, B., KOVACS, J. A., SANTI, D. V. (1989). Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (22): 8625-9.
- EDMAN, J. C., KOVACS, J. A., MASUR, H., SANTI, D. V., ELWOOD, H. J., SOGIN, M. L. (1988). Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature* 334 (6182): 519-22.
- EDMAN, J. C., KOVACS, J. A., MASUR, H., SANTI, D. V., ELWOOD, H. J., SOGIN, M. L. (1989a). Ribosomal RNA genes of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 36 (1): 18S-20S.
- EDMAN, U., EDMAN, J. C., LUNDGREN, B., SANTI, D. V. (1989). Isolation and expression of the *Pneumocystis carinii* thymidylate synthase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (17): 6503-7.
- ELLISON, E., YUEN, S. Y., LAWSON, L., CHAN, N. H. (1995). Fine-needle aspiration diagnosis of extrapulmonary *Pneumocystis carinii* lymphadenitis in a human immunodeficiency virus positive patient. *Diagn Cytopathol* 12 (3): 251-3.
- ELVIN, K. (1994). Laboratory diagnosis and occurrence of *Pneumocystis carinii*. *Scand J Infect Dis Suppl* 94 : 1-34.

- ELVIN, K. M., BJORKMAN, A., LINDER, E., HEURLIN, N., HJERPE, A. (1988). *Pneumocystis carinii* pneumonia: detection of parasites in sputum and bronchoalveolar lavage fluid by monoclonal antibodies. *BMJ* 297 (6645): 381-4.
- ENGELBERG, L. A., LERNER, C. W., TAPPER, M. L. (1984). Clinical features of *Pneumocystis* pneumonia in the acquired immune deficiency syndrome. *Am Rev Respir Dis* 130 (4): 689-94.
- EPSTEIN, L. J., MEYER, R. D., ANTONSON, S., STRIGLE, S. M., MOHSENFAR, Z. (1994). Persistence of *Pneumocystis carinii* in patients with AIDS receiving chemoprophylaxis. *Am J Respir Crit Care Med* 150 (5 Pt 1): 1456-9.
- ERIKSSON, O. E. (1994). *Pneumocystis carinii*, a parasite in lungs of mammals. referred to a new family and order (Pneumocystidaceae, Pneumocystidales, Ascomycota). *Syst. Ascomycetum* 13 : 165-180.
- FENELON, L. E., KEANE, C. T., BAKIR, M., TEMPERLEY, I. J. (1985). A cluster of *Pneumocystis carinii* infections in children. *Br Med J (Clin Res Ed)* 291 (6510): 1683.
- FERNANDEZ, P., TORRES, A., MIRO, J. M., VIEIGAS, C., MALLOLAS, J., ZAMORA, L., GATELL, J. M., VALLS, M. E., RIQUELME, R., RODRIGUEZ-ROISIN, R. (1995). Prognostic factors influencing the outcome in *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *Thorax* 50 (6): 668-71.
- FISCHL, M. A., DICKINSON, G. M., LA VOIE, L. (1988). Safety and efficacy of sulfamethoxazole and trimethoprim chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS. *JAMA* 259 (8): 1185-9.
- FISHMAN, J. A. (1994). Radiological approaches to the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia., 2ª edição. Walzer P. D. (Editor). New York, Marcel Dekker: pp. 311-59.

- FISK, D. T., MESHNICK, S., KAZANJIAN, P. H. (2003). *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients in the developing world who have acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 36 (1): 70-8.
- FLETCHER, L. D., MCDOWELL, J. M., TIDWELL, R. R., MEAGHER, R. B., DYKSTRA, C. C. (1994). Structure, expression and phylogenetic analysis of the gene encoding actin I in *Pneumocystis carinii*. *Genetics* 137 (3): 743-50.
- FLORI, P., BELLETE, B., DURAND, F., RABERIN, H., CAZORLA, C., HAFID, J., LUCHT, F., SUNG, R. T. (2004). Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jiroveci* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* 53 (Pt 7): 603-7.
- FRENKEL, J. K. (1976). *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr* 43 : 13-30.
- FRENKEL, J. K. (1999). *Pneumocystis* pneumonia, an immunodeficiency-dependent disease (IDD): a critical historical overview. *J Eukaryot Microbiol* 46 (5): 89S-92S.
- FRENKEL, J. K., GOOD, J. T., SHULTZ, J. A. (1966). Latent *Pneumocystis* infection of rats, relapse, and chemotherapy. *Lab Invest* 15 (10): 1559-77.
- FUJITA, M., FURUTA, T., KOJIMA, S., KURATA, T., YOSHIKAWA, Y. (1996). Survey for *Pneumocystis carinii* infection of wild-born and laboratory-bred monkeys by indirect immunofluorescence and cyst-staining methods. *Jpn J Med Sci Biol* 49 (3): 113-20.
- FURRER, H., EGGER, M., OPRAVIL, M., BERNASCONI, E., HIRSCHL, B., BATTEGAY, M., TELENTI, A., VERNAZZA, P. L., RICKENBACH, M., FLEPP, M., MALINVERNI, R. (1999). Discontinuation of primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected adults treated with combination antiretroviral therapy. Swiss HIV Cohort Study. *N Engl J Med* 340 (17): 1301-6.

- FURRER, H., OPRAVIL, M., ROSSI, M., BERNASCONI, E., TELENTI, A., BUCHER, H., SCHIFFER, V., BOGGIAN, K., RICKENBACH, M., FLEPP, M., EGGER, M. (2001). Discontinuation of primary prophylaxis in HIV-infected patients at high risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia: prospective multicentre study. *AIDS* 15 (4): 501-7.
- GARBE, T. R., STRINGER, J. R. (1994). Molecular characterization of clustered variants of genes encoding major surface antigens of human *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 62 (8): 3092-101.
- GASKELL, G. J., CARTER, D. A., BRITTON, W. J., TOVEY, E. R., BENYON, F. H., LOVBORG, U. (1997). Analysis of the internal transcribed spacer regions of ribosomal DNA in common airborne allergenic fungi. *Electrophoresis* 18 (9): 1567-9.
- GASSER, R. B., MONTI, J. R., ZHU, X., CHILTON, N. B., HUNG, G. C., GULDBERG, P. (1997). Polymerase chain reaction-linked single-strand conformation polymorphism of ribosomal DNA to fingerprint parasites. *Electrophoresis* 18 (9): 1564-6.
- GIGLIOTTI, F. (1992). Host species-specific antigenic variation of a mannosylated surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 165 (2): 329-36.
- GIGLIOTTI, F., HARMSSEN, A. G., HAIDARIS, C. G., HAIDARIS, P. J. (1993). *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infect Immun* 61 (7): 2886-90.
- GIRARD, P. M., LANDMAN, R., GAUDEBOUT, C., OLIVARES, R., SAIMOT, A. G., JELAZKO, P., GAUDEBOUT, C., CERTAIN, A., BOUE, F., BOUVET, E., LECOMPTE, T., COULAND, P. J. (1993). Dapsone-pyrimethamine compared with aerosolized pentamidine as primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia and toxoplasmosis in HIV infection. The PRIO Study Group. *N Engl J Med* 328 (21): 1514-20.

- GOESCH, T. R., GOTZ, G., STELLBRINCK, K. H., ALBRECHT, H., WEH, H. J., HOSSFELD, D. K. (1990). Possible transfer of *Pneumocystis carinii* between immunodeficient patients. *Lancet* 336 (8715): 627.
- GORDIN, F. M., SIMON, G. L., WOFSY, C. B., MILLS, J. (1984). Adverse reactions to trimethoprim-sulfamethoxazole in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 100 (4): 495-9.
- GOSEY, L. L., HOWARD, R. M., WITEBSKY, F. G., OGNIBENE, F. P., WU, T. C., GILL, V. J., MACLOWRY, J. D. (1985). Advantages of a modified toluidine blue O stain and bronchoalveolar lavage for the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 22 (5): 803-7.
- GRAHAM, S. M., MTITIMILA, E. I., KAMANGA, H. S., WALSH, A. L., HART, C. A., MOLYNEUX, M. E. (2000). Clinical presentation and outcome of *Pneumocystis carinii* pneumonia in Malawian children. *Lancet* 355 (9201): 369-73.
- GRASLAND, A., POUCHOT, J., MICHON, C., HERTIG, A., SIMONPOLI, A. M., VINCENEUX, P. (1997). Extrapulmonary and disseminated pneumocystosis in AIDS. A review of the literature. *Ann Med Interne (Paris)* 148 (2): 177-83.
- GROCOTT, R. G. (1955). A stain for fungi in tissue sections and smears using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. *Am J Clin Pat* 25 : 975-979.
- GROVER, S. A., COUPAL, L., SUISSA, S., SZENTVERI, T., FALUTZ, J., TSOUKAS, C., BATTISTA, R. N., GILMORE, N. (1992). The clinical utility of serum lactate dehydrogenase in diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia among hospitalized AIDS patients. *Clin Invest Med* 15 (4): 309-17.

- GUAN, X. Q., ZHOU, L. C., LIAO, X. G., LIN, X., LI, Y. Y. (2001). Pathological changes of diffuse *Pneumocystis carinii* infection in the liver of an AIDS patient. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 19 (4): 236-8.
- GUILLOT, J., DEMANCHE, C., HUGOT, J. P., BERTHELEMY, M., WAKEFIELD, A. E., DEI-CAS, E., CHERMETTE, R. (2001). Parallel phylogenies of *Pneumocystis* species and their mammalian hosts. *J Eukaryot Microbiol Suppl* : 113S-115S.
- HAGIWARA, Y., FUJIWARA, S., TAKAI, H., OHNO, K., MASUDA, K., FURUTA, T., NAKAYAMA, H., DOI, K., TSUJIMOTO, H. (2001). *Pneumocystis carinii* pneumonia in a Cavalier King Charles Spaniel. *J Vet Med Sci* 63 (3): 349-51.
- HAGMANN, S., MERALI, S., SITNITSKAYA, Y., FEFFERMAN, N., POLLACK, H. (2001). *Pneumocystis carinii* infection presenting as an intra-abdominal cystic mass in a child with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 33 (8): 1424-6.
- HAUSER, P. M., BLANC, D. S., SUDRE, P., SENNGEN MANOLOFF, E., NAHIMANA, A., BILLE, J., WEBER, R., FRANCIOLI, P. (2001). Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* in HIV-positive and -negative patients as revealed by PCR-SSCP typing. *AIDS* 15 (4): 461-6.
- HAVERKOS, H. W. (1984). Assessment of therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia. PCP Therapy Project Group. *Am J Med* 76 (3): 501-8.
- HAY, J. W., OSMOND, D. H., JACOBSON, M. A. (1988). Projecting the medical costs of AIDS and ARC in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1 (5): 466-85.
- HELWEG-LARSEN, J. (2004). *Pneumocystis jiroveci*. Applied molecular microbiology, epidemiology and diagnosis. *Dan Med Bull* 51 (3): 251-73.

- HELWEG-LARSEN, J., BENFIELD, T. L., EUGEN-OLSEN, J., LUNDGREN, J. D., LUNDGREN, B. (1999). Effects of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of AIDS-associated *P. carinii* pneumonia. *Lancet* 354 (9187): 1347-51.
- HELWEG-LARSEN, J., EUGEN-OLSEN, J., LUNDGREN, B. (2000). Rapid detection of dihydropteroate polymorphism in AIDS-related *Pneumocystis carinii* pneumonia by restriction fragment length polymorphism. *Scand J Infect Dis* 32 (5): 481-3.
- HELWEG-LARSEN, J., JENSEN, J. S., BENFIELD, T., SVENDSEN, U. G., LUNDGREN, J. D., LUNDGREN, B. (1998). Diagnostic use of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in oral wash samples. *J Clin Microbiol* 36 (7): 2068-72.
- HELWEG-LARSEN, J., JENSEN, J. S., LUNDGREN, B. (1997). Non-invasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in haematological patients using PCR on oral washes. *J Eukaryot Microbiol* 44 (6): 59S.
- HELWEG-LARSEN, J., JENSEN, J. S., LUNDGREN, B. (1997a). Non-invasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by PCR on oral washes. *Lancet* 350 (9088): 1363.
- HELWEG-LARSEN, J., LEE, C. H., JIN, S., HSUEH, J. Y., BENFIELD, T. L., HANSEN, J., LUNDGREN, J. D., LUNDGREN, B. (2001). Clinical correlation of variations in the internal transcribed spacer regions of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis*. *AIDS* 15 (4): 451-9.
- HELWEG-LARSEN, J., LUNDGREN, B., LUNDGREN, J. D. (2001a). Heterogeneity and compartmentalization of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* genotypes in autopsy lungs. *J Clin Microbiol* 39 (10): 3789-92.
- HELWEG-LARSEN, J., TSOLAKI, A. G., MILLER, R. F., LUNDGREN, B., WAKEFIELD, A. E. (1998a). Clusters of *Pneumocystis carinii* pneumonia: analysis of person-to-person transmission by genotyping. *QJM* 91 (12): 813-20.

- HENNESSEY, N. P., PARRO, E. L., COCKERELL, C. J. (1991). Cutaneous *Pneumocystis carinii* infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Arch Dermatol* 127 (11): 1699-701.
- HOCKER, B., WENDT, C., NAHIMANA, A., TONSHOFF, B., HAUSER, P. M. (2005). Molecular evidence of *Pneumocystis* transmission in pediatric transplant unit. *Emerg Infect Dis* 11 (2): 330-2.
- HOLTEN-ANDERSEN, W., KOLMOS, H. J. (1989). Comparison of methenamina silver nitrate and Giemsa stain for detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens from HIV infected patients. *APMIS* 97 (8): 745-7.
- HOSOYA, N., TAKAHASHI, T., WADA, M., ENDO, T., NAKAMURA, T., SAKASHITA, H., KIMURA, K., OHNISHI, K., NAKAMURA, Y., MIZUOCHI, T., IWAMOTO, A. (2000). Genotyping of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *Microbiol Immunol* 44 (7): 591-6.
- 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 (4): 1192-8.
- HUANG, L., CROTHERS, K., MORRIS, A., GRONER, G., FOX, M., TURNER, J. R., MERRIFIELD, C., EISER, S., ZUCCHI, P., BEARD, C. B. (2003). *Pneumocystis* colonization in HIV-infected patients. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl : 616-7.
- HUANG, L., FRIEDLY, J., MORRIS, A. M., CARTER, J. L., TURNER, J. R., MERRIFIELD, C., NAVIN, T. R., BEARD, C. B. (2001). *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase genotypes in HIV-infected persons residing in San Francisco: possible implications for disease transmission. *J Eukaryot Microbiol* Suppl : 137S-138S.

- HUGHES, W. T. (1982). Natural mode of acquisition for de novo infection with *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 145 (6): 842-8.
- HUGHES, W. T. (1994). Clinical manifestations in children. In: *Pneumocystis carinii* Pneumonia., 2ª edição. Walzer P. D. (Editor). New York, Marcel Dekker: pp. 319-29.
- HUGHES, W. T., FELDMAN, S., CHAUDHARY, S. C., OSSI, M. J., COX, F., SANYAL, S. K. (1978). Comparison of pentamidine isethionate and trimethoprim-sulfamethoxazole in the treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Pediatr* 92 (2): 285-91.
- HUGHES, W. T., KUHN, S., CHAUDHARY, S., FELDMAN, S., VERZOSA, M., AUR, R. J., PRATT, C., GEORGE, S. L. (1977). Successful chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *N Engl J Med* 297 (26): 1419-26.
- HUGHES, W. T., MCNABB, P. C., MAKRES, T. D., FELDMAN, S. (1974). Efficacy of trimethoprim and sulfamethoxazole in the prevention and treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *Antimicrob Agents Chemother* 5 (3): 289-93.
- HUGHES, W., LEOUNG, G., KRAMER, F., BOZZETTE, S. A., SAFRIN, S., FRAME, P., CLUMECK, N., MASUR, H., LANCASTER, D., CHAN, C., LAVELLE, J., ROSENSTOCK, J., FALLOON, J., FEINBERG, J., LAFON, S., ROGERS, M., SATTLER, F. (1993). Comparison of atovaquone (566C80) with trimethoprim-sulfamethoxazole to treat *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS. *N Engl J Med* 328 (21): 1521-7.
- HUGOT, J. P., DEMANCHE, C., BARRIEL, V., DEI-CAS, E., GUILLOT, J. (2003). Phylogenetic systematics and evolution of primate-derived *Pneumocystis* based on mitochondrial or nuclear DNA sequence comparison. *Syst Biol* 52 (6): 735-44.
- HUOVINEN, P. (2001). Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole. *Clin Infect Dis* 32 (11): 1608-14.

- HUOVINEN, P., SUNDSTROM, L., SWEDBERG, G., SKOLD, O. (1995). Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 39 (2): 279-89.
- ICENHOUR, C. R., REBHOLZ S. L., COLLINS, M. S., CUSHION, M. T. (2002). Early acquisition of *Pneumocystis carinii* in neonatal rats as evidenced by PCR and oral swabs. *Eukaryot Cell* 1 (3): 414-9.
- ICENHOUR, C. R., REBHOLZ, S. L., COLLINS, M. S., CUSHION, M. T. (2001). Widespread occurrence of *Pneumocystis carinii* in commercial rat colonies detected using targeted PCR and oral swabs. *J Clin Microbiol* 39 (10): 3437-41.
- IKEOGU, M. O., WOLF, B., MATHE, S. (1997). Pulmonary manifestations in HIV seropositivity and malnutrition in Zimbabwe. *Arch Dis Child* 76 (2): 124-8.
- ILIADES, P., MESHNICK S. R., MACREADIE I. G. (2005). Analysis of *Pneumocystis jirovecii* DHPS alleles implicated in sulfamethoxazole resistance using an *Escherichia coli* model system. *Microb Drug Resist* 11 (1): 1-8.
- ILIADES, P., MESHNICK, S. R., MACREADIE, I. G. (2004). Dihydropteroate synthase mutations in *Pneumocystis jirovecii* can affect sulfamethoxazole resistance in a *Saccharomyces cerevisiae* model. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (7): 2617-23.
- ILIADES, P., MESHNICK, S. R., MACREADIE, I. G. (2005a). Mutations in the *Pneumocystis jirovecii* DHPS gene confer cross-resistance to sulfa drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 49 (2): 741-8.
- ILIADES, P., WALKER, D. J., CASTELLI, L., SATCHELL, J., MESHNICK, S. R., MACREADIE, I. G. (2004a). Cloning of the *Pneumocystis jirovecii* trifunctional FAS gene and complementation of its DHPS activity in *Escherichia coli*. *Fungal Genet Biol* 41 (12): 1053-62.

- ITTARAT, I., ASAWAMAHASAKDA, W., BARTLETT, M. S., SMITH, J. W., MESHNICK, S. R. (1995). Effects of atovaquone and other inhibitors on *Pneumocystis carinii* dihydroorotate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother* 39 (2): 325-8.
- IVÁDY, G., PÁLDY, L. (1958). A new method of treating interstitial plasma cell pneumonia in premature infant with 5-valent antimony & aromatic diamidines. *Monatsschr Kinderheilkd* 106 (1): 10-4.
- JACOBS, J. L., LIBBY, D. M., WINTERS, R. A., GELMONT, D. M., FRIED, E. D., HARTMAN, B. J., LAURENCE, J. (1991). A cluster of *Pneumocystis carinii* pneumonia in adults without predisposing illnesses. *N Engl J Med* 324 (4): 246-50.
- JULES-ELYSEE, K. M., STOVER, D. E., ZAMAN, M. B., BERNARD, E. M., WHITE, D. A. (1990). Aerosolized pentamidine: effect on diagnosis and presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Ann Intern Med* 112 (10): 750-7.
- KAGAWA, F. T., KIRSCH, C. M., YENOKIDA, G. G., LEVINE, M. L. (1988). Serum lactate dehydrogenase activity in patients with AIDS and *Pneumocystis carinii* pneumonia. An adjunct to diagnosis. *Chest* 94 (5): 1031-3.
- KAI, M., MATSUOKA, M., NAKATA, N., MAEDA, S., GIDOH, M., MAEDA, Y., HASHIMOTO, KOBAYASHI, K., KASHIWABARA, Y. (1999). Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. *FEMS Microbiol Lett* 177 (2): 231-5.
- KAMANFU, G., MLIKA-CABANNE, N., GIRARD, P. M., NIMUBONA, S., MPFIZI, B., CISHAKO, A., ROUX, P., COULAUD, J. P., LAROUZE, B., AUBRY P.(1993). Pulmonary complications of human immunodeficiency virus infection in Bujumbura, Burundi. *Am Rev Respir Dis* 147 (3): 658-63.

- KANESHIRO, E. S., AMIT, Z., CHANDRA, J., BAUGHMAN, R. P., CONTINI, C., LUNDGREN, B. (1999). Sterols of *Pneumocystis carinii hominis* organisms isolated from human lungs. *Clin Diagn Lab Immunol* 6 (6): 970-6.
- KAPLAN, J. E., HANSON, D. L., NAVIN, T. R., JONES, J. L. (1998). Risk factors for primary *Pneumocystis carinii* pneumonia in human immunodeficiency virus-infected adolescents and adults in the United States: reassessment of indications for chemoprophylaxis. *J Infect Dis* 178 (4): 1126-32.
- KAPLAN, J. E., HANSON, D., DWORKIN, M. S., FREDERICK, T., BERTOLLI, J., LINDEGREN, M. L., HOLMBERG, S., JONES, J. L. (2000). Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis* 30 Suppl 1 : S5-14.
- KAPLAN, J. E., MASUR, H., HOLMES, K. K. (2002). Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons-2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *MMWR Recomm Rep* 51 (RR-8): 1-52.
- KATTAN, M., PLATZKER, A., MELLINS, R. B., SCHLUCHTER, M. D., CHEN, X. C., PEAVY, H., STEINBACH, S., WOHL, M. E., HIATT, P., HUNTER, J., COLIN, A. A. (2001). Respiratory diseases in the first year of life in children born to HIV-1-infected women. *Pediatr Pulmonol* 31 (4): 267-76.
- KAZANJIAN, P. H., FISK, D., ARMSTRONG, W., SHULIN, Q., LIWEI, H., KE, Z., MESHNICK, S. (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 (9): 1684-7.
- KAZANJIAN, P., ARMSTRONG, W., HOSSLER, P. A., BURMAN, W., RICHARDSON, J., LEE, C. H., CRANE, L., KATZ, J., MESHNICK, S. R. (2000). *Pneumocystis carinii* mutations are

- associated with duration of sulfa or sulfone prophylaxis exposure in AIDS patients. *J Infect Dis* 182 (2): 551-7.
- KAZANJIAN, P., LOCKE, A. B., HOSSLER, P. A., LANE, B. R., BARTLETT, M. S., SMITH, J. W., CANNON, M., MESHNICK, S. R. (1998). *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. *AIDS* 12 (8): 873-8.
- KEELY, S. P., BAUGHMAN, R. P., SMULIAN, A. G., DOHN, M. N., STRINGER, J. R. (1996). Source of *Pneumocystis carinii* in recurrent episodes of pneumonia in AIDS patients. *AIDS* 10 (8): 881-8.
- KEELY, S. P., STRINGER, J. R. (1996). Multi-locus genotype switching in *Pneumocystis carinii* sp. f. *hominis*: evidence for reinfection. *J Eukaryot Microbiol* 43 (5): 50S.
- KEELY, S. P., STRINGER, J. R. (1997). Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. *J Clin Microbiol* 35 (11): 2745-7.
- KEELY, S. P., STRINGER, J. R., BAUGHMAN, R. P., LINKE, M. J., WALZER, P. D., SMULIAN, A. G. (1995). Genetic variation among *Pneumocystis carinii hominis* isolates in recurrent pneumocystosis. *J Infect Dis* 172 (2): 595-8.
- KENNEDY, C. A., GOETZ, M. B. (1992). Atypical roentgenographic manifestations of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Arch Intern Med* 152 (7): 1390-8.
- KHALIL, I, RONN, A. M., ALIFRANGIS, M., GABAR, H. A., SATTI, G. M. H., BYGBJERG, B. C. (2003). Dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genotypes associated with *in vitro* resistance of *Plasmodium falciparum* to pyrimethamine, trimethoprim, sulfadoxine, and sulfamethoxazole. *Am J Trop Med Hyg* 68 (5): 586-589.

- KINCHEN, K., KINCHEN, T. H., INGLESBY, T. JR. (1998). *Pneumocystis carinii* infection of the small intestine. *J Natl Med Assoc* 90 (10): 625-7.
- KIRK, O., LUNDGREN, J. D., PEDERSEN, C., NIELSEN, H., GERSTOFT, J. (1999). Can chemoprophylaxis against opportunistic infections be discontinued after an increase in CD4 cells induced by highly active antiretroviral therapy? *AIDS* 13 (13): 1647-51.
- KITADA, K., OKA, S., KIMURA, S., SHIMADA, K., NAKAMURA, Y. (1991). Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by 5S ribosomal DNA amplification. *J Protozool* 38 (6): 90S-91S.
- KITADA, K., OKA, S., KIMURA, S., SHIMADA, K., SERIKAWA, T., YAMADA, J., TSUNOO, H., EGAWA, K., NAKAMURA, Y. (1991a). Detection of *Pneumocystis carinii* sequences by polymerase chain reaction: animal models and clinical application to noninvasive specimens. *J Clin Microbiol* 29 (9): 1985-90.
- KONDO, H., HIKITA, M., ITO, M., KADOTA, K. (2000). Immunohistochemical study of *Pneumocystis carinii* infection in pigs: evaluation of *Pneumocystis* pneumonia and a retrospective investigation. *Vet Rec* 147 (19): 544-9.
- KOVACS, J. A., ALLEGRA, C. J., BEAVER, J., BOARMAN, D., LEWIS, M., PARRILLO, J. E., CHABNER, B., MASUR, H. (1989). Characterization of de novo folate synthesis in *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*: potential for screening therapeutic agents. *J Infect Dis* 160 (2): 312-20.
- KOVACS, J. A., ALLEGRA, C. J., MASUR, H. (1990). Characterization of dihydrofolate reductase of *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*. *Exp Parasitol* 71 (1): 60-8.
- KOVACS, J. A., GILL, V. J., MESHNICK, S., MASUR, H. (2001). New insights into transmission, diagnosis, and drug treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *JAMA* 286 (19): 2450-60.

- KOVACS, J. A., GILL, V., SWAN, J. C., OGNIBENE, F., SHELFHAMER, J., PARRILLO, J. E., MASUR, H. (1986). Prospective evaluation of a monoclonal antibody in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 2 (8497): 1-3.
- KOVACS, J. A., HALPERN, J. L., LUNDGREN, B., SWAN, J. C., PARRILLO, J. E., MASUR, H. (1989a). Monoclonal antibodies to *Pneumocystis carinii*: identification of specific antigens and characterization of antigenic differences between rat and human isolates. *J Infect Dis* 159 (1): 60-70.
- KOVACS, J. A., HIEMENZ, J. W., MACHER, A. M., STOVER, D., MURRAY, H. W., SHELFHAMER, J., LANE, H. C., URMACHER, C., HONIG, C., LONGO, D. L., PARKER, M. M., NATASON, C., PARRILLO, J. E., FAUCI, A. S., PIZZO, P. A., MASUR, H. (1984). *Pneumocystis carinii* pneumonia: a comparison between patients with the acquired immunodeficiency syndrome and patients with other immunodeficiencies. *Ann Intern Med* 100 (5): 663-71.
- KOVACS, J. A., NG, V. L., MASUR, H., LEOUNG, G., HADLEY, W. K., EVANS, G., LANE, H. C., OGNIBENE, F. P., SHELFHAMER, J., PARRILLO, J. E., GILL, V. J. (1988). Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 318 (10): 589-93.
- KOVACS, J. A., POWELL, F., EDMAN, J. C., LUNDGREN, B., MARTINEZ, A., DREW, B., ANGUS, C. W. (1993). Multiple genes encode the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Biol Chem* 268 (8): 6034-40.
- LAAKKONEN, J. (1998). *Pneumocystis carinii* in wildlife. *Int J Parasitol* 28 (2): 241-52.
- LAAKKONEN, J., FISHER, R. N., CASE, T. J. (2001). Pneumocystosis in wild small mammals from California. *J Wildl Dis* 37 (2): 408-12.

- LANE, B. R., AST, J. C., HOSSLER, P. A., MINDELL, D. P., BARTLETT, M. S., SMITH, J. W., MESHNICK, S. R. (1997). Dihydropteroate synthase polymorphisms in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 175 (2): 482-5.
- LARSEN, H. H., MASUR, H., KOVACS, J. A., GILL, V. J., SILCOTT, V. A., KOGULAN, P., MAENZA, J., SMITH, M., LUCEY, D. R., FISCHER, S. H. (2002). Development and evaluation of a quantitative, touch-down, real-time PCR assay for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 40 (2): 490-4.
- LATOUCHE, S., LACUBE, P., MAURY, E., BOLOGNINI, J., DEVELOUX, M., GIRARD, P. M., GODET, C., LEBRETTE, M. G., MAYAUD, C., GUILLOT, J., ROUX, P. (2003). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in French patients with pneumocystosis: a 1998–2001 prospective study. *Med Mycol* 41 (6): 533-7.
- LATOUCHE, S., ORTONA, E., MAZARS, E., MARGUTTI, P., TAMBURRINI, E., SIRACUSANO, A., GUYOT, K., NIGOU, M., ROUX, P. (1997). Biodiversity of *Pneumocystis carinii hominis*: typing with different DNA regions. *J Clin Microbiol* 35 (2): 383-7.
- LAUTENSCHLAGER, I., LYYTIKAINEN, O., JOKIPII, L., JOKIPII, A., MAICHE, A., RUUTU, T., TUKIAINEN, P., RUUTU, P. (1996). Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. *J Clin Microbiol* 34 (3): 728-30.
- LEDERGERBER, B., MOCROFT, A., REISS, P., FURRER, H., KIRK, O., BICKEL, M., UBERTI-FOPPA, C., PRADIER, C., D'ARMINIO MONFORTE, A., SCHNEIDER, M. M., LUNDGREN, J. D. (2001). Discontinuation of secondary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection who have a response to antiretroviral therapy. Eight European Study Groups. *N Engl J Med* 344 (3): 168-74.
- LEE, C. H., HELWEG-LARSEN, J., TANG, X., JIN, S., LI, B., BARTLETT, M. S., LU, J. J., LUNDGREN, B., LUNDGREN, J. D., OLSSON, M., LUCAS, S. B., ROUX, P., CARGNEL, A.,

- ATZORI, C., MATOS, O., SMITH, J. W. (1998). Update on *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* typing based on nucleotide sequence variations in internal transcribed spacer regions of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 36 (3): 734-41.
- LEE, C. H., LU, J. J., BARTLETT, M. S., DURKIN, M. M., LIU, T. H., WANG, J., JIANG, B., SMITH, J. W. (1993). Nucleotide sequence variation in *Pneumocystis carinii* strains that infect humans. *J Clin Microbiol* 31 (3): 754-7.
- LEIBOVITZ, E., POLLACK, H., MOORE, T., PAPELLAS, J., GALLO, L., KRASINSKI, K., BORKOWSKY, W. (1995). Comparison of PCR and standard cytological staining for detection of *Pneumocystis carinii* from respiratory specimens from patients with or at high risk for infection by human immunodeficiency virus. *J Clin Microbiol* 33 (11): 3004-7.
- LEIBOVITZ, E., POLLACK, H., RIGAUD, M., KAUL, A., PERSAUD, D., GALLO, L., PAPELLAS, J., KRASINSKI, K., BORKOWSKY, W. (1995a). Polymerase chain reaction is more sensitive than standard cytologic stains in detecting *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavages from human immunodeficiency virus type 1-infected infants and children with pneumonia. *Pediatr Infect Dis J* 14 (8): 714-6.
- LEIGH, T. R., KANGRO, H. O., GAZZARD, B. G., JEFFRIES, D. J., COLLINS, J. V. (1993). DNA amplification by the polymerase chain reaction to detect sub-clinical *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-positive and HIV-negative male homosexuals with and without respiratory symptoms. *Respir Med* 87 (7): 525-9.
- LEIGH, T. R., MILLETT, M. J., JAMESON, B., COLLINS, J. V. (1993a). Serum titres of *Pneumocystis carinii* antibody in health care workers caring for patients with AIDS. *Thorax* 48 (6): 619-21.
- LEIGH, T. R., WAKEFIELD, A. E., PETERS, S. E., HOPKIN, J. M., COLLINS, J. V. (1992). Comparison of DNA amplification and immunofluorescence for detecting

- Pneumocystis carinii* in patients receiving immunosuppressive therapy. *Transplantation* 54 (3): 468-70.
- LI, J., EDLIND, T. (1994). Phylogeny of *Pneumocystis carinii* based on beta-tubulin sequence. *J Eukaryot Microbiol* 41 (5): 97S.
- LIDMAN, C., OLSSON, M., BJORKMAN, A., ELVIN, K. (1997). No evidence of nosocomial *Pneumocystis carinii* infection via health care personnel. *Scand J Infect Dis* 29 (1): 63-4.
- LINDER, E., ELVIN, K., BJORKMAN, A., BERGDAHL, S., MORFELDT-MANSSON, L., MOBERG, L., SONNERBORG, A. (1986). Monoclonal antibody to detect *Pneumocystis carinii*. *Lancet* 2 (8507): 634.
- LINKE, M. J., SMULIAN, A. G., YOSHIHARA, P., WALZER, P. D. (1994). Production and characterization of monoclonal antibodies specific for the major surface glycoprotein of *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 41 (5): 99S-100S.
- LIPSCHIK, G. Y., GILL, V. J., LUNDGREN, J. D., ANDRAWIS, V. A., NELSON, N. A., NIELSEN, J. O., OGNIBENE, F. P., KOVACS, J. A. (1992). Improved diagnosis of *Pneumocystis carinii* infection by polymerase chain reaction on induced sputum and blood. *Lancet* 340 (8813): 203-6.
- LIPSCHIK, G. Y., MASUR, H., KOVACS, J. A. (1991). Polyamine metabolism in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 163 (5): 1121-7.
- LIU, Y., LEIBOWITZ M. J. (1993). Variation and in vitro splicing of group I introns in rRNA genes of *Pneumocystis carinii*. *Nucleic Acids Res* 21 (10): 2415-21.
- LOBETTI, R. (2000). Common variable immunodeficiency in miniature dachshunds affected with *Pneumonocystis carinii* pneumonia. *J Vet Diagn Invest* 12 (1): 39-45.

- LOPEZ BERNALDO DE QUIROS, J. C., MIRO, J. M., PENA, J. M., PODZAMCZER, D., ALBERDI, J. C., MARTINEZ, E., COSIN, J., CLARAMONTE, X., GONZALEZ, J., DOMINGO, P., CASADO, J. L., RIBERA, E. (2001). 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. Grupo de Estudio del SIDA 04/98. *N Engl J Med* 344 (3): 159-67.
- LU, J. J., BARTLETT, M. S., SHAW, M. M., QUEENER, S. F., SMITH, J. W., ORTIZ-RIVERA, M., LEIBOWITZ, M. J., LEE, C. H. (1994). Typing of *Pneumocystis carinii* strains that infect humans based on nucleotide sequence variations of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 32 (12): 2904-12.
- LUBIS, N., BAYLIS, D., SHORT, A., STEBBING, J., TEAGUE, A., PORTSMOUTH, S., BOWER, M., NELSON, M., GAZZARD, B. (2003). Prospective cohort study showing changes in the monthly incidence of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Postgrad Med J* 79 (929): 164-6.
- LUCAS, A. R. V. O. (2004). Estudo da diversidade genética das regiões ITS do ARNr de isolados de *Pneumocystis jirovecii* provenientes de doentes imunocomprometidos. Tese de dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Parasitologia Médica, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 267 pp.
- LUCAS, S. B., PEACOCK, C. S., HOUNNOU, A., BRATTEGAARD, K., KOFFI, K., HONDE, M., ANDOH, J., BELL, J., DE COCK, K. M. (1996). Disease in children infected with HIV in Abidjan, Cote d'Ivoire. *BMJ* 312 (7027): 335-8.
- LUMBIGANON, P., KOSALARAKSA, P., LOAPAIBOON, M. (2000). Survival of children with AIDS: experience in a university hospital in northeast Thailand. *J Med Assoc Thai* 83 (6): 652-6.

- LUNDGREN, B., ELVIN, K., ROTHMAN, L. P., LJUNGSTROM, I., LIDMAN, C., LUNDGREN, J. D. (1997). Transmission of *Pneumocystis carinii* from patients to hospital staff. *Thorax* 52 (5): 422-4.
- LUNDGREN, B., WAKEFIELD, A. E. (1998). PCR for detecting *Pneumocystis carinii* in clinical or environmental samples. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22 (1-2) : 97-101.
- MA, L., BORIO, L., MASUR, H., KOVACS, J. A. (1999). *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase but not dihydrofolate reductase gene mutations correlate with prior trimethoprim-sulfamethoxazole or dapsone use. *J Infect Dis* 180 (6): 1969-78.
- MA, L., IMAMICHI, H., SUKURA, A., KOVACS, J. A. (2001). Genetic divergence of the dihydrofolate reductase and dihydropteroate synthase genes in *Pneumocystis carinii* from 7 different host species. *J Infect Dis* 184 (10): 1358-62.
- MA, L., KOVACS, J. A. (2000). Expression and characterization of recombinant human-derived *Pneumocystis carinii* dihydrofolate reductase. *Antimicrob Agents Chemother* 44 (11): 3092-6.
- MA, L., KOVACS, J. A. (2001). 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* 45 (11): 3213-5.
- MA, L., KOVACS, J. A., CARGNEL, A., VALERIO, A., FANTONI, G., ATZORI, C. (2002). 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* 185 (10): 1530-2.
- MA, L., KUTTY, G., JIA, Q., IMAMICHI, H., HUANG, L., ATZORI, C., BECKERS, P., GRONER, G., BEARD, C. B., KOVACS, J. A. (2002a). Analysis of variation in tandem repeats in the

- intron of the major surface glycoprotein expression site of the human form of *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 186 (11): 1647-54.
- MACNEILL, A. L., ALLEMAN, A. R., FRANKLIN, R. P., LONG, M., GIGUERE, S., UHL, E., LOPEZ-MARTINEZ, A., WILKERSON, M. (2003). Pneumonia in a Paso-Fino mare. *Vet Clin Pathol* 32 (2): 73-6.
- MADHI, S. A., CUTLAND, C., ISMAIL, K., O'REILLY, C., MANCHA, A., KLUGMAN, K. P. (2002). Ineffectiveness of trimethoprim-sulfamethoxazole prophylaxis and the importance of bacterial and viral coinfections in African children with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Clin Infect Dis* 35 (9): 1120-6.
- MALIN, A. S., GWANZURA, L. K., KLEIN, S., ROBERTSON, V. J., MUSVAIRE, P., MASON, P. R. (1995). *Pneumocystis carinii* pneumonia in Zimbabwe. *Lancet* 346 (8985): 1258-61.
- MANFREDI, R., SALFI, N., PASQUINELLI, G., CHIODO, F. (1998). Lymph node dissemination of a serious *Pneumocystis carinii* respiratory infection in AIDS: histopathological and ultrastructural aspects. *Pathologica* 90 (4): 383-7.
- MARTIN, J. N., ROSE, D. A., HADLEY, W. K., PERDREAU-REMYNTO, F., LAM, P. K., GERBERDING, J. L. (1999). Emergence of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in the AIDS era. *J Infect Dis* 180 (6): 1809-18.
- MASKELL J. P., SEFTON, A. M., HALL, L. M. (2001). Multiple mutations modulate the function of dihydrofolate reductase in trimethoprim-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45 (4): 1104-8.
- MASKELL, N. A., WAINE, D. J., LINDLEY, A., PEPPERELL, J. C., WAKEFIELD, A. E., MILLER, R. F., DAVIES, R. J. (2003). Asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in subjects undergoing bronchoscopy: a prospective study. *Thorax* 58 (7): 594-7.

- MASUR, H. (1992). Prophylaxis and therapy for *Pneumocystis pneumonia*-where are we? *Infect Agents Dis* 1 (5): 270-8.
- MASUR, H., KAPLAN, J. E., HOLMES, K. K. (2002). Guidelines for preventing opportunistic infections among HIV-infected persons—2002. Recommendations of the U.S. Public Health Service and the Infectious Diseases Society of America. *Ann Intern Med* 137 (5 Pt 2): 435-78.
- MASUR, H., MICHELIS, M. A., GREENE, J. B., ONORATO, I., STOUWE, R. A., HOLZMAN, R. S., WORMSER, G., BRETTMAN, L., LANGE, M., MURRAY, H. W., CUNNINGHAM-RUNDLES, S. (1981). An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N Engl J Med* 305 (24): 1431-8.
- MATOS, O. M. G. (1999). Epidemiologia e diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis carinii*. Contribuição para a valiação de técnicas de biologia molecular aplicadas ao diagnóstico da pneumocistose. Tese de dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Ciências Biomédicas, Universidade Nova de Lisboa, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, 267 pp.
- MATOS, O., AZEVEDO, P., CALDEIRA, L., MENDES, A. C., ARAÚJO, A. T., FORTE, M., ANTUNES, F. (1995). Estudo comparativo de três métodos morfológicos para diagnóstico da pneumonia por *Pneumocystis carinii* (PPC) em infectados por vírus da imunodeficiência humana (VIH). *Rev Port Doenças Infec* 18: 135-8.
- MATOS, O., COSTA, M. C., CORREIA, I., MONTEIRO, P., MONTEIRO, M., SOARES, J., VIEIRA, J. R., BONNET, M., ANTUNES, F. (2003). *Pneumocystis jirovecii* carriage in Portuguese immunocompetent patients: preliminary results. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl : 647-8.
- MATOS, O., COSTA, M. C., LUNDGREN, B., CALDEIRA, L., AGUIAR, P., ANTUNES, F. (2001). Effect of oral washes on the diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia with a low

- parasite burden and on detection of organisms in subclinical infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20 (8): 573-5.
- MATOS, O., LEE, C. H., JIN, S., LI, B., COSTA, M. C., GONCALVES, L., ANTUNES, F. (2003a). *Pneumocystis jiroveci* in Portuguese immunocompromised patients: association of specific ITS genotypes with treatment failure, bad clinical outcome and childhood. *Infect Genet Evol* 3 (4): 281-5.
- MATOS, O., LUNDGREN, B., CALDEIRA, L., MANSINHO, K., AGUIAR, P., FORTE, M., ANTUNES, F. (1999). Evaluation of a nested PCR for detection of *Pneumocystis carinii* in serum from immunocompromised patients. *J Eukaryot Microbiol* 46 (5): 104S-5S.
- MATOS, O., LUNDGREN, B., CALDEIRA, L., MANSINHO, K., AGUIAR, P., FORTE, M., ANTUNES, F. (2000). Evaluation of two nested polymerase chain reactions for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 6 (3): 149-51.
- MATSUMOTO, Y., YOSHIDA, Y. (1984). Sporogony in *Pneumocystis carinii*: synaptonemal complexes and meiotic nuclear divisions observed in precysts. *J Protozool* 31 (3): 420-8.
- MATSUMOTO, Y., YOSHIDA, Y. (1986). Advances in *Pneumocystis* biology. *Parasitol Today* 2 (5): 137-42.
- MAYAUD, C., TOUBOUL, J. L., FOURET, P., MERLIER, J., LANCASTRE, F., AKOUN, G. (1986). Clinical aspects and treatment of *Pneumocystis carinii* infections. *Ann Med Interne (Paris)* 137 (1): 51-6.
- MAZARS, E., DEI-CAS, E. (1998). Epidemiological and taxonomic impact of *Pneumocystis* biodiversity. *FEMS Immunol Med Microbiol* 22 (1-2): 75-80.

- MAZARS, E., GUYOT, K., DURAND, I., DEI-CAS, E., BOUCHER, S., ABDERRAZAK, S. B., BANULS, A. L., TIBAYRENC, M., CAMUS, D. (1997). Isoenzyme diversity in *Pneumocystis carinii* from rats, mice, and rabbits. *J Infect Dis* 175 (3): 655-60.
- MAZARS, E., HERBECQ, S., SZYPURA, A. S., FRUIT, J., CAMUS, D., DEI-CAS, E. (1996). *Pneumocystis carinii* detection in 158 HIV-seronegative patients. *J Eukaryot Microbiol* 43 (5): 28S.
- MCLAUCHLIN, J., AMAR, C., PEDRAZA-DÍAZ, S., NICHOLS, G.L. (2000). Molecular epidemiological analysis of *Cryptosporidium* spp. in the United Kingdom: results of genotyping *Cryptosporidium* spp. in 1.705 fecal samples from humans and 105 fecal samples from livestock animals. *J Clin Microbiol*, 38 (11): 3984-90.
- MCLEOD, D. T., NEILL, P., GWANZURA, L., LATIF, A. S., EMMANUEL, J. C., NKANZA, N., LUCAS, S. B. (1990). *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS in Central Africa. *Respir Med* 84 (3): 225-8.
- MENON, S. J., GRAVES, D. C., KOSANKE, S. D., MOYER, M. J., IVEY, M. H. (1988). *Pneumocystis carinii* antigen detection in rat serum and lung lavage. *J Clin Microbiol* 26 (9): 1763-71.
- MENON, S. J., JEENA, P. M., LALLOO, U., NYAMANDE, K., GAJEE, K., STURM, A. W., GOLDBLATT, D., TOMKINS, A. M., COOVADIA, H. M. (2005). Probable mother to infant transmission of *Pneumocystis jirovecii* from an HIV-infected woman to her HIV-uninfected infant. *AIDS* 19 (14): 1548-9.
- MEADE, J. C., STRINGER, J. R. (1991). PCR amplification of DNA sequences from the transcription factor IID and cation transporting ATPase genes in *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 38 (6): 66S-68S.

- MEADE, J. C., STRINGER, J. R. (1995). Cloning and characterization of an ATPase gene from *Pneumocystis carinii* which closely resembles fungal H⁺ ATPases. *J Eukaryot Microbiol* 42 (3): 298-307.
- MEDINA, I., MILLS, J., LEOUNG, G., HOPEWELL, P. C., LEE, B., MODIN, G., BENOWITZ, N., WOFSY, C. B. (1990). Oral therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A controlled trial of trimethoprim-sulfamethoxazole versus trimethoprim-dapsone. *N Engl J Med* 323 (12): 776-82.
- MEDRANO, F. J., MONTES-CANO, M., CONDE, M., DE LA HORRA, C., RESPALDIZA, N., GASCH, A., PEREZ-LOZANO, M. J., VARELA, J. M., CALDERON, E. J. (2005). *Pneumocystis jirovecii* in general population. *Emerg Infect Dis* 11 (2): 245-50.
- MEI, Q., GURUNATHAN, S., MASUR, H., KOVACS, J. A. (1998). Failure of co-trimoxazole in *Pneumocystis carinii* infection and mutations in dihydropteroate synthase gene. *Lancet* 351 (9116): 1631-2.
- MENEAU, I., SANGLARD, D., BILLE, J., HAUSER, P. M. (2003). Site-directed mutagenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* dihydropteroate synthase FOL1 gene to study *Pneumocystis jirovecii* mutations in the orthologue gene FAS. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl : 652-3.
- MENEAU, I., SANGLARD, D., BILLE, J., HAUSER, P. M. (2004). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase polymorphisms confer resistance to sulfadoxine and sulfanilamide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (7): 2610-6.
- MERALI, S., CLARKSON, A. B. JR. (2004). S-adenosylmethionine and *Pneumocystis*. *FEMS Microbiol Lett* 237 (2): 179-86.

- MERALI, S., VARGAS, D., FRANKLIN, M., CLARKSON, A. B. JR. (2000). S-adenosylmethionine and *Pneumocystis carinii*. *J Biol Chem* 275 (20): 14958-63.
- MESHNICK, S. R., HOSSLER, P. A., ENGER, K. S., KAZANJIAN, P., REST, J. S., MINDELL, D., LI, B., LEE, C. H., NIMRI, L. F., CARTER, J. L., BEARD, C. B., HUANG, L. (2001). Distribution of DHPS mutations among ITS subtypes of *P. carinii* f. sp. *hominis*. *J Eukaryot Microbiol Suppl* : 126S-128S.
- MEUWISSEN, J. H., TAUBER, I., LEEUWENBERG, A. D., BECKERS, P. J., SIEBEN, M. (1977). Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J Infect Dis* 136 (1): 43-9.
- MICHALANY, J., MATTOS, A. L., MICHALANY, N. S., FILIE, A. C., MONTEZZO, L. C. (1987). Acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in Brazil. Necropsy findings. *Ann Pathol* 7 (1): 15-24.
- MILLER, R. F., AMBROSE, H. E., NOVELLI, V., WAKEFIELD, A. E. (2002). Probable mother-to-infant transmission of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* infection. *J Clin Microbiol* 40 (4): 1555-7.
- MILLER, R. F., AMBROSE, H. E., WAKEFIELD, A. E. (2001). *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* DNA in immunocompetent health care workers in contact with patients with *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 39 (11): 3877-82.
- MILLER, R. F., GRANT, A. D., FOLEY, N. M. (1992). Seasonal variation in presentation of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 339 (8795): 747-8.
- MILLER, R. F., LINDLEY, A. R., AMBROSE, H. E., ALIOUAT-DENIS, C. M., WAKEFIELD, A. E. (2003). Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* from adult HIV-infected patients with *Pneumocystis* pneumonia. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl : 654-5.

- MILLER, R. F., LINDLEY, A. R., AMBROSE, H. E., MALIN, A. S., WAKEFIELD, A. E. (2003a). Genotypes of *Pneumocystis jiroveci* isolates obtained in Harare, Zimbabwe, and London, United Kingdom. *Antimicrob Agents Chemother* 47 (12): 3979-81.
- MILLER, R. F., WAKEFIELD, A. E. (1999). *Pneumocystis carinii* genotypes and severity of pneumonia. *Lancet* 353 (9169): 2039-40.
- MOCROFT, A., KATLAMA, C., JOHNSON, A. M., PRADIER, C., ANTUNES, F., MULCAHY, F., CHIESI, A., PHILLIPS, A., KIRK, O., LUNDGREN, J. (2000). AIDS across Europe, 1994-98: the EuroSIDA study. *Lancet* 356 (9226): 291-6.
- MOE, A. A., HARDY, W. D. (1994). *Pneumocystis carinii* infection in the HIV-seropositive patient. *Infect Dis Clin North Am* 8 (2): 331-64.
- MOHAR, A., ROMO, J., SALIDO, F., JESSURUN, J., PONCE DE LEON, S., REYES, E., VOLKOW, P., LARRAZA, O., PEREDO, M. A., CANO, C., GOMEZ, G., SEPULVEDA, J., MUELLER, N. (1992). The spectrum of clinical and pathological manifestations of AIDS in a consecutive series of autopsied patients in Mexico. *AIDS* 6 (5): 467-73.
- MORGAN, D. J., VARGAS, S. L., REYES-MUGICA, M., WALTERSPIEL, J. N., CARVER, W., GIGLIOTTI, F. (2001). Identification of *Pneumocystis carinii* in the lungs of infants dying of sudden infant death syndrome. *Pediatr Infect Dis J* 20 (3): 306-9.
- MORRIS, A. M., SWANSON, M., HÁ, H., HUANG, L. (2000). Geographic distribution of human immunodeficiency virus-associated *Pneumocystis carinii* pneumonia in San Francisco. *Am J Respir Crit Care Med* 162 (5): 1622-6.
- 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 (10): 1713-20.

- MORTIER, E., POUCHOT, J., BOSSI, P., MOLINIE, V. (1995). Maternal-fetal transmission of *Pneumocystis carinii* in human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 332 (12): 825.
- MUSSINI, C., PEZZOTTI, P., GOVONI, A., BORGHI, V., ANTINORI, A., D'ARMINIO MONFORTE, A., DE LUCA, A., MONGIARDO, N., CERRI, M. C., CHIODO, F., CONCIA, E., BONAZZI, L., MORONI, M., ORTONA, L., ESPOSITO, R., COSSARIZZA, A., DE RIENZO, B. (2000). Discontinuation of primary prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia and toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus type I-infected patients: the changes in opportunistic prophylaxis study. *J Infect Dis* 181 (5): 1635-42.
- NAHIMANA, A., FRANCIOLI, P., BLANC, D. S., BILLE, J., WAKEFIELD, A. E., HAUSER, P. M. (2000). Determination of the copy number of the nuclear rDNA and beta-tubulin genes of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* using PCR multicompetitors. *J Eukaryot Microbiol* 47 (4): 368-72.
- NAHIMANA, A., RABODONIRINA, M., BILLE, J., FRANCIOLI, P., HAUSER, P. M. (2004). Mutations of *Pneumocystis jirovecii* dihydrofolate reductase associated with failure of prophylaxis. *Antimicrob Agents Chemother* 48 (11): 4301-5.
- NAHIMANA, A., RABODONIRINA, M., HELWEG-LARSEN, J., MENEAU, I., FRANCIOLI, P., BILLE, J., HAUSER, P. M. (2003). Sulfa resistance and dihydropteroate synthase mutants in recurrent *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Emerg Infect Dis* 9 (7): 864-7.
- NAHIMANA, A., RABODONIRINA, M., ZANETTI, G., MENEAU, I., FRANCIOLI, P., BILLE, J., HAUSER, P. M. (2003a). Association between a specific *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase mutation and failure of pyrimethamine/sulfadoxine prophylaxis in human immunodeficiency virus-positive and -negative patients. *J Infect Dis* 188 (7): 1017-23.

- NAKAMURA, Y., WADA, M. (1998). Molecular pathobiology and antigenic variation of *Pneumocystis carinii*. *Adv Parasitol* 41 : 63-107.
- NAVIN, T. R., BEARD, C. B., HUANG, L., DEL RIO, C., LEE, S., PIENIAZEK, N. J., CARTER, J. L., LE, T., HIGHTOWER, A., RIMLAND, D. (2001). Effect of mutations in *Pneumocystis carinii* dihydropteroate synthase gene on outcome of *P. carinii* pneumonia in patients with HIV-1: a prospective study. *Lancet* 358 (9281): 545-9.
- NAVIN, T. R., RIMLAND, D., LENNOX, J. L., JERNIGAN, J., CETRON, M., HIGHTOWER, A., ROBERTS, J. M., KAPLAN, J. E. (2000). Risk factors for community-acquired pneumonia among persons infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* 181 (1): 158-64.
- NDAM, N. G., DUMONT, B., DEMANCHE, C., CHAPEL, A., LACUBE, P., GUILLOT, J., ROUX, P. (2003). Development of a real-time PCR-based fluorescence assay for rapid detection of point mutations in *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase gene. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl : 658-60.
- NEVEZ, G., GUYOT, K., TOTET, A., RACCURT, C., DEI-CAS, E. (2001). Pulmonary colonisation with *Pneumocystis carinii* in an immunosuppressed HIV-negative patient: detection and typing of the fungus by PCR. *J Med Microbiol* 50 (2): 198-200.
- NEVEZ, G., JOUNIEAUX, V., LINAS, M. D., GUYOT, K., LEOPHONTE, P., MASSIP, P., SCHMIT, J. L., SEGUELA, J. P., CAMUS, D., DEI-CAS, E., RACCURT, C., MAZARS, E. (1997). High frequency of *Pneumocystis carinii* sp.f. *hominis* colonization in HIV-negative patients. *J Eukaryot Microbiol* 44 (6): 36S.
- NEVEZ, G., RACCURT, C., JOUNIEAUX, V., DEI-CAS, E., MAZARS, E. (1999). Pneumocystosis versus pulmonary *Pneumocystis carinii* colonization in HIV-negative and HIV-positive patients. *AIDS* 13 (4): 535-6.

- NEVEZ, G., TOTET, A., JOUNIEAUX, V., SCHMIT, J. L., DEI-CAS, E., RACCURT, C. (2003). *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* 41 (1): 181-6.
- NG, V. L., GARTNER, I., WEYMOUTH, L. A., GOODMAN, C. D., HOPEWELL, P. C., HADLEY, W. K. (1989). The use of mucolysed induced sputum for the identification of pulmonary pathogens associated with human immunodeficiency virus infection. *Arch Pathol Lab Med* 113 (5): 488-93.
- NG, V. L., VIRANI, N. A., CHAISSON, R. E., YAJKO, D. M., SPHAR, H. T., CABRIAN, K., ROLLINS, N., CHARACHE, P., KRIEGER, M., HADLEY, W. K. (1990). Rapid detection of *Pneumocystis carinii* using a direct fluorescent monoclonal antibody stain. *J Clin Microbiol* 28 (10): 2228-33.
- NG, V. L., YAJKO, D. M., HADLEY, W. K. (1997). Extrapulmonary pneumocystosis. *Clin Microbiol Rev* 10 (3): 401-18.
- NG, V. L., YAJKO, D. M., MCPHAUL, L. W., GARTNER, I., BYFORD, B., GOODMAN, C. D., NASSOS, P. S., SANDERS, C. A., HOWES, E. L., LEOUNG, G. (1990a). Evaluation of an indirect fluorescent-antibody stain for detection of *Pneumocystis carinii* in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 28 (5): 975-9.
- NIELSEN, M. H., SETTNES, O. P., ALIOUAT, E. M., CAILLIEZ, J. C., DEI-CAS, E. (1998). Different ultrastructural morphology of *Pneumocystis carinii* derived from mice, rats, and rabbits. *APMIS* 106 (8): 771-9.
- NIMRI, L. F., MOURA, I. N., HUANG, L., DEL RIO, C., RIMLAND, D., DUCHIN, J. S., DOTSON, E. M., BEARD, C. B. (2002). Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* based on variations in nucleotide sequences of internal transcribed spacers of rRNA genes. *J Clin Microbiol* 40 (4): 1146-51.

- NZILA, A. M., MBERU, E. K., SULO, J., DAYO, H., WINSTANLEY, P. A., SIBLEY, C.H., WATKINS, W. M (2000). 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* 44 (4): 991-6.
- OKA, S., KITADA, K., KOHJIN, T., NAKAMURA, Y., KIMURA, S., SHIMADA, K. (1993). Direct monitoring as well as sensitive diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia by the polymerase chain reaction on sputum samples. *Mol Cell Probes* 7 (6): 419-24.
- OLSSON, M., ELVIN, K., LIDMAN, C., LOFDAHL, S., LINDER, E. (1996). A rapid and simple nested PCR assay for the detection of *Pneumocystis carinii* in sputum samples. *Scand J Infect Dis* 28 (6): 597-600.
- OLSSON, M., ELVIN, K., LOFDAHL, S., LINDER, E. (1993). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in sputum and bronchoalveolar lavage samples by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 31 (2): 221-6.
- OLSSON, M., LIDMAN, C., LATOUCHE, S., BJORKMAN, A., ROUX, P., LINDER, E., WAHLGREN, M. (1998). Identification of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* gene sequences in filtered air in hospital environments. *J Clin Microbiol* 36 (6): 1737-40.
- OPRAVIL, M., HIRSCHL, B., LAZZARIN, A., HEALD, A., PECHERE, M., RUTTIMANN, S., ITEN, A., VON OVERBECK, J., OERTLE, D., PRAZ G. (1995). Once-weekly administration of dapsone/pyrimethamine vs. aerosolized pentamidine as combined prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia and toxoplasmic encephalitis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis* 20 (3): 531-41.
- OPRAVIL, M., MARINCEK, B., FUCHS, W. A., WEBER, R., SPEICH, R., BATTEGAY, M., RUSSI, E. W., LUTHY, R. (1994). Shortcomings of chest radiography in detecting *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Acquir Immune Defic Syndr* 7 (1): 39-45.

- PALELLA, F. J. JR, DELANEY, K. M., MOORMAN, A. C., LOVELESS, M. O., FUHRER, J., SATTEN, G. A., ASCHMAN, D. J., HOLMBERG, S. D. (1998). Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 338 (13): 853-60.
- PATEL, S. K., PHILPOTT, J. M., MCPARTLIN, D. W. (1999). An unusual case of *Pneumocystis carinii* presenting as an aural mass. *J Laryngol Otol* 113 (6): 555-7.
- PEGLOW, S. L., SMULIAN, A. G., LINKE, M. J., POGUE, C. L., NURRE, S., CRISLER, J., PHAIR, J., GOLD, J. W., ARMSTRONG, D., WALZER, P. D. (1990). Serologic responses to *Pneumocystis carinii* antigens in health and disease. *J Infect Dis* 161 (2): 296-306.
- PEREIRA, S. A., RODRIGUES, D. B., CORREIA, D., DOS REIS, M. A., TEIXEIRA, V. P. (2002). Identification of infectious agents in the lungs in autopsies of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Rev Soc Bras Med Trop* 35 (6): 635-9.
- PERRON LEPAGE, M. F., GERBER, V., SUTER, M. M. (1999). A case of interstitial pneumonia associated with *Pneumocystis carinii* in a foal. *Vet Pathol* 36 (6): 621-4.
- PETERS, S. E., ENGLISH, K., RANA, A., AKTER, S., MALIK, S., WARBURTON, N. C., DUCKETT, J. G. (2001). Synaptonemal complexes in the pre-cyst of *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol Suppl*: 134S.
- PETERS, S. E., WAKEFIELD, A. E., SINCLAIR, K., MILLARD, P. R., HOPKIN, J. M. (1992). A search for *Pneumocystis carinii* in post-mortem lungs by DNA amplification. *J Pathol* 166 (2): 195-8.
- PETERSON, S. W., SIGLER, L. (1998). Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *J Clin Microbiol* 36 (10): 2918-25.

- PHAIR, J., MUNOZ, A., DETELS, R., KASLOW, R., RINALDO, C., SAAH, A. (1990). The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *N Engl J Med* 322 (3): 161-5.
- PIFER, L. L., WOODS, D. R., EDWARDS, C. C., JOYNER, R. E., ANDERSON, F. J., ARHEART, K. (1988). *Pneumocystis carinii* serologic study in pediatric acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Dis Child* 142 (1): 36-9.
- PITCHENIK, A. E., FISCHL, M. A., DICKINSON, G. M., BECKER, D. M., FOURNIER, A. M., O'CONNELL, M. T., COLTON, R. M., SPIRA, T. J. (1983). Opportunistic infections and Kaposi's sarcoma among Haitians: evidence of a new acquired immunodeficiency state. *Ann Intern Med* 98 (3): 277-84.
- PIXLEY, F. J., WAKEFIELD, A. E., BANERJI, S., HOPKIN, J. M. (1991). Mitochondrial gene sequences show fungal homology for *Pneumocystis carinii*. *Mol Microbiol* 5 (6): 1347-51.
- PODZAMCZER, D., SALAZAR, A., JIMENEZ, J., CONSIGLIO, E., SANTIN, M., CASANOVA, A., RUFFI, G., GUDIOL, F. (1995). Intermittent trimethoprim-sulfamethoxazole compared with dapsone-pyrimethamine for the simultaneous primary prophylaxis of *Pneumocystis* pneumonia and toxoplasmosis in patients infected with HIV. *Ann Intern Med* 122 (10): 755-61.
- PRAVEEN, C. V., TERRY, R. M., ELMAHALLAWY, M., HORSFIELD, C. (2002). *Pneumocystis carinii* infection in bilateral aural polyps in a human immunodeficiency virus-positive patient. *J Laryngol Otol* 116 (4): 288-90.
- QUIST, J., HILL, A. R. (1995). Serum lactate dehydrogenase (LDH) in *Pneumocystis carinii* pneumonia, tuberculosis, and bacterial pneumonia. *Chest* 108 (2): 415-8.

- QVARNSTROM, Y., SWEDBERG, G. (2000). Additive effects of a two aminoacid insertion and a single aminoacid substitution in dihydropteroate synthase for the development of sulfonamide resistant *Neisseria meningitidis*. *Microbiology*, 146 (Pt 5): 1151-6.
- RABODONIRINA, M., VANHEMS, P., COURAY-TARGE, S., GILLIBERT, R. P., GANNE, C., NIZARD, N., COLIN, C., FABRY, J., TOURAINE, J. L., VAN MELLE, G., NAHIMANA, A., FRANCIOLI, P., HAUSER, P. M. (2004). Molecular evidence of interhuman transmission of *Pneumocystis* pneumonia among renal transplant recipients hospitalized with HIV-infected patients. *Emerg Infect Dis* 10 (10): 1766-73.
- RESPALDIZA, N., MEDRANO, F. J., MEDRANO, A. C., VARELA, J. M., DE LA HORRA, C., MONTES-CANO, M., FERRER, S., WICHMANN, I., GARGALLO-VIOLA, D., CALDERON, E. J. (2004). High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect* 10 (11): 1029-31.
- RIBES, J. A., LIMPER, A. H., ESPY, M. J., SMITH, T. F. (1997). PCR detection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens: analysis of sensitivity and specificity. *J Clin Microbiol* 35 (4): 830-5.
- RIEBOLD, D., FRITZSCHE C., LADEMANN M., BIER A., REISINGER E. C. (2006). *Pneumocystis jiroveci* dihydropteroate synthase gene mutations at codon 171 but not at codons 55 or 57 detected in Germany. *Clin Infect Dis* 42 (4): 582-3.
- ROBERTS, 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 jirovecii* from South Africa. *J Clin Microbiol* 43 (3): 1443-4.
- ROBERTS, F. J., LIEBOWITZ, L. D., CHALKLEY, L. J. (2004). Genotyping and coalescent phylogenetic analysis of *Pneumocystis jiroveci* from South Africa. *J Clin Microbiol* 42 (4): 1505-10.

- ROSSEN, L., NORSKOV, P., HOLMSTROM, K. (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int J Food Microbiol* 17: 37-45.
- RUFFINI, D. D., MADHI, S. A. (2002). The high burden of *Pneumocystis carinii* pneumonia in African HIV-1-infected children hospitalized for severe pneumonia. *AIDS* 16 (1): 105-12.
- RUFFOLO, J. J., CUSHION, M. T., WALZER, P. D. (1989). Ultrastructural observations on life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 36 (1): 53S-4S.
- RUFFOLO, J.J. (1994). *Pneumocystis carinii* cell structure. In: *Pneumocystis carinii* pneumonia, 2ª edição. Walzer P. D. (ed.). New York, Marcel Dekker: 25-43. pp.
- SAFRIN, S., LEE, B. L., SANDE, M. A. (1994). Adjunctive folinic acid with trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS patients is associated with an increased risk of therapeutic failure and death. *J Infect Dis* 170 (4): 912-7.
- SAIKI, R. K., BUGAWAN, T. L., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A. (1986). Analysis of enzymatically β -globin and HLA-DQ ∞ DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 324 (6093): 163-6.
- SATTLER, F. R., COWAN, R., NIELSEN, D. M., RUSKIN, J. (1988). Trimethoprim-sulfamethoxazole compared with pentamidine for treatment of *Pneumocystis carinii* pneumonia in the acquired immunodeficiency syndrome. A prospective, noncrossover study. *Ann Intern Med* 109 (4): 280-7.
- SATTLER, F. R., FRAME, P., DAVIS, R., NICHOLS, L., SHELTON, B., AKIL, B., BAUGHMAN, R., HUGHLETT, C., WEISS, W., BOYLEN, C. T., VAN DER HORST, C., BLACK, J., POWDERLY, W., STEIGNIGEL, R. T., LEEDOM, J. M., MASUR, H., FEINBERG, J.(1994). Trimetrexate with leucovorin versus trimethoprim-sulfamethoxazole for moderate to severe episodes

- of *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS: a prospective, controlled multicenter investigation of the AIDS Clinical Trials Group Protocol 029/031. *J Infect Dis* 170 (1): 165-72.
- SCHMATZ, D. M., POWLES, M., MCFADDEN, D. C., PITTARELLI, L. A., LIBERATOR, P. A., ANDERSON, J. W. (1991). Treatment and prevention of *Pneumocystis carinii* pneumonia and further elucidation of the *P. carinii* life cycle with 1,3-beta-glucan synthesis inhibitor L-671,329. *J Protozool* 38 (6): 151S-153S.
- SCHNEIDER, M. M., BORLEFFS, J. C., STOLK, R. P., JASPERS, C. A., HOEPELMAN, A. I. (1999). Discontinuation of prophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-1-infected patients treated with highly active antiretroviral therapy. *Lancet* 353 (9148): 201-3.
- SCHNEIDER, M. M., HOEPELMAN, A. I., EEFTINCK SCHATTENKERK, J. K., NIELSEN, T. L., VAN DER GRAAF, Y., FRISSEN, J. P., VAN DER ENDE, I. M., KOLSTERS, A. F., BORLEFFS, J. C. (1992). A controlled trial of aerosolized pentamidine or trimethoprim-sulfamethoxazole as primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus infection. The Dutch AIDS Treatment Group. *N Engl J Med* 327 (26): 1836-41.
- SCHNEIDER, M. M., NIELSEN, T. L., NELSING, S., HOEPELMAN, A. I., EEFTINCK SCHATTENKERK, J. K., VAN DER GRAAF, Y., KOLSTERS, A. F., BORLEFFS, J. C. (1995). Efficacy and toxicity of two doses of trimethoprim-sulfamethoxazole as primary prophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with human immunodeficiency virus. Dutch AIDS Treatment Group. *J Infect Dis* 171 (6): 1632-6.
- SEPKOWITZ, K., SCHLUGER, N., GODWIN, T., ARMSTRONG, D., CERAMI, A., BUCALA, R. (1993). DNA amplification in experimental pneumocystosis: characterization of serum *Pneumocystis carinii* DNA and potential *P. carinii* carrier states. *J Infect Dis* 168 (2): 421-6.

- SHELHAMER, J. H., OGNIBENE, F. P., MACHER, A. M., TUAZON, C., STEISS, R., LONGO, D., KOVACS, J. A., PARKER, M. M., NATANSON, C., LANE, H. C., FAUCI, A. S., PARRILLO, J. E., MASUR, H. (1984). Persistence of *Pneumocystis carinii* in lung tissue of acquired immunodeficiency syndrome patients treated for *Pneumocystis* pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 130 (6): 1161-5.
- SIMONDS, R. J., OXTOBY, M. J., CALDWELL, M. B., GWINN, M. L., ROGERS, M. F. (1993). *Pneumocystis carinii* pneumonia among US children with perinatally acquired HIV infection. *JAMA* 270 (4): 470-3.
- SINCLAIR, K., WAKEFIELD, A. E., BANERJI, S., HOPKIN, J. M. (1991). *Pneumocystis carinii* organisms derived from rat and human hosts are genetically distinct. *Mol Biochem Parasitol* 45 (1): 183-4.
- SING, A., GEIGER, A. M., HOGARDT, M., HEESEMANN, J. (2001). *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *J Clin Microbiol* 39 (7): 2717-8.
- SING, A., ROGGENKAMP, A., AUTENRIETH, I. B., HEESEMANN, J. (1999). *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *J Clin Microbiol* 37 (10): 3409-10.
- SING, A., WONHAS, C., BADER, L., LUTHER, M., HEESEMANN, J. (1999a). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in the air filter of a ventilated patient with AIDS. *Clin Infect Dis* 29 (4): 952-3.
- SINGER, C., ARMSTRONG, D., ROSEN, P. P., SCHOTTENFELD, D. (1975). *Pneumocystis carinii* pneumonia: a cluster of eleven cases. *Ann Intern Med* 82 (6): 772-7.

- SKELLY, M., HOFFMAN, J., FABBRI, M., HOLZMAN, R. S., CLARKSON, A. B. JR, MERALI, S. (2003). S-adenosylmethionine concentrations in diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 361 (9365): 1267-8.
- SKOLD, O. (2000). Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates* 3 (3): 155-60.
- SLAVEN, B. ER., SMULIAN, A. G., CUSHION, M. T. (2003). *Pneumocystis* genome project, <http://Pneumocystis.uc.edu>.
- SMEGO, R. A. JR, NAGAR, S., MALOBA, B., POPARA, M. (2001). A meta-analysis of salvage therapy for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Arch Intern Med* 161 (12): 1529-33.
- SMULIAN, A. G., SESTERHENN, T., TANAKA, R., CUSHION, M. T. (2001). The ste3 pheromone receptor gene of *Pneumocystis carinii* is surrounded by a cluster of signal transduction genes. *Genetics* 157 (3): 991-1002.
- SMULIAN, A. G., SULLIVAN, D. W., LINKE, M. J., HALSEY, N. A., QUINN, T. C., MACPHAIL, A. P., HERNANDEZ-AVILA, M. A., HONG, S. T., WALZER, P. D. (1993). Geographic variation in the humoral response to *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 167 (5): 1243-7.
- SORIANO, V., DONA, C., RODRIGUEZ-ROSADO, R., BARREIRO, P., GONZALEZ-LAHOZ, J. (2000). Discontinuation of secondary prophylaxis for opportunistic infections in HIV-infected patients receiving highly active antiretroviral therapy. *AIDS* 14 (4): 383-6.
- SOULEZ, B., DEI-CAS, E., CHARET, P., MOUGEOT, G., CAILLAUX, M., CAMUS, D. (1989). The young rabbit: a nonimmunosuppressed model for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Infect Dis* 160 (2): 355-6.

- SOULEZ, B., PALLUAULT, F., CESBRON, J. Y., DEI-CAS, E., CAPRON, A., CAMUS, D. (1991). Introduction of *Pneumocystis carinii* in a colony of SCID mice. *J Protozool* 38 (6): 123S-125S.
- STEIN, C. R., POOLE, C., KAZANJIAN, P., MESHNICK, S. R. (2004). Sulfa use, dihydropteroate synthase mutations, and *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Emerg Infect Dis* 10 (10): 1760-5.
- STERN, J. B., PARROT, A., CADRANEL, J., MAYAUD, C. (1996). Infections à *Pneumocystis carinii*. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 8-591-A-10 ed. Techniques, Paris: pp. 1-8.
- STRINGER, J. R. (1996). *Pneumocystis carinii*: what is it, exactly? *Clin Microbiol Rev* 9 (4): 489-98.
- STRINGER, J. R. (2002). *Pneumocystis*. *Int J Med Microbiol* 292 (5-6): 391-404.
- STRINGER, J. R., BEARD, C. B., MILLER, R. F., WAKEFIELD, A. E. (2002). A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg Infect Dis* 8 (9): 891-6.
- STRINGER, J. R., CUSHION, M. T., WAKEFIELD, A. E. (2001). New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. *J Eukaryot Microbiol Suppl* : 184S-9S.
- STRINGER, J. R., EDMAN, J. C., CUSHION, M. T., RICHARDS, F. F., WATANABE, J. (1992). The fungal nature of *Pneumocystis*. *J Med Vet Mycol* 30 Suppl 1 : 271-8.
- STRINGER, J. R., WALZER, P. D. (1996). Molecular biology and epidemiology of *Pneumocystis carinii* infection in AIDS. *AIDS* 10 (6): 561-71.
- STRINGER, S. L., GARBE, T., SUNKIN, S. M., STRINGER, J. R. (1993). Genes encoding antigenic surface glycoproteins in *Pneumocystis* from humans. *J Eukaryot Microbiol* 40 (6): 821-6.

- STRINGER, S. L., HUDSON, K., BLASE, M. A., WALZER, P. D., CUSHION, M. T., STRINGER, J. R. (1989). Sequence from ribosomal RNA of *Pneumocystis carinii* compared to those of four fungi suggests an ascomycetous affinity. *J Protozool* 36 (1): 14S-6S.
- STRINGER, S. L., STRINGER, J. R., BLASE, M. A., WALZER, P. D., CUSHION, M. T. (1989a). *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp Parasitol* 68 (4): 450-61.
- STRUTT, M., SMITH, M. (2005). Development of a real-time probe-based PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *Med Mycol* 43 (4): 343-7.
- SUNDAR, K., ROSADO-SANTOS, H., REIMER, L., MURRAY, K., MICHAEL, J. (2001). Unusual presentation of thoracic *Pneumocystis carinii* infection in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. *Clin Infect Dis* 32 (3): 498-501.
- SUNKIN, S. M., STRINGER, J. R. (1995). Transcription factor genes from rat *Pneumocystis carinii*. *J Eukaryot Microbiol* 42 (1): 12-9.
- TAKAHASHI, T., GOTO, M., ENDO, T., NAKAMURA, T., YUSA, N., SATO, N., IWAMOTO, A. (2002). *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompromised patients with and without human immunodeficiency virus infection. *J Med Microbiol* 51 (7): 611-4.
- TAKAHASHI, T., HOSOYA, N., ENDO, T., NAKAMURA, T., SAKASHITA, H., KIMURA, K., OHNISHI, K., NAKAMURA, Y., IWAMOTO, A. (2000). Relationship between mutations in dihydropteroate synthase of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan and resistance to sulfonamide therapy. *J Clin Microbiol* 38 (9): 3161-4.
- TAKAHASHI, T., KANDA, T., IWAMOTO, A. (2002). Genetic diversity of drug targets including dihydropteroate synthase, dihydrofolate reductase and cytochrome b, in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* isolates in Japan. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 112 (1-4): 159-76.

- TAMBURRINI, E., MENCARINI, P., VISCONTI, E., ZOLFO, M., DE LUCA, A., SIRACUSANO, A., ORTONA, E., WAKEFIELD, A. E. (1996). Detection of *Pneumocystis carinii* DNA in blood by PCR is not of value for diagnosis of *P. carinii* pneumonia. *J Clin Microbiol* 34 (6): 1586-8.
- TANG, X., BARTLETT, M. S., SMITH, J. W., LU, J. J., LEE, C. H. (1998). Determination of copy number of rRNA genes in *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*. *J Clin Microbiol* 36 (9): 2491-4.
- TANSUPHASAWADIKUL, S., PITISUTTITHUM, P., KNAUER, A. D., SUPANARANOND, W., KAEWKUNGWAL, J., KARMACHARYA, B. M., CHOVAVANICH, A. (2005). Clinical features, etiology and short term outcomes of interstitial pneumonitis in HIV/AIDS patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 36 (6): 1469-78.
- TERRIS, B., MARCHE, C., POTET, F. (1996). Extra-pulmonary pneumocystosis in the course of AIDS. Report of a case. *Ann Pathol* 16 (1): 41-4.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. (1997). The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 25 (24): 4876-82.
- TOMA, E., THORNE, A., SINGER, J., RABOUD, J., LEMIEUX, C., TROTTIER, S., BERGERON, M. G., TSOUKAS, C., FALUTZ, J., LALONDE, R., GAUDREAU, C., THERRIEN, R. (1998). Clindamycin with primaquine vs. trimethoprim-sulfamethoxazole therapy for mild and moderately severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with AIDS: a multicenter, double-blind, randomized trial (CTN 004). CTN-PCP Study Group. *Clin Infect Dis* 27 (3): 524-30.
- TOTET, A., DUWAT, H., MAGOIS, E., JOUNIEAUX, V., ROUX, P., RACCURT, C., NEVEZ, G. (2004). Similar genotypes of *Pneumocystis jirovecii* in different forms of *Pneumocystis* infection. *Microbiology* 150 (Pt 5): 1173-8.

- TOTET, A., GRESILLON, K., MATOS, O., LUNDGREN, B., LARSEN, H. H., ROUX, P., HAUSER, P., NEVEZ, G. (2006). *Pneumocystis jirovecii* genotypes in european patients with chronic obstructive diseases [resumo PO46]. IX International Workshops on Opportunistic Protists (IWOP-9) and International Conference on Anaerobic Protists (ICAP), Lisboa, Portugal. Livro de resumos: 86.
- TOTET, A., LATOUCHE, S., DUWAT, H., MAGOIS, E., LACUBE, P., PAUTARD, J. C., SCHMIT, J. L., JOUNIEAUX, V., ROUX, P., RACCURT, C., NEVEZ, G. (2003). Multilocus genotyping of *Pneumocystis jirovecii* in patients developing diverse forms of parasitism: implication for a wide human reservoir for the fungus. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl : 670-1.
- TOTET, A., LATOUCHE, S., LACUBE, P., PAUTARD, J. C., JOUNIEAUX, V., RACCURT, C., ROUX, P., NEVEZ, G. (2004a). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. *Emerg Infect Dis* 10 (4): 667-73.
- TOTET, A., LATOUCHE, S., LACUBE, P., PAUTARD, J. C., JOUNIEAUX, V., RACCURT, C., ROUX, P., NEVEZ, G. (2004b). *Pneumocystis jirovecii* dihydropteroate synthase genotypes in immunocompetent infants and immunosuppressed adults, Amiens, France. *Emerg Infect Dis* 10 (4): 667-73.
- TOTET, A., MELIANI, L., LACUBE, P., PAUTARD, J. C., RACCURT, C., ROUX, P., NEVEZ, G. (2003a). Immunocompetent infants as a human reservoir for *Pneumocystis jirovecii*: rapid screening by non-invasive sampling and real-time PCR at the mitochondrial large subunit rRNA gene. *J Eukaryot Microbiol* 50 Suppl : 668-9.
- TOUZE, J. E., HOVETTE, P. H., MARTET, G. (1991). Infections à *Pneumocystis carinii*. *Encyclopédie Médico-Chirurgicale*, 8100 A 10 ed. Techniques, Paris: pp. 1-8.

- TOUZET, S., PARISSET, C., RABODONIRINA, M., POUTEIL-NOBLE, C. (2000). Nosocomial transmission of *Pneumocystis carinii* in renal transplantation. *Transplant Proc* 32 (2): 445.
- TSOLAKI, A. G., BECKERS, P., WAKEFIELD, A. E. (1998). Pre-AIDS era isolates of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis*: high genotype similarity with contemporary isolates. *J Clin Microbiol* 36 (1): 90-3.
- TSOLAKI, A. G., MILLER, R. F., UNDERWOOD, A. P., BANERJI, S., WAKEFIELD, A. E. (1996). 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* 174 (1): 141-56.
- TSOLAKI, A. G., MILLER, R. F., WAKEFIELD, A. E. (1999). Oropharyngeal samples for genotyping and monitoring response to treatment in AIDS patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Med Microbiol* 48 (10): 897-905.
- VARELA, J. M., REGORDAN, C., MEDRANO, F. J., RESPALDIZA, N., DE LA HORRA, C., MONTES-CANO, M. A., CALDERON, E. J. (2004). Climatic factors and *Pneumocystis jiroveci* infection in southern Spain. *Clin Microbiol Infect* 10 (8): 770-2.
- VARGAS, S. L., HUGHES, W. T., SANTOLAYA, M. E., ULLOA, A. V., PONCE, C. A., CABRERA, C. E., CUMSILLE, F., GIGLIOTTI, F. (2001). Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis* 32 (6): 855-61.
- VARGAS, S. L., HUGHES, W. T., WAKEFIELD, A. E., OZ, H. S. (1995). Limited persistence in and subsequent elimination of *Pneumocystis carinii* from the lungs after *P. carinii* pneumonia. *J Infect Dis* 172 (2): 506-10.
- VARGAS, S. L., PONCE, C. A., GIGLIOTTI, F., ULLOA, A. V., PRIETO, S., MUNOZ, M. P., HUGHES, W. T. (2000). Transmission of *Pneumocystis carinii* DNA from a patient with

- P. carinii* pneumonia to immunocompetent contact health care workers. *J Clin Microbiol* 38 (4): 1536-8.
- VARGAS, S. L., PONCE, C. A., HUGHES, W. T., WAKEFIELD, A. E., WEITZ, J. C., DONOSO, S., ULLOA, A. V., MADRID, P., GOULD, S., LATORRE, J. J., AVILA, R., BENVENISTE, S., GALLO, M., BELLETTI, J., LOPEZ, R. (1999). Association of primary *Pneumocystis carinii* infection and sudden infant death syndrome. *Clin Infect Dis* 29 (6): 1489-93.
- VARGAS, S. L., PONCE, C. A., LUCHSINGER, V., SILVA, C., GALLO, M., LOPEZ, R., BELLETTI, J., VELOZO, L., AVILA, R., PALOMINO, M. A., BENVENISTE, S., AVENDANO, L. F. (2005). Detection of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* and viruses in presumably immunocompetent infants who died in the hospital or in the community. *J Infect Dis* 191 (1): 122-6.
- VAVRA, J., KUCERA, K. (1970). *Pneumocystis carinii* delanoë, its ultrastructure and ultrastructural affinities. *J Protozool* 17 (3): 463-83.
- VISCONTI, E., ORTONA, E., MENCARINI, P., MARGUTTI, P., MARINACI, S., ZOLFO, M., SIRACUSANO, A., TAMBURRINI, E. (2001). Mutations in dihydropteroate synthase gene of *Pneumocystis carinii* in HIV patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 18 (6): 547-51.
- VOGEL, P., MILLER, C. J., LOWENSTINE, L. L., LACKNER, A. A. (1993). Evidence of horizontal transmission of *Pneumocystis carinii* pneumonia in simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques. *J Infect Dis* 168 (4): 836-43.
- VOHRA, P. K., PURI, V., KOTTOM, T. J., LIMPER, A. H., THOMAS, C. F. JR. (2003). *Pneumocystis carinii* STE11, an HMG-box protein, is phosphorylated by the mitogen activated protein kinase PCM. *Gene* 312 : 173-9.

- VOLPE, F., BALLANTINE, S. P., DELVES, C. J. (1993). The multifunctional folic acid synthesis fas gene of *Pneumocystis carinii* encodes dihydroneopterin aldolase, hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase and dihydropteroate synthase. *Eur J Biochem* 216 (2): 449-58.
- VOLPE, F., BALLANTINE, S. P., DELVES, C. J. (1995). Two domains with amino-acid sequence similarity are required for dihydroneopterin aldolase function in the multifunctional folic acid synthesis Fas protein of *Pneumocystis carinii*. *Gene* 160 (1): 41-6.
- VOLPE, F., DYER, M., SCAIFE, J. G., DARBY, G., STAMMERS, D. K., DELVES, C. J. (1992). The multifunctional folic acid synthesis fas gene of *Pneumocystis carinii* appears to encode dihydropteroate synthase and hydroxymethyldihydropterin pyrophosphokinase. *Gene* 112 (2): 213-8.
- WADA, M., SUNKIN, S. M., STRINGER, J. R., NAKAMURA, Y. (1995). Antigenic variation by positional control of major surface glycoprotein gene expression in *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis* 171 (6): 1563-8.
- WAKEFIELD, A. E. (1994). Detection of DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* in samples of ambient air. *J Eukaryot Microbiol* 41 (5): 116S.
- WAKEFIELD, A. E. (1996). DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol* 34 (7): 1754-9.
- WAKEFIELD, A. E., GUIVER, L., MILLER, R. F., HOPKIN, J. M. (1991). DNA amplification on induced sputum samples for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Lancet* 337 (8754): 1378-9.

- WAKEFIELD, A. E., LINDLEY, A. R., AMBROSE, H. E., DENIS, C. M., MILLER, R. F. (2003). Limited asymptomatic carriage of *Pneumocystis jiroveci* in human immunodeficiency virus-infected patients. *J Infect Dis* 187 (6): 901-8.
- WAKEFIELD, A. E., MILLER, R. F., GUIVER, L. A., HOPKIN, J. M. (1993). Oropharyngeal samples for detection of *Pneumocystis carinii* by DNA amplification. *Q J Med* 86 (6): 401-6.
- WAKEFIELD, A. E., PETERS, S. E., BANERJI, S., BRIDGE, P. D., HALL, G. S., HAWKSWORTH, D. L., GUIVER, L. A., ALLEN, A. G., HOPKIN, J. M. (1992). *Pneumocystis carinii* shows DNA homology with the ustomycetous red yeast fungi. *Mol Microbiol* 6 (14): 1903-11.
- WAKEFIELD, A. E., PIXLEY, F. J., BANERJI, S., SINCLAIR, K., MILLER, R. F., MOXON, E. R., HOPKIN, J. M. (1990). Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification. *Lancet* 336 (8713): 451-3.
- WAKEFIELD, A. E., PIXLEY, F. J., BANERJI, S., SINCLAIR, K., MILLER, R. F., MOXON, E. R., HOPKIN, J. M. (1990a). Amplification of mitochondrial ribosomal RNA sequences from *Pneumocystis carinii* DNA of rat and human origin. *Mol Biochem Parasitol* 43 (1): 69-76.
- WAKEFIELD, A. E., STEWART, T. J., MOXON, E. R., MARSH, K., HOPKIN, J. M. (1990b). Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84 (6): 800-2.
- WALKER, D. J., WAKEFIELD, A. E., DOHN, M. N., MILLER, R. F., BAUGHMAN, R. P., HOSSLER, P. A., BARTLETT, M. S., SMITH, J. W., KAZANJIAN, P., MESHNICK, S. R. (1998). Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome b gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *J Infect Dis* 178 (6): 1767-75.

- WALZER, P. D., FOY, J., STEELE, P., KIM, C. K., WHITE, M., KLEIN, R. S., OTTER, B. A., ALLEGRA C. (1992). Activities of antifolate, antiviral, and other drugs in an immunosuppressed rat model of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 36 (9): 1935-42.
- WALZER, P. D., LINKE, M. J. (1987). A comparison of the antigenic characteristics of rat and human *Pneumocystis carinii* by immunoblotting. *J Immunol* 138 (7): 2257-65.
- WANNAMETHEE, S. G., SIRIVICHAYAKUL, S., PHILLIPS, A. N., UBOLYAM, S., RUXRUNGTHAM, K., HANVANICH, M. (1998). Clinical and immunological features of human immunodeficiency virus infection in patients from Bangkok, Thailand. *Int J Epidemiol* 27 (2): 289-95.
- WATANABE, J., HORI, H., TANABE, K., NAKAMURA, Y. (1989). 5S ribosomal RNA sequence of *Pneumocystis carinii* and its phylogenetic association with "Rhizopoda / Myxomycota / Zygomycota group". *J Protozool* 36 (1): 16S-18S.
- WATANABE, J., HORI, H., TANABE, K., NAKAMURA, Y. (1989a). Phylogenetic association of *Pneumocystis carinii* with the 'Rhizopoda/Myxomycota/Zygomycota group' indicated by comparison of 5S ribosomal RNA sequences. *Mol Biochem Parasitol* 32 (2-3): 163-7.
- WEIG, M., KLINKER, H., BOGNER, B. H., MEIER, A., GROSS, U. (1997). Usefulness of PCR for diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia in different patient groups. *J Clin Microbiol* 35 (6): 1445-9.
- WEINBERG, A., DUARTE, M. I. (1993). Respiratory complications in Brazilian patients infected with human immunodeficiency virus. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 35 (2): 129-39.

- WEINBERG, G. A., EDLIND, T. D., LU, J. J., LEE, C. H., BAUER, N. L., DURANT, P. J. (1994). Genetic diversity of *Pneumocystis carinii* from different host species at the beta-tubulin gene locus and at the internal transcribed spacer regions of the rRNA gene cluster. *J Eukaryot Microbiol* 41 (5): 118S.
- WEVERLING, G. J., MOCROFT, A., LEDERGERBER, B., KIRK, O., GONZALES-LAHOZ, J., D'ARMINIO MONFORTE, A., PROENÇA, R., PHILLIPS, A. N., LUNDGREN, J. D., REISS, P. (1999). Discontinuation of *Pneumocystis carinii* pneumonia prophylaxis after start of highly active antiretroviral therapy in HIV-1 infection. EuroSIDA Study Group. *Lancet* 353 (9161): 1293-8.
- WILSON, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Enviroment Microbiol* 63 (10): 3741-51.
- WININGER, D. A., FASS, R. J. (2002). Impact of trimethoprim-sulfamthoxazole prophylaxis on etiology and susceptibilities of pathogens causing human immunodeficiency virus-associated bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother* 46 (2): 594-7.
- WORODRIA, W., OKOT-NWANG, M., YOO, S. D., AISU, T. (2003). Causes of lower respiratory infection in HIV-infected Ugandan adults who are sputum AFB smear-negative. *Int J Tuberc Lung Dis* 7 (2): 117-23.
- YANGCO, B. G., VON BARGEN, J. C., MOORMAN, A. C., HOLMBERG, S. D. (2000). Discontinuation of chemoprophylaxis against *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients with HIV infection. HIV Outpatient Study (HOPS) Investigators. *Ann Intern Med* 132 (3): 201-5.
- YOSHIDA, Y. (1989). Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool* 36 (1): 53-60.

- YPMA-WONG, M. F., FONZI, W. A., SYPHERD, P. S. (1992). Fungus-specific translation elongation factor 3 gene present in *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun* 60 (10): 4140-5.
- ZAMAN, M. K., WHITE, D. A. (1988). Serum lactate dehydrogenase levels and *Pneumocystis carinii* pneumonia. Diagnostic and prognostic significance. *Am Rev Respir Dis* 137 (4): 796-800.
- ZAMAN, M. K., WOOTEN, O. J., SUPRAHMANYA, B., ANKOBIAN, W., FINCH, P. J., KAMHOLZ, S. L. (1988). Rapid noninvasive diagnosis of *Pneumocystis carinii* from induced liquefied sputum. *Ann Intern Med* 109 (1): 7-10.
- ZAMUCO, R. L., YANG, G. C. (2005). Clue to fine-needle aspiration diagnosis of pleural pneumocystoma: neovascularization and Langhans' giant cell reaction. *Diagn Cytopathol* 33 (2): 97-9.
- 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 jirovecii* pneumonia. *Clin Infect Dis* 39 (7): 1047-51.
- ZAR, H. J., APOLLES, P., ARGENT, A., KLEIN, M., BURGESS, J., HANSLO, D., BATEMAN, E. D., HUSSEY, G. (2001). The etiology and outcome of pneumonia in human immunodeficiency virus-infected children admitted to intensive care in a developing country. *Pediatr Crit Care Med* 2 (2): 108-112.
- ZAR, H. J., DECHABOON, A., HANSLO, D., APOLLES, P., MAGNUS, K. G., HUSSEY, G. (2000). *Pneumocystis carinii* pneumonia in South African children infected with human immunodeficiency virus. *Pediatr Infect Dis J* 19 (7): 603-7.
- ZHANG, J., STRINGER, J. R. (1993). Cloning and characterization of an alpha-tubulin-encoding gene from rat-derived *Pneumocystis carinii*. *Gene* 123 (1): 137-41.

ZINGALE, A., CARRERA, P., LAZZARIN, A., SCARPELLINI, P. (2003). 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* 41 (6): 2709-12.